Do Trung Sy et al., 2013, p. 520-528
Proceedings of International Conference on "Bien Dong 2012"

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH THỦY PHÂN CÁ TẠP VÀ PHẾ LIỆU THỦY SẢN BẰNG ENZYME ĐỂ SẢN XUẤT SẢN PHẨM CAO ĐẠM GIÀU AXIT AMIN ỨNG DỤNG TRONG Y, DƯỢC

Đỗ Trung Sỹ[2], Trần Đình Toại[2], Lê Tất Thành[1], Hoàng Thị Bích[1], Nguyễn Văn Tuyến Anh[1], Nguyễn Đình Tuyến[2], Nguyễn Xuân Nguyên[1], Phạm Quốc Long[1]

[1]Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên - Viện KH&CN Việt Nam
[2]Viện Hóa học - Viện KH&CN Việt Nam

Tóm tắt: Sản xuất sản phẩm cao đạm giàu axit amin từ cá bằng công nghệ enzyme là giải pháp có ý nghĩa thiết thực nhằm nâng cao giá trị của phế liệu thủy sản. Bằng cách sử dụng enzyme để thủy phân, protein nhận được sẽ có giá trị dinh dưỡng cao hơn so với phương pháp thủy phân bằng axit hay bằng kiềm. Trong phần nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu sử dụng enzyme Bromelain tách từ phế liệu dứa để thủy phân cá tạp và phế liệu cá. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, enzme Bromelain hoạt động tối ưu ở điều kiện pH 5,5 và nhiệt độ 55-60^{0}C và sau 48h thủy phân, 1kg cá tạp thu được 247g cao đạm giàu axitamin để ứng dụng trong đời sống và y, dược.

Từ khóa: *Quy trình thủy phân, Cá tạp, Phế liệu thủy sản, Sản phẩm cao đạm, Y-dược.*

STUDY THE HYDROLYSIS PROCESS OF FISHES AND FISHERIES SCRAPS USING ENZYME TO PRODUCE HIGH PROTEIN PRODUCTS WITH AMINO ACID RICHNESS APPLIED IN MEDICINE

Do Trung Sy[2], Tran Dinh Toai[2], Le Tat Thanh[1], Hoang Thi Bich[1], Nguyen Van Tuyen Anh[1], Nguyen Dinh Tuyen[2], Nguyen Xuan Nguyen[1], Pham Quoc Long[1]

[1]Institute of Natural Products Chemistry - VAST
[2]Institute of Chemistry -VAST

Abtract: Producing high protein products with amino acid richness from fish using enzyme technology is a useful solution to improve the value of fisheries scraps. By using enzyme to hydrolyze, the obtained protein had higher value than that hydrolyzed by using acid or alkaline. In this paper, we use enzyme Bromelain isolated from pineapple waste to hydrolyze fishes and fisheries scraps. The results show that enzyme Bromelanin works best at the pH 5.5 and temperature 55-60^{o}C. After 48 hours of hydrolysis, from 1kg of fishes we obtained 247g high protein products with amino acid richness which can be applied in life and medicine.

Key words: *Hydrolysis process, Fish, Fisheries scraps, High protein products, Medicine.*

I. MỞ ĐẦU

Với điều kiện thuận lợi là bờ biển dài hàng ngàn km, ngành thủy sản Việt Nam đang từng bước khẳng định vị thế của mình với kim ngạch xuất khẩu đạt xấp xỉ 6 tỷ USD năm 2011. Tuy nhiên, quá trình đánh bắt, chế biến thủy sản xuất khẩu luôn đi kèm theo một lượng phế phụ phẩm khá lớn. Tổng lượng phế phẩm (đầu, xương, da, vây, vẩy…) ước tính khoảng 200.000 tấn/năm (Nguyễn Tài Lương, 2005). Đa phần, lượng phế thải này được sử dụng để sản xuất dầu diezel (phần phế thải chứa mỡ cá), phần lớn còn lại được dùng làm thức ăn chăn nuôi hoặc tiêu hủy. Điều này ảnh hưởng đến môi trường và sức khỏe người lao động do phương pháp xử lý còn nhiều hạn chế, kém hiệu quả.

Sản xuất sản phẩm cao đạm giàu axit amin từ cá bằng công nghệ enzyme là giải pháp có ý nghĩa thiết thực nhằm nâng cao giá trị của phế liệu cá. Bằng cách sử dụng enzyme để thủy phân, protein nhận được sẽ có giá trị dinh dưỡng cao hơn so với phương pháp thủy phân bằng axit hay bằng kiềm (Lowry và cs. 1951). Chính vì lý do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu quá trình thủy phân cá tạp và phế liệu thủy sản bằng enzyme để sản xuất sản phẩm cao đạm giàu axit amin ứng dụng trong dược phẩm và đời sống.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Nguyên liệu cá tạp và phế liệu cá được thu mua từ Công ty TNHH Việt Trường, Hải Phòng. Enzyme *Bromelain* thô: lõi, thân, lá dứa (phế liệu của nhà máy đồ hộp) được xay nhuyễn, lọc lấy phần dịch. Tiến hành ly tâm dịch để loại bỏ chất xơ. Phần dịch dứa được kết tủa bằng cồn 960 theo tỷ lệ dứa:cồn = 4:1. Thu tủa và đông khô thu được bột enzyme thô được sử dụng trong quá trình thủy phân enzyme *Bromelain* thu được có dạng bột, màu trắng ngà, xác định hoạt độ enzyme protease theo phương pháp Anson cải tiến (Lê Ngọc Tú và cs. 1977): 1693,75 (U/ml), nhiệt độ thích hợp: 55-60^{0}C, pH 5,5- 6,5.

Hình 1. Bột enzyme Bromelain.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp sơ chế mẫu

Cá tạp sau khi được rửa sạch, loại bỏ ruột, cắt đầu. Phần loại bỏ được cho vào mẫu phế liệu thủy sản. Cá được xay nhuyễn với nước. Nhiệt độ được nâng lên 80-90^{0}C trong 15 phút, sau đó hạ xuống 45-50^{0}C, pH 5,5-6. Sau khi bổ sung enzyme Bromelain, chúng tôi tiến hành thủy phân ở 50-55^{0}C. Dịch thủy phân được ly tâm và hàm lượng axit amin tổng số trong dịch thủy phân được kiểm tra bằng phương pháp so màu tyrosin. Dựa vào đồ thị đường chuẩn, hàm lượng axitamin tổng số có trong mẫu phân tích được tính.

Mẫu phế liệu thủy sản cũng được loại bỏ nội tạng, kết hợp với phần đầu của cá tạp đem xay nhuyễn. Sau đó cũng làm các bước tương tự như với mẫu cá tạp.

Số lượng vi sinh vật trong các mẫu nguyên liệu được xác định tại Trung tâm Kỹ thuật tiêu chuẩn đo lường chất lượng 1 -Tổng cục Đo lường chất lượng (phương pháp xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí- ISO 4833/2003, *Coliforms* – ISO 4831/2006, *E. coli*- ISO 7251/2005, *St. aureus*- ISO 6888-1/1999, *Cl. Pefringen* – ISO 7937/2004, *B. cereus* – ISO 7932/2004, Tổng số nấm men, mốc ISO 21527- 1,2/2008, *Salmonella* – ISO 6579/2002, *V. parahaemolyticus*- ISO/TS 21872-1/2007).

2.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ nước đến hiệu suất quá trình thủy phân

Cá và phế liệu thủy sản được xay nhỏ theo tỷ lệ nước bổ sung (cá: nước = 1:1, 1:2, 1:3 …). Bổ sung enzyme 2% và thủy phân ở điều kiện 55-60^{0}C, pH 5,5. Sau 24h, tiến hành đo hàm lượng axit amin sinh ra bằng phương pháp so màu tyzozin. Hàm lượng nước trong mẫu được xác định theo TCVN 4326-2001 (Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường, 2001a).

2.3. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme tới hiệu suất quá trình thủy phân

Khảo sát hàm lượng enzyme Bromelain thủy phân ở các mức 0,1%; 0,2%, 0,3%; 0,4%; 0,5%. Tiến hành thủy phân ở điều kiện nhiệt độ 55^{0}C, pH 5,5. Sau 24h thuỷ phân, tiến hành xác định hàm lượng axit amin tổng bằng phương pháp so màu tyrosin.

2.4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân tới hiệu suất quá trình thủy phân

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất quá trình thủy phân ở các mức: 0h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h.

2.5. Phân tích hàm lượng protein tổng số và các axit amin

Hàm lượng protein tổng số được xác định theo TCVN 4328-2001 (Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường, 2001b).

Hàm lượng axit amin tổng số được phân tích bằng phương pháp so màu tyrozin.

Nguyên tắc: Protein $\xrightarrow{\text{Protease}}$ Peptid + axit amin

Định lượng axitamin tạo thành trong dung dịch thủy phân bằng phản ứng màu giữa axit amin với thuốc thử Folin. Sau đó, dựa vào đường cong chuẩn của tyzozin để tính ra lượng axit amin.

Dựng đường chuẩn tyrozin

Cân 10mg tyrozin tinh khiết, thêm 1ml dung dịch HCl 1N, làm tan và cho hỗn hợp vào bình định mức, thêm nước cất đến vạch 200ml. Từ dung dịch gốc này pha loãng thành dãy dung dịch chuẩn có nồng độ trong khoảng $0,1x10^{-4}$ đến $0,4x10^{-4.}$

Lấy 1ml dung dịch chuẩn, 5ml dung dịch Na_2CO_3 0,5M và 1ml Folin cho vào ống nghiệm lắc đều rồi để ở 37^0C trong 30 phút. Đo cường độ màu của dung dịch hỗn hợp đối ngược với mẫu đối chứng (1ml nước cất thay thế 1ml dung dịch chuẩn) ở bước sóng =660nm. Từ số liệu thu được, dựng đường chuẩn tyrozin.

Phương trình đường chuẩn tyrozin có dạng: Y = 0,0874 x – 0,0467

Trong đó: Y: giá trị OD có được khi đo ở = 660 nm; X: lượng tyrozin có trong mẫu phân tích (mol)

Cách tiến hành thí nghiệm

Dịch cá thủy phân được ly tâm, loại bã và thu dịch trong. Sau đó tiến hành pha loãng mẫu. Lấy 1 ml mẫu cho vào ống nghiệm, bổ sung 5 ml dung dịch Na_2CO_3 0,5M và 1 ml Folin, lắc đều và để ở 37^0C trong 30 phút. Tiến hành đo ở bước sóng 660 nm.

2.6. Đông khô tạo sản phẩm

Mẫu sau thủy phân được đông khô ở nhiệt độ -48^0C bằng máy Christ Alpha 1-2 đến đạt yêu cầu (độ ẩm <10%), bảo quản trong bình kín.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Một số chỉ tiêu lý hóa và vi sinh vật của nguồn nguyên liệu

Nguồn nguyên liệu cá tạp và phế liệu cá được phân tích một số chỉ tiêu chất lượng như độ ẩm, hàm lượng protein tổng số và một số nhóm vi sinh vật được thể hiện ở Bảng 1 và Bảng 2.

Bảng 1. Độ ẩm, hàm lượng protein tổng số ở cá tạp và phế liệu cá

TT	Nguyên liệu	Độ ẩm (%)	Hàm lượng protein tổng số (%)
1	Cá tạp	71,14	22,71
2	Phế liệu thủy sản	87,60	9,45

Kết quả ở Bảng 1 và 2 cho thấy, mật độ vi sinh vật trong cá tạp và phế liệu thủy sản khá lớn, trong đó có những chủng vi sinh vật có khả năng sinh protease nên hữu ích cho quá trình thủy phân cá (*Bacillus sp.*), nhưng cũng có những chủng vi sinh vật có thể sẽ làm hỏng sản phẩm hoặc gây ngộ độc cho người sử dụng (*Coliforms, E.coli, Staphylococcus sp., ... Clostridium sp.).* Vì vậy, cần có những phương án làm giảm hoặc triệt tiêu nguồn vi sinh vật trong mẫu nghiên cứu

gây ảnh hưởng xấu đến dịch đạm thủy phân. Đặc biệt trong phế liệu thủy sản, hàm lượng protiein thấp hơn, mật độ vi sinh vật lớn hơn rất nhiều so với mẫu cá tạp. Để nâng cao hiệu quả của quá trình thủy phân, trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi loại bỏ nội tạng trong quá trình sơ chế và tăng nhiệt độ trước quá trình thủy phân lên 90-100^{0}C trong 20 phút nhằm loại bớt vi sinh vật, sau đó mới hạ nhiệt độ xuống 55^{0}C và bổ sung enzyme Bromelain để tiến hành thủy phân. Phương pháp này bước đầu cũng đã mang lại hiệu quả cho quá trình thủy phân, đồng thời vẫn giữ được chất lượng của sản phẩm.

Bảng 2. Thành phần và số lượng vi sinh vật ở cá tạp và phế liệu cá

TT	Nhóm vi sinh vật	Số lượng vi sinh vật (CFU/g)	
		Cá tạp	Phế liệu cá
1	*Bacillus sp.*	3.10^3	$1,3.\ 10^5$
2	*Micrococus sp.*	$3,1.\ 10^6$	$2,3.\ 10^7$
3	*Coliforms*	$5,5.\ 10^5$	$1,9.\ 10^7$
4	*E. coli*	$1.\ 10^4$	$1,2\ .\ 10^5$
5	*Staphylococcus sp.*	$2.\ 10^4$	$1,1 \times 10^5$
6	*Pichia*	$3,5.\ 10^3$	$2,0\ .10^4$
7	*Salmonella*	0	0
8	*Vibrio cholera*	0	0
9	*Clostridium sp.*	$1,5\ .\ 10^4$	$1,2\ .\ 10^6$

2. Ảnh hưởng của tỷ lệ nước đến hiệu suất quá trình thủy phân

Bảng 3 cho thấy tỷ lệ cá: nước là 1:2 thích hợp cho cả hai mẫu nguyên liệu cá tạp và phế liệu thủy sản. Chúng tôi sử dụng tỷ lệ này cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng tỷ lệ giữa nguyên liệu/nước đến hiệu suất quá trình thủy phân

TT	Mẫu	Tỷ lệ cá: nước (kg/l)	Hàm lượng axitamin (µmol)
1	Cá tạp	1:1	98,7
		1:2	**187,38**
		1:3	168,45
		1:4	110,32
		1:5	76,45
2	Phế liệu thủy sản	1:1	63,5
		1:2	**73,8**
		1:3	58,72
		1:4	43,1
		1:5	35,5

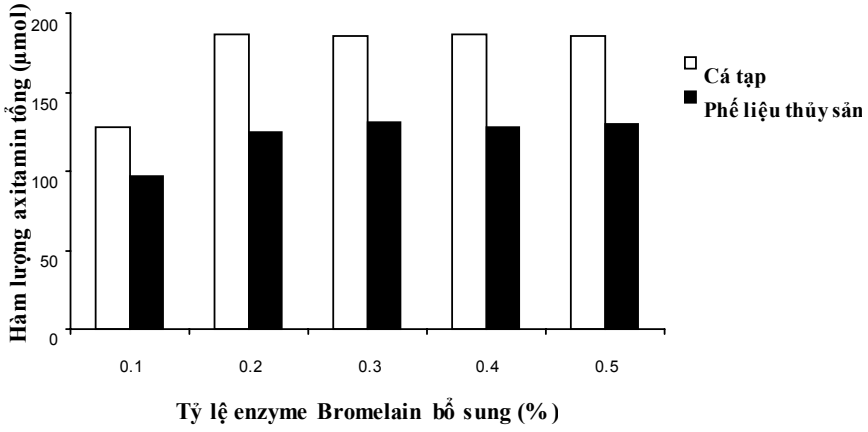
3. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme tới hiệu suất quá trình thủy phân

Cá và phế liệu thủy sản được sơ chế và bổ sung hàm lượng enzyme *Bromelain* theo tỷ lệ 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%. Tiến hành thủy phân ở điều kiện nhiệt

độ 55^0C, pH 5.5. Sau 24h thuỷ phân, tiến hành xác định hàm lượng axit amin tổng bằng phương pháp so màu tyrosin. Qua Bảng 4 và Hình 2 cho thấy, nồng độ enzyme khoảng 0,2% cho hiệu quả thủy phân cao nhất, có tăng hàm lượng enzyme bổ sung thì tốc độ thủy phân vẫn thay đổi không đáng kể sau 24h. Chính vì lí do đó, trong các nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi lựa chọn lượng enzyme Bromelain bổ sung vào quá trình thủy phân là 0,2%.

Bảng 4. Tỷ lệ giữa enzyme Bromelain và cơ chất

TT	Lượng enzyme bổ sung (%)	Hàm lượng axitamin tổng (µmol)	
		Cá tạp	Phế liệu thủy sản
1	0,1	127,34	96,41
2	0,2	186,53	124,3
3	0,3	185,45	131,15
4	0,4	187,06	127,84
5	0,5	185,39	129,56



Hình 2. Đồ thị mối tương quan giữa tỷ lệ giữa enzyme Bromelain và cơ chất.

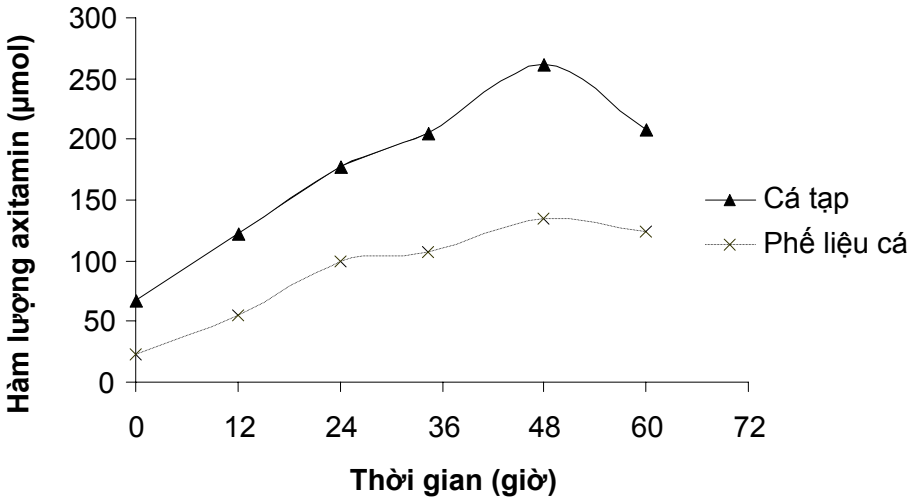
4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất của quá trình thủy phân

Cá tạp và phế liệu thủy sản được sơ chế và thủy phân với 0,2% Bromelain ở nhiệt độ 55^0C, pH 5,5-6. Ở các thời điểm khác nhau của quá trình thủy phân, tiến hành lấy mẫu và phân tích hàm lượng axitamin sinh ra bằng phương pháp so màu tyrosin.

Theo kết quả ở Bảng 5 và Hình 3, sau khoảng 48 giờ thủy phân, hàm lượng axit amin tổng số thu được trong dịch thủy phân là cao nhất. Tăng nhiệt độ lên 100^0C để ngừng quá trình thủy phân.

Bảng 5. Tốc độ thủy phân của enzyme Bromelain trong mẫu cá tạp và phế liệu thủy sản

Thời gian (giờ)	Hàm lượng axitamin (µmol)	
	Cá tạp	Phế liệu thủy sản
0	66,74	23,42
12	123,11	55,36
24	178,29	98,74
36	205,55	107,56
48	261,01	134,21
60	208,11	123,45



Hình 3. Tốc độ thủy phân của enzyme Bromelain trong mẫu cá tạp và phế liệu thủy sản

Mẫu thủy phân cá tạp được loại bã xương và lipit bằng phễu chiết trong điều kiện nhiệt độ thấp. Đông khô sản phẩm ở nhiệt độ -48^{0}C đến khi đạt yêu cầu (độ ẩm <10%) (Hình 4).

Mẫu thủy phân phế liệu cá kết hợp với bã xương của quá trình thủy phân cá tạp được đông khô ở -48^{0}C đến khi độ ẩm < 10% (Hình 5).

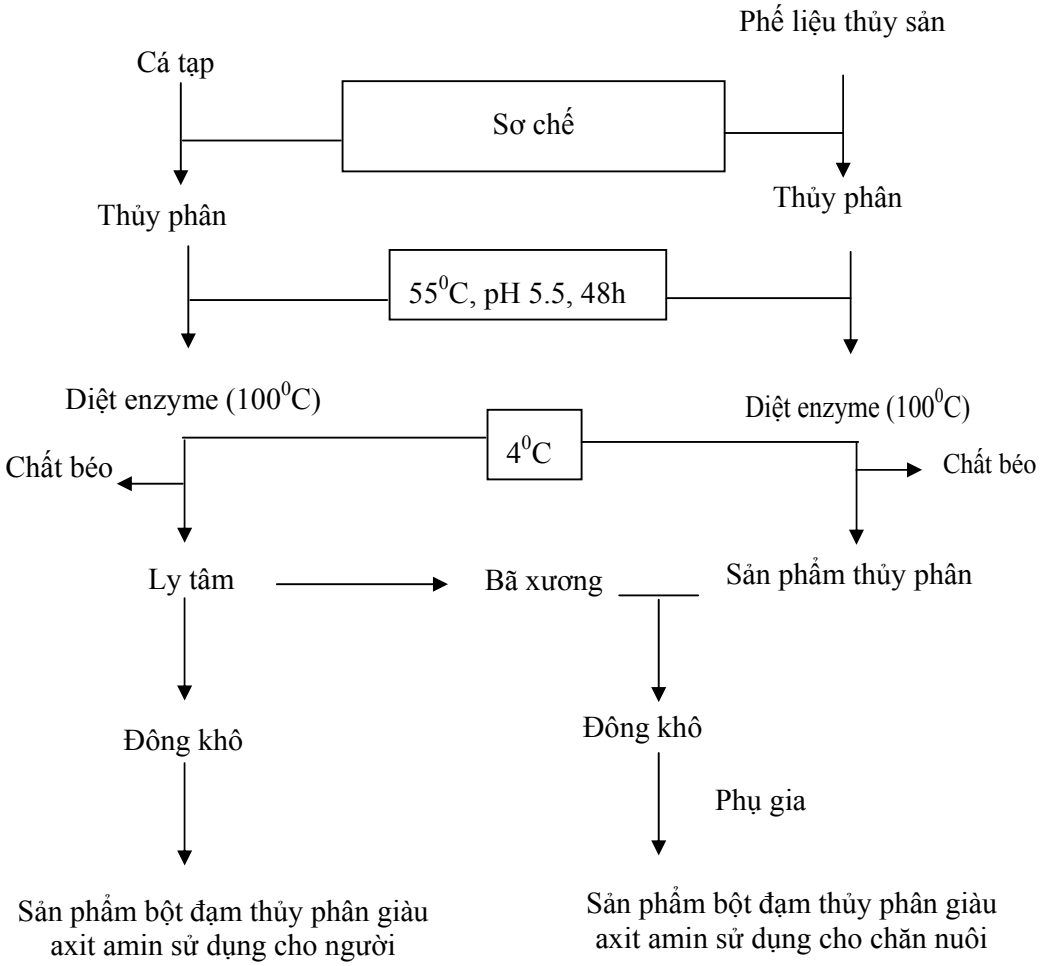
Từ 1 kg cá tạp thủy phân, sau quá trình thủy phân thu được 247g cao đạm giàu axit amin. Hiệu suất của quá trình là 24,7%. Sản phẩm thu được dạng bột, màu vàng được sử dụng bổ sung vào thành phần sản phẩm dược phẩm hoặc thực phẩm cao cấp.

Từ 1 kg phế liệu thủy sản, sau quá trình thủy phân thu được 123 g cao đạm giàu axit amin. Sản phẩm có màu vàng nâu, được nghiền mịn, bổ sung phụ gia (bột cám, bột ngô, …), sau đó tạo hạt cốm và sử dụng làm thức ăn cho chăn nuôi.

Hình 4. Bột đạm thủy phân giàu axit amin từ cá tạp

Hình 5. Bột đạm thủy phân giàu axit amin từ phế liệu thủy sản

Quy trình thủy phân cá tạp và phế liệu thủy sản bằng enzyme Bromelain



Hình 6. Sơ đồ quy trình thủy phân cá tạp và phế liệu thủy sản bằng enzyme Bromelain

IV. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu và xây dựng được quy trình tạo sản phẩm cao đạm giàu axit amin từ cá tạp và phế liệu thủy sản bằng enzyme *Bromelain* tách từ phế liệu dứa. Kết quả cho thấy, với nồng độ enzyme 0,2%; tỷ lệ cơ chất và nước là 1:2, thời gian thủy phân là 48h cho hiệu quả quá trình thủy phân cả cá tạp và phế liệu thủy sản cao nhất.

Từ 1kg cá tạp sau quá trình thủy phân thu được 247g cao đạm giàu axit amin và 1kg phế liệu thủy sản thu được 123g cao đạm giàu axit amin để ứng dụng trong đời sống và y dược.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự tài trợ của Chương trình Hóa dược quốc gia, đề tài "*Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất thuốc chữa bệnh viêm khớp dạng thấp và một số thực phẩm chức năng từ nguyên liệu sinh vật biển*", mã số CNHD.ĐT.012/09-11.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường, 2001a. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4326:2001 về thức ăn chăn nuôi - Xác định độ ẩm và hàm lượng chất bay hơi khác.
2. Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường, 2001b. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4328:2001 về thức ăn chăn nuôi - xác định hàm lượng nitơ và tính hàm lượng protein thô - phương pháp Kjeldahl.
3. Lê Ngọc Tú và cộng sự. Hóa sinh công nghiệp. Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật. 1997. 9-22.
4. Lowry O. H., N. J. Rosebrough A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem, 265–275.
5. Nguyễn Tài Lương, 2005. Thực phẩm chức năng, Tạp chí Hoạt động khoa học, số 12.