

**ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN ĐẾN SỰ HOẠT ĐỘNG CỦA PROTEIN MYOSIN
TẠO DAI CỦA THỊT CÁ ĐỎ CỦA *PTEROCAESIO DIGRAMMA* (BLEEKER, 1864)
XAY NHUYỄN TẠI NHIỆT ĐỘ PHÒNG**

¹Nguyễn Thu Hồng, ²Ngô Thị Ty Na, ¹Lê Thị Thu Thảo,
¹Phan Bảo Vy, ¹Đoàn Thị Thiết, ¹Nguyễn Phương Anh, ¹Lê Hồ Khánh Hỷ,
¹Đặng Quốc Minh, ¹Phạm Xuân Kỳ, ¹Đào Việt Hà
¹Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam
²Trường Đại học Nông lâm TP. Hồ Chí Minh

Tóm tắt Trong sản xuất chả cá sạch ở quy mô nhỏ lẻ (thủ công), để tạo sản phẩm có độ đàn hồi mong muốn thì thông thường phụ thuộc vào thời gian định hình của thịt cá xay nhuyễn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian đối với hoạt động của protein myosin trong thịt cá đỏ củ *Pterocaesio digramma* (Bleeker, 1864) thu tại cảng Cửa Bé, thành phố Nha Trang trong điều kiện nhiệt độ phòng (khoảng 30°C). Các gel đã được chuẩn bị để định hình ở thời gian 0,5 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 6 giờ và 9 giờ tại nhiệt độ phòng trước khi hấp chín ở 85°C trong 20 phút. Độ đàn hồi được xác định bằng phương pháp đo độ lưu biến, sự biểu hiện của các protein tạo dai được xác định bằng phương pháp điện di SDS-PAGE. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi tăng thời gian định hình dẫn đến tăng độ dai, cụ thể tăng độ bền và độ biến dạng của gel. Gel đạt độ dai cực đại ở 12,7 N khi được ổn định tại nhiệt độ phòng sau 9 giờ. Các vạch protein trong kết quả điện di SDS-PAGE thể hiện sự giảm dần của chuỗi nặng myosin trong gel theo thời gian định hình. Như vậy sự suy giảm myosin liên quan đến sự gia tăng độ bền và độ biến dạng của gel.

**EFFECT OF TIME SETTING ON THE ACTIVITIES OF MYOSIN ON GELLING
CHARACTERISTICS OF MEAT FISH FROM DOUBLE-LINED FUSILIER
PTEROCAESIO DIGRAMMA (BLEEKER, 1864) AT ROOM TEMPERATURE**

¹Nguyen Thu Hong, ²Ngo Thi Ty Na, ¹Le Thi Thu Thao,
¹Phan Bao Vy, ¹Doan Thi Thiet, ¹Nguyen Phuong Anh, ¹Le Ho Khanh Hy,
¹Dang Quoc Minh, ¹Pham Xuan Ky, ¹Dao Viet Ha
¹Institute of Oceanography, Vietnam Academy of Science & Technology
²Nong Lam University in Ho Chi Minh City

Abstract Setting time is the important step of organic fish cake producing to make a good elasticity product. In this study, we investigated the effect of time on the elastic properties of myosin protein of meat fish paste of double-lined fusilier *Pterocaesio digramma* (Bleeker, 1864) collected in Cua Be port, Nha Trang city at room temperature. The gel was prepared for setting time at 0.5 hour, 1 hour, 2 hours, 3 hours, 6 hours and 9 hours at room temperature before cooking at 85°C for 20 minutes. Elasticity properties (breaking strength and breaking strain) were measured by rheometer. The decomposition and polymerization of the proteins was determined by SDS-

PAGE. The results indicated that increasing setting time led to increase the breaking force and deformation of gel. It reached to maximum toughness in 12.7 N when incubation time was 9 hours. The protein pattern on SDS-PAGE showed that myosin heavy chain gradually decreased in gel via setting time. The results showed that the decrease in myosin heavy chain intensity was coincidental with the increase in breaking force and deformation.

I. MỞ ĐẦU

Protein cơ tạo độ đàn hồi được tìm thấy nhiều trong cơ cá, thành phần chủ yếu là các myosin và actin (Yasui và cs., 1980). Dưới tác dụng của nhiệt độ, các protein sẽ phản ứng với nhau tạo các mạng lưới gel liên kết khi thịt cá được xay nhuyễn với muối NaCl (Shimizu và cs., 1981). Các mạng lưới gel này liên quan đến quá trình mở xoắn của các protein để thiết lập các cầu nối hydro (Lanier, 1992), cầu nối giữa các phân tử có nhóm kỵ nước (Sano và cs., 1988), cầu nối disulphide (Hossain và cs., 2001; Sano và cs., 1988; Itoh và cs., 1980) hay cầu nối cộng hóa trị (Wan và cs., 1994) tạo nên sự đa dạng trong quá trình tạo mạng lưới. Sau đó, sự tập hợp lại của các chuỗi nặng myosin với nhau và với actin sẽ tạo mạng lưới gel vững chắc có thể xảy ra ở nhiệt độ 4°C trong khoảng 1-10 tiếng hoặc 20-40°C hay 60°C trong 30 phút trước khi nấu chín ở 85-90°C (Matsuoka và cs., 2014; Soottawat và cs., 2003). TGase được xem là enzyme xúc tác cho quá trình polyme hóa của myosin (Hirakawa & cs., 2007; Seki và cs., 1990). Sự đáp ứng với quá trình định hình này khác nhau ở các loài khác nhau (Shimizu và cs., 1981), liên quan đến môi trường sống của chúng (Morales và cs., 2001).

Protein cơ liên quan đến quá trình tạo độ dai của gel làm từ thịt cá xay nhuyễn được nghiên cứu từ rất sớm do ứng dụng trong công nghiệp chế biến thủy sản (Shimizu và cs., 1981). Thịt cá xay nhuyễn được sản xuất từ nhiều loài cá, hầu hết là các loài có giá trị kinh tế thấp. Thực tế, những loài cá này có giá chợ rẻ nếu dùng để làm thức ăn hằng ngày hoặc bị vứt đi ngay sau khi đánh bắt vì chi phí

vận chuyển cao hơn giá chợ (Shimizu và cs., 1981; Matsuoka và cs., 2014). Vì vậy, nếu những đối tượng này được chế biến thành những sản phẩm dinh dưỡng có giá trị kinh tế hơn như là chả cá, xúc xích, giò cua... sẽ góp phần sử dụng hiệu quả nguồn lợi thủy sản.

Tại nước ta, chưa có công trình công bố về nghiên cứu protein tạo độ kết dính trong thịt cá xay nhuyễn. Một số nghiên cứu về quy trình sản xuất chả cá đã được tiến hành nhưng chỉ tập trung về cách phối trộn các thành phần bột, gia vị với thịt cá để tạo sản phẩm (Đào Trọng Hiếu, 2010), hoặc ảnh hưởng của nhiệt độ trong quá trình ổn định độ dai của sản phẩm từ cá nước ngọt bằng cách đo độ đàn hồi của sản phẩm (Nguyen Van Muoi và Dang Thi Thao Nguyen, 2012). Trong khi đó, một trong những định hướng ưu tiên của chương trình bảo tồn nguồn lợi thủy sản đến năm 2020 đã được phê duyệt là phục hồi nguồn lợi thủy sản ven biển về cơ bản, đặc biệt một số loài sinh vật biển sử dụng làm nguyên liệu để chế biến sản phẩm thủy sản kết nối chặt chẽ với các làng nghề truyền thống (FISNET, 2012). Các sản phẩm từ thịt cá xay nhuyễn (phổ biến nhất là chả cá) lại đang ở trong tình trạng không an toàn cho sức khỏe cộng đồng do người sản xuất đã sử dụng hàn the để đảm bảo độ dai cho nó. Tất cả 27 cơ sở sản xuất chả cá được kiểm tra tại Phú Yên, Đồng Tháp đều bị nhiễm các hóa chất trên khi bị kiểm tra.

Năm 2014, nghiên cứu thăm dò về ảnh hưởng của nhiệt độ lên protein tạo dai của thịt cá đỏ củ *Pterocaesio digramma* (Bleeker, 1864) xay nhuyễn (là loài thường được sử dụng để làm chả cá tại Nha Trang) đã được tiến hành tại phòng Hóa sinh, Viện

Hải dương học, Việt Nam và trường đại học Kitasato, Nhật Bản. Kết quả chỉ ra rằng độ dai phát triển đến mức cực đại ở nhiệt độ ổn định 37°C trong thời gian 30 phút. Trên thực tế, nếu sản xuất chả cá từ thịt cá xay nhuyễn ở điều kiện nhiệt độ bình thường sẽ dễ dàng được áp dụng đối với các hộ sản xuất chả cá tại Việt Nam vì việc đầu tư một tủ hấp biến nhiệt (thấp nhất 50 triệu đồng/1 cái) là khó thực hiện đối với họ. Do đó, nghiên cứu này đã xác định ảnh hưởng của thời gian lên quá trình tạo dai của myosin trong thịt cá đỏ củ *Pterocaesio digramma* (Bleeker, 1864) xay nhuyễn ở điều kiện nhiệt độ phòng (30°C) nhằm đưa ra những thông số thời gian phù hợp cho những hộ sản xuất chả cá sạch.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Thu mẫu và chuẩn bị thịt cá xay nhuyễn

Cá đỏ củ tươi được thu tại cảng Cửa Bể, Nha Trang, Khánh Hòa (n=14) có khối lượng ($139,85 \pm 21,85$ g) và kích thước ($23,31 \pm 1,16$ cm). Cá được bảo quản bằng đá lạnh và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Cá được rửa sạch, bỏ đầu, rồi phi lê lấy thịt cá. Thịt cá sau đó được rửa sạch và xay nhuyễn tạo thành thịt cá xay nhuyễn bảo quản trong tủ đông (-20°C) đến khi làm thí nghiệm.

2. Chuẩn bị gel cho thí nghiệm

Thịt cá xay nhuyễn trộn với NaCl với tỷ lệ 30 gam NaCl/kg thịt cá rồi tiếp tục xay nhuyễn và sau đó được quét trong các hộp nhựa (cao 25 mm, bán kính 40 mm) để cố định gel ở thời gian khác nhau. Mẫu thí nghiệm sẽ được ủ ở các nhiệt độ phòng trong thời gian 0,5 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 6 giờ và 9 giờ trước khi hấp chín ở 85°C trong 20 phút. Mẫu đối chứng sẽ không có thời gian ủ mà hấp chín ở 85°C trong 20 phút.

3. Phương pháp xác định độ đàn hồi của gel

Độ đàn hồi của gel được thể hiện qua hai thông số độ bền (N) và độ biến dạng (%) của gel. Hai thông số này được xác định

trên máy đo lưu biến (Model CR – 200D, Sun Scientific Co.Ltd, Tokyo, Japan) bằng chế độ PEAK với đường kính trụ nén 5 mm, độ dài trụ 10 cm, tốc độ di chuyển đầu trụ là 60 mm/phút theo phương pháp của Shimizu và cs. (1981). Mỗi mẫu được lặp lại ít nhất 3 lần.

4. Xác định sự biểu hiện của protein tạo dai bằng SDS-PAGE

Sự hoạt động của protein tạo dai được quan sát trên gel polyacrylamide dựa vào mức độ biểu hiện đậm và nhạt của vạch myosin (200 kDa) xuất hiện trên gel điện di SDS-PAGE.

Gel sau khi được đun chín được cắt thành miếng nhỏ để tách chiết protein bằng 20mM Tris-HCl pH 8,0 chứa 8M urea, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) và 2% 2 – mercaptoethanol), sau đó đun sôi trong 2 phút. Hàm lượng protein chiết từ gel định hình ở các thời gian đã thiết lập được xác định bằng phương pháp của Lowry và cs. (1951).

Điện di SDS-PAGE được tiến hành theo phương pháp của Weber và Osborn (1969), sử dụng 3% gel polyacrylamide. Sau khi gel được tạo bản xong, 50 µg protein ở các mẫu thí nghiệm trên được cho vào các giếng trên bản gel để tiến hành điện di. Gel đã được nhuộm màu với Commasive Brilliant Blue R - 250 và rửa giải với 7% acid acetic chứa 25% methanol sau khi kết thúc quá trình điện di.

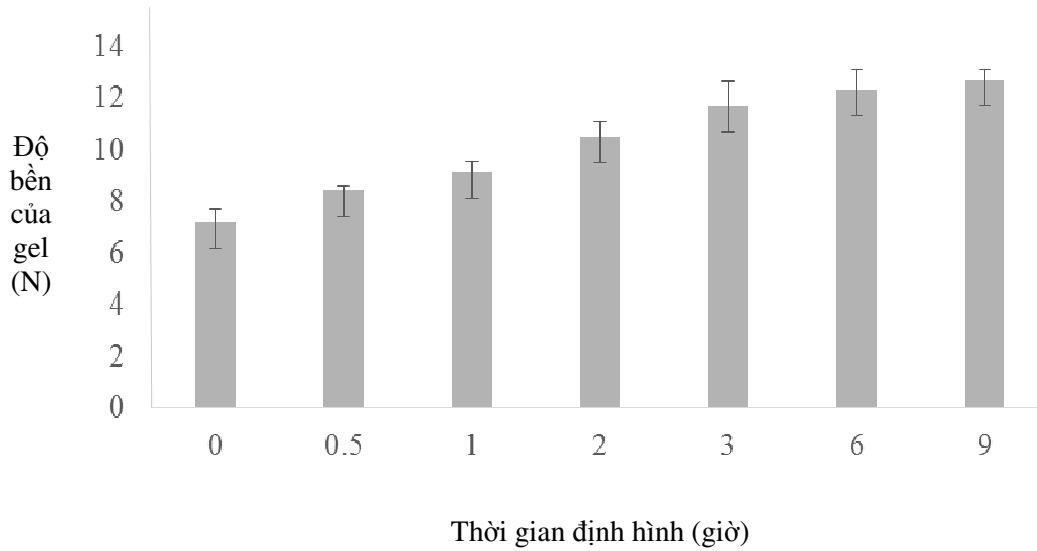
5. Phân tích thống kê

Kết quả tính toán là số trung bình của 3 lần lặp thí nghiệm \pm độ lệch chuẩn.

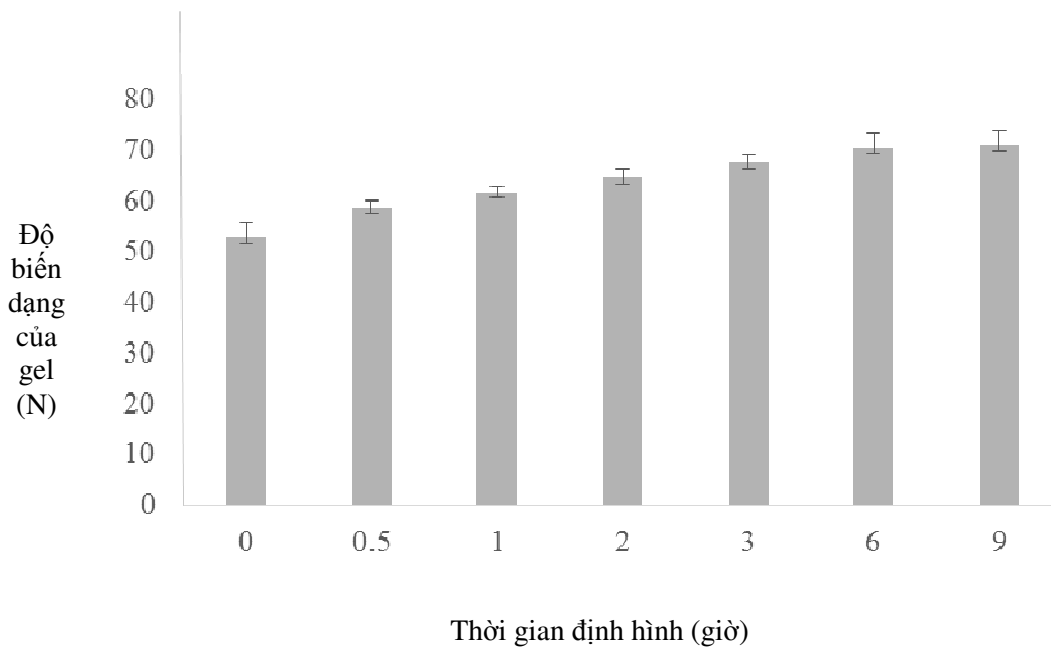
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Độ đàn hồi của gel thay đổi theo thời gian định hình tại nhiệt độ phòng

Quá trình định hình thịt cá xay nhuyễn ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (khoảng 30°C) tại các thời gian 0,5 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 6 giờ và 9 giờ dẫn đến sự gia tăng độ dai của gel. Cụ thể, sự gia tăng độ bền (N) và độ biến dạng (%) của gel của cá đỏ củ *Pterocaesio digramma* (Bleeker, 1864) thể hiện ở hình 1a,b.



a)



b)

Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian lên độ đàn hồi của gel (a, b) tại nhiệt độ phòng thí nghiệm

Fig. 1. Effect of setting time on the gel characteristics (a, b) at room temperature

Gel không qua quá trình định hình có độ bền và độ biến dạng thấp nhất. Tuy nhiên, cả hai lực đều gia tăng khi có sự gia tăng thời gian định hình. Gel được định hình trong khoảng thời gian 2-9 giờ dẫn tới gia tăng lực đàn hồi từ 1,4 - 1,8 lần so với mẫu không có thời gian định hình. Từ kết quả trên cũng cho thấy, gel của cá đờ củ có độ

đàn hồi cao hơn gel các loài cá khác đã được nghiên cứu như cá đờ trắng (whiter croaker), cá đờ, cá nhồng (Soottawat và cs., 2003; Matsuoka và cs., 2014) từ 2-3 lần. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với các nghiên cứu về gia tăng độ dai của gel của các loài cá khác. Chẳng hạn, độ dai của gel từ cá Minh Thái Alaska tăng khi gia

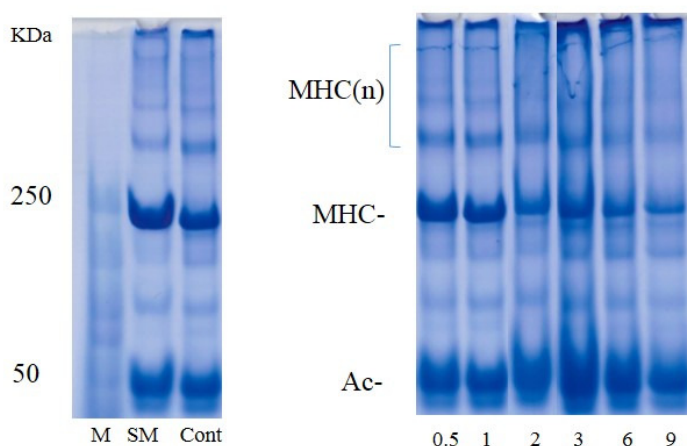
tăng thời gian định hình ở nhiệt độ từ 20°C và 30°C (Numakura và cs., 1985). Đối với các loài cá sống tại vùng nhiệt đới như cá nhồng, cá đồng gel của chúng cũng tăng độ đàn hồi khi tăng thời gian định hình ở nhiệt độ 25°C đến 8 giờ (Soottawat và cs., 2003).

Quá trình định hình tạo độ dai của gel dưới tác dụng của thời gian hoặc nhiệt độ được giả thiết như sau. Quá trình định hình dẫn tới sự phân hủy rồi sau đó là sự polyme hóa của các myosin dưới xúc tác của TGase (Kimura và cs., 1991). Tiếp theo đó việc xử lý gel ở nhiệt độ cao (85°C) dẫn tới sự hội

tụ protein nhờ các liên kết ưa nước và lưu huỳnh (Samejima và cs., 1981; Benjakul và cs., 2001). Từ đó, khối cộng hợp khổng lồ được hình thành để độ dẻo dai tốt cho gel (Chan và cs., 1992).

2. Sự biểu hiện của protein tạo dai (myosin heavy chain) trên SDS-PAGE

Hoạt động của chuỗi nặng myosin được biểu hiện bằng mức độ đậm, mờ khác của nó trong thời gian định hình khác nhau (Hình 2).



Hình 2. Các vạch protein trên SDS-PAGE của gel xử lý nhiệt tại thời gian khác nhau ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trước khi nấu ở 85°C trong 20 phút. Cont: đối chứng, M: protein chuẩn, SM: thịt cá đồ củ xay nhuyễn, Ac-: Actin, MHC: chuỗi nặng myosin

Fig. 2. Bands on SDS-PAGE of gel setting at different time in room temperature before cooking at 85°C within 20 minutes. Control: (Cont), M (marker), SM (surimi), Ac- (Actin), MHC (myosin heavy chain monomer)

Theo kết quả thể hiện ở hình 2, dãy gel được định hình có chuỗi nặng myosin bị mờ dần so với gel không định hình. Trong tất cả các gel được kiểm tra, vạch MHC được định hình sau 9 giờ là mờ nhất, tương đồng với độ dai cực đại đạt được (kết quả hình 1). Sự mờ của vạch MHC là chuẩn bị cho quá trình tạo cầu nối chéo của các protein trong quá trình định hình. Từ kết quả này cho thấy rằng độ mờ của MHC liên quan đến việc tăng độ bền và độ biến dạng của gel (Hình 1a, b). Càng nhiều MHC ít bị phân hủy thì độ dai của gel càng giảm. Trong kết quả nghiên cứu trước về ảnh hưởng của nhiệt độ lên độ dai của gel thì

thấy rằng nếu định hình tại nhiệt độ từ 37 - 45°C, thời gian ủ là 30°C, MHC biểu hiện trên SDS-PAGE giảm tới mức thấp nhất. Như vậy, việc tạo độ dai tốt cho gel của chả cá từ nguồn nguyên liệu cá đồ củ có thể trải qua giai đoạn định hình trong khoảng 2-9 giờ ở nhiệt độ thường (khoảng 30°C) hoặc trong 30 phút ở nhiệt độ 37-45°C. Một số nghiên cứu khác cũng đã chỉ ra rằng biểu hiện mờ nhất của MHC được quan sát trên SDS-PAGE ở cá đù Đại Tây Dương và cá Minh Thái Alaska được xác định ở 25°C với thời gian định hình từ 3-8 giờ hoặc 40°C trong 30 phút (Kamath và cs., 1992) tương ứng với độ dai của gel đạt cực đại.

IV. KẾT LUẬN

Độ dai của gel chả cá từ cá đò củ *Pterocaesio digramma* (Bleeker, 1864) tăng dần khi thời gian định hình từ 2-9 giờ ở nhiệt độ bình thường (30°C). Sự tăng dần về độ dai (độ bền và độ biến dạng) của gel liên quan đến sự giảm dần của myosin thể hiện trên vạch protein trong kết quả điện di SDS-PAGE.

Lời cảm ơn. Chúng tôi xin cảm ơn Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện đề tài này trong khuôn khổ đề tài nhiệm vụ trẻ năm 2015 về “Ảnh hưởng của thời gian đến sự hoạt động của protein myosin tạo dai của thịt cá đò củ *Pterocaesio digramma* (Bleeker, 1864) xay nhuyễn tại nhiệt độ phòng”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Benjakul S., W. Visessanguan, C. Srivilai, 2001. Porcine plasma proteins as gel enhancer print bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) surimi. *Journal of Food Biochemistry*, 25 (4): 285-305.
- Chan J. K., T. A. Gill, A. T. Paulson, 1992. Cross-linking of myosin heavy chains from cod, herring and silver hake during thermal setting. *Journal of Food Science*, 57 (4): 906-912.
- Đào Trọng Hiếu, 2010. Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất chả cá Thát Lát. Bản tin quý số 18 - Tháng 10/2010. Viện Nghiên cứu Thủy sản.
- FISNET, 2012. <http://www.fistenet.gov.vn/marine-capture-fisheries/program-of-fisheries-resources-conservation-by-the-year-2020-approved/>(22/05/2012).
- Hirakawa H., N. Kamiya, T. Tanaka, T. Nagamune, 2007. Intramolecular electron transfer in a cytochrome P450cam system with a site-specific branched structure. *Protein Engineering Design and Selection*, 20: 453-459.
- Hossain M. I., Y. Itoh, K. Morioka, A. Obatake, 2001. Inhibiting effect of polymerization and degradation of myosin heavy chain during preheating at 30°C and 50°C on the gel-forming ability of walleye pollock surimi. *Fisheries Science*, 67: 718-725.
- Itoh Y., R. Yoshinaka, S. Ikeda, 1980. Formation of polymeric molecules of protein resulting from intermolecular SS bonds formed during the gel formation of carp actomyosin by heating (in Japanese with English abstract). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 46: 621-624.
- Kamath G. G., T. C. Lanier, E. A. Foegeding, D. D. Hamann, 1992. Nondisulfide covalent cross-linking myosin heavy chain of print setting of Alaska pollock and Atlantic croaker surimi. *The Journal of Food Biochemistry*, 16 (2): 151-172.
- Kimura I. M., M. Sugimoto, K. Toyoda, N. Seki, K. Arai, T. Fugita, 1991. A study on the cross-links reaction of myosin in kamaboko “suwari” gels. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(8): 1386-1396.
- Lanier T. C., 1992. Measurement of surimi composition and functional properties. In: T. C. Lanier & C. M. Lee (Eds.). *Surimi technology* (pp. 123-166). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Fan, R. J. Randall, 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 256-275.
- Matsuoka Y., J. Wan, H. Ushio, S. Watabe, 2014. Thermal gelation properties of white croaker, walleye pollock and deepsea bonefish surimi after suwari treatment at various temperature. *Fisheries Science*, 79: 715-724.
- Morales O. G., J. A. Ramirez, D. I. Vivanco, M. Vazquez, 2001. Surimi of fish species from the gulf of Mexico: evaluation of the setting phenomenon. *Food Chemistry*, 75 (1): 43-48
- Nguyen Van Muoi, Dang Thi Thao Nguyen, 2012. Apply gel properties of protein in processing fish ball from abundant raw material in Mekong

- data: Pangas catfish (*Pangasius Hypophthalmus*). Can Tho University, 5: 105-114.
- Numakura T., N. Seki, I. Kimura, K. Toyoda, T. Fugita, K. Takama, K. Arai, 1985. Cross-linking reaction of myosin in the fish paste during setting (suwari). Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Scientific, 51 (9): 1559-1565.
- Samejima K., M. Ishioroshi, T. Yasui, 1981. Relative roles of the head and tail portions of the molecule in heat-induced gelation of myosin. Journal of Food Science, 46 (5): 1412-1418.
- Sano T., F. Noguchi, T. Tsuchiya, J. Matsumoto, 1988. Dynamic viscoelastic behavior of natural actomyosin and myosin during thermal gelation. Journal of Food Science, 53: 924-928.
- Seki N., H. Uno, N. H. Lee, I. Kimura, K. Toyoda, T. Fujita, K. Arai, 1990. Transglutaminase activity in Alaska pollack muscle and surimi and its reaction with myosin B. Nippon Suisan Gakkaishi, 56:125-132.
- Shimizu Y., R. Machida, S. Takenami, 1981. Species variations in the gel forming characteristics of fish meat paste (in Japanese with English abstract). Nippon Suisan Gakkaishi, 47: 95-104.
- Soottawat B., C. Chakkawat, V. Wonnop, 2003. Effect of medium temperature setting on gelling characteristics of surimi from some tropical fish. Food Chemistry, 82: 567-574.
- Yasui T., M. Ishioroshi, K. Samejima, 1980. Heat-induced gelation of myosin in the presence of actin. Journal of Food Biochemistry, 4: 61-78.
- Wan J., I. Kimura, M. Satake, N. Seki, 1994. Effect of calcium ion concentration on the gelling properties and transglutaminase activity of walleye pollack surimi paste. Fisheries Science, 60: 107-113.
- Weber K. and M. Osborn, 1969. The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. Journal Biology Chemistry, 244: 4406-4412.