

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN THỦY PHÂN PROTEIN TÁCH CHIẾT TỪ THỊT SẴM CÁ NGỪ VÂY VÀNG (*THUNNUS ALBACARES*) BẰNG ENZYME ALCALASE ĐẾN HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HOÁ CỦA DỊCH THỦY PHÂN

Nguyễn Trọng Bách¹, Đinh Thị Huyền Trang², Nguyễn Hồng Ngân¹,
Nguyễn Thị Kim Cúc², Nguyễn Bảo¹, Huỳnh Nguyễn Duy Bảo¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm đánh giá ảnh hưởng của một số điều kiện thủy phân (pH, nhiệt độ, tỷ lệ enzyme/cơ chất (E/S)) protein chiết tách từ cơ thịt sẫm cá ngừ vây vàng (DMPI) bằng enzyme Alcalase đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân. Kết quả thu được cho thấy các thông số của quá trình thủy phân ảnh hưởng đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân. Tỷ lệ E/S cao hoặc thời gian thủy phân kéo dài sẽ tạo ra nhiều phân đoạn peptit mạch ngắn cũng như axit amin làm mất hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân. Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy điều kiện thủy phân ở pH = 8, tỷ lệ E/S = 1%, 55°C và 3 giờ thủy phân là thích hợp để thủy phân DMPI thu được dịch thủy phân có hoạt tính chống oxy hóa cao.

Từ khóa: Hoạt tính chống oxy hoá, DPPH, tổng năng lực khử, dịch thủy phân, thịt sẫm cá ngừ, enzyme Alcalase.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Quá trình chế biến các sản phẩm từ cá ngừ thải ra một lượng phế liệu chiếm khoảng 40 - 60% khối lượng nguyên liệu ban đầu. Trong đó, phần cơ thịt sẫm chiếm khoảng 15% tổng lượng phế liệu, đây là phần phụ phẩm có hàm lượng protein lên tới 26 - 28%. Nguồn nguyên liệu này chủ yếu được dùng để sản xuất thức ăn chăn nuôi do giá trị cảm quan về màu sắc thấp. Một trong số các ứng dụng để nâng cao giá trị là dùng enzyme protease thủy phân nguồn protein này. Sản phẩm protein thủy phân bằng enzyme thì ngoài giá trị dinh dưỡng cao còn có các hoạt tính chống oxy hoá, kháng vi sinh vật và điều hoà huyết áp (Godinho và cộng sự, 2016; Nalinanon và cộng sự, 2011; Parvathy và cộng sự, 2016). Hoạt tính sinh học của sản phẩm thủy phân phụ thuộc vào khối lượng phân tử của peptit, thành phần axit amin và trình tự sắp xếp các axit amin trong chuỗi peptit (Chi và cộng sự, 2015; Hsu, 2010) do loại enzyme, hay điều kiện thủy phân (pH, tỷ lệ enzyme, nhiệt độ và thời gian) quyết định.

Hiện tại, các nghiên cứu sử dụng enzyme Alcalase để thủy phân trực tiếp nguồn protein từ phế

liệu thủy sản chủ yếu xác định ảnh hưởng chế độ thủy phân đến tỷ lệ thu hồi protein cũng như độ thủy phân và phân tích các tính chất hóa lý của dịch thủy phân (Guérard và cộng sự, 2001; Guérard và cộng sự, 2002; Raftani và cộng sự, 2020) mà chưa tập trung vào phân tích hoạt tính sinh học của chúng. Việc tạo ra nguồn protein isolate (PI) - protein phân lập từ thịt sẫm cá ngừ đã loại bỏ hầu hết những tạp chất phi protein cũng như protein hòa tan làm cơ chất cho quá trình thủy phân sẽ tạo điều kiện cho enzyme Alcalase tấn công vào cắt mạch peptit để tạo thành các phân đoạn peptit có hoạt tính sinh học cũng như độ tinh sạch cao.

Mục đích của nghiên cứu này là xem xét ảnh hưởng của điều kiện thủy phân và chọn các thông số pH, nhiệt độ và tỷ lệ E/S thích hợp cho quá trình thủy phân PI bằng enzyme Alcalase để thu dịch thủy phân có hoạt tính chống oxy hoá cao nhằm nâng cao giá trị sử dụng, giá trị kinh tế cho phần cơ thịt sẫm của cá ngừ trong chuỗi khai thác và chế biến sản phẩm thủy sản từ cá ngừ.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

2.1.1. Nguyên vật liệu liệu

Cơ thịt sẫm cá ngừ được cung cấp bởi Tập đoàn Hải Vương, Việt Nam. Mỗi block cơ thịt sẫm cá ngừ có khối lượng 5 kg được đựng trong túi PA chân

¹ Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

² Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang

Email: ntbachnt@ntu.edu.vn

không. Các block được làm đông ở nhiệt độ -45°C đến khi nhiệt độ tại tâm block đạt -18°C sau đó bảo quản ở nhiệt độ $-20^{\circ}\text{C} \pm 2$. Block thịt sẫm được đựng trong thùng xốp và vận chuyển nhanh về phòng thí nghiệm bằng xe lạnh ở nhiệt độ -20°C và về phòng thí nghiệm tiếp tục được đưa ngay vào kho bảo quản ở $-20^{\circ}\text{C} \pm 2$ đến khi được sử dụng để tách chiết phân lập DMPI (Dark Muscle Protein Isolate).

Protein dùng làm nguyên liệu để thủy phân trong nghiên cứu này được phân lập từ cơ thịt sẫm cá ngừ vây vàng bằng phương pháp điều chỉnh pH được mô tả bởi Undeland và cộng sự (Undeland và cộng sự, 2002) với một vài thay đổi nhỏ. Cơ thịt sẫm cá ngừ đông lạnh được cắt thành các miếng hình khối chữ nhật có kích thước ($3 \times 10 \times 3 \text{ cm}$), được xay nhỏ bằng máy xay thịt với kích thước mắt sàng là $2,5 \text{ mm}$. Thịt sẫm xay nhỏ được rửa 2 lần bằng nước lạnh (khoảng 4°C) với tỷ lệ nước rửa/nguyên liệu là $3/1$. Sau khi rửa, thịt cá được đựng trong các túi lọc có kích cỡ mắt lỗ là $50 \mu\text{m}$ để ép tách nước. Phần cơ thịt sau khi rửa được đông hóa trong 2 phút ở tốc độ 3500 vòng/phút bằng thiết bị đông hóa (model: IKA T18). Hỗn hợp sau khi đông hóa được hòa tan trong môi trường kiềm pH $=12$ (dùng NaOH 2N). Hỗn hợp được lắc liên tục trong 3 giờ bằng máy lắc (model: NB-101M). Tiếp theo, hỗn hợp được lọc bằng túi lọc có kích cỡ mắt lỗ $5 \mu\text{m}$. Protein hòa tan được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 30 phút (MF600, Labentech Co., Ltd.). Sau khi ly tâm, protein trong phần nổi phía trên được kết tủa tại điểm đẳng điện $\text{pI}=5,5$ bằng cách dùng HCl 2N . Protein kết tủa (DMPI) được lọc bằng túi lọc có kích thước mắt lỗ $5 \mu\text{m}$ và rửa loại bỏ muối bằng nước lạnh (4°C) cho đến khi trung tính. DMPI được đựng trong túi PA hút chân không có khối lượng 100 gram , sau đó DMPI được cấp đông và bảo quản ở $-20^{\circ}\text{C} \pm 2$ để phục vụ nghiên cứu.

2.1.2. Hóa chất

Enzyme sử dụng trong nghiên cứu là Alcalase 2.4L FG (Novozymes, Đan Mạch).

Hóa chất dùng để chiết tách DMPI của Xilong Scientific; hóa chất của Hãng Sigma-Aldrich, Merck và Fisher được sử dụng trong nghiên cứu phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thủy phân DMPI bằng enzyme Alcalase

DMPI ở trạng thái đông lạnh được rã đông qua đêm trong ngăn mát tủ lạnh, sau đó được thủy phân

bằng enzyme Alcalase 2.4L với các thông số của quá trình thủy phân như sau: cố định tỷ lệ dung dịch đệm phosphate so với nguyên liệu $3:2$ (w:w) và hai trong ba yếu tố (tỷ lệ enzyme $0,75\%$, nhiệt độ 55°C và thời gian 3 giờ thủy phân) để nghiên cứu ảnh hưởng của pH thủy phân (6; 7; 8; 9; 10; 11); nhiệt độ thủy phân (45 ; 50 ; 55 ; 60 ; 65 ; 70°C); và tỷ lệ enzyme so với nguyên liệu ($0,25$; $0,5$; $0,75$; 1 ; $1,25$; $1,5\%$ và 2%). Sau khi thủy phân tiến hành bất hoạt enzyme ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 15 phút. Hỗn hợp sau khi thủy phân được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 30 phút để tách riêng phần dịch thủy phân và phần cặn. Phần dịch thủy phân được tách ra được ly tâm lạnh lần hai (trong ống eppendorf $1,5 \text{ ml}$) với tốc độ 10000 vòng/phút trong 30 phút để tách triệt để phần cặn còn lẫn sau tách ở lần ly tâm thứ nhất.

Dịch thủy phân thu được tiến hành xác định các chỉ tiêu như độ thủy phân; tỷ lệ thu hồi protein; hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử quy tương đương Vitamin C.

2.2.2. Các phương pháp phân tích

2.2.2.1. Tỷ lệ thu hồi protein

Tỷ lệ thu hồi protein của quá trình thủy phân được xác định theo công thức:

Tỷ lệ thu hồi protein (%) = $\frac{[\text{Lượng protein trong dịch thủy phân (g)}]}{[\text{Lượng protein trong MDPI trước thủy phân (g)}]} \times 100$.

Hàm lượng protein của dịch thủy phân được phân tích theo phương pháp của Lowry (Lowry và cộng sự, 1951). Hàm lượng protein của DMPI được xác định theo phương pháp Kjeldahl ($\text{Nx}6,25$).

2.2.2.2. Độ thủy phân

Độ thủy phân được xác định theo phương pháp DNFB như được mô tả bởi Nguyen và cộng sự (2011).

2.2.2.3. Hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hoá của dịch thủy phân FPI được đánh giá dựa vào khả năng khử gốc tự do DPPH được thực hiện theo phương pháp của Fu và cộng sự (2001); và tổng năng lực khử được xác định theo phương pháp của Oyaizu (1986).

2.2.2.4. Phương pháp điện di (SDS-Page)

Dịch thủy phân chứa các peptit có hoạt tính chống oxy hoá được phân tích bằng phương pháp điện di Triscine-SDS-PAGE theo quy trình đã cải tiến của Syed R. Haider và cộng sự (2012). Các mẫu chứa

peptit được hòa với dung dịch 2X sample buffer (100 mM Tris-Cl (6,8); 1% (w/v) SDS; 4% (v/v) 2-mercaptoethanol; 0,02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 24% glycerol) với tỷ lệ 1:1 (v/v), sau đó được biến tính ở 90°C trong 5 phút và tiến hành phân tách trên gel polyacrylamide 15%. Cả gel phân tích (15%) và gel gom (4%) đều được pha trong dung dịch đệm 2,5 M Tris-HCl (pH 8,8). Quá trình điện di được thực hiện trên thiết bị Mini Protein II unit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA, USA) ở 150V cho mỗi gel trong dung dịch điện di có chứa 25 mM Tris, 25 mM Tricine và 0,05 (w/v) SDS. Sau khi điện di kết thúc, gel được nhuộm trong dung dịch có chứa 0,03% Coomassie Blue R250 pha trong 10% (v/v) axit axetic và rửa nhuộm trong dung dịch 10% (v/v) axit axetic. Khối lượng phân tử của các peptit được xác định dựa trên thang chuẩn protein (Invitrogen, USA).

2.3. Phân tích dữ liệu

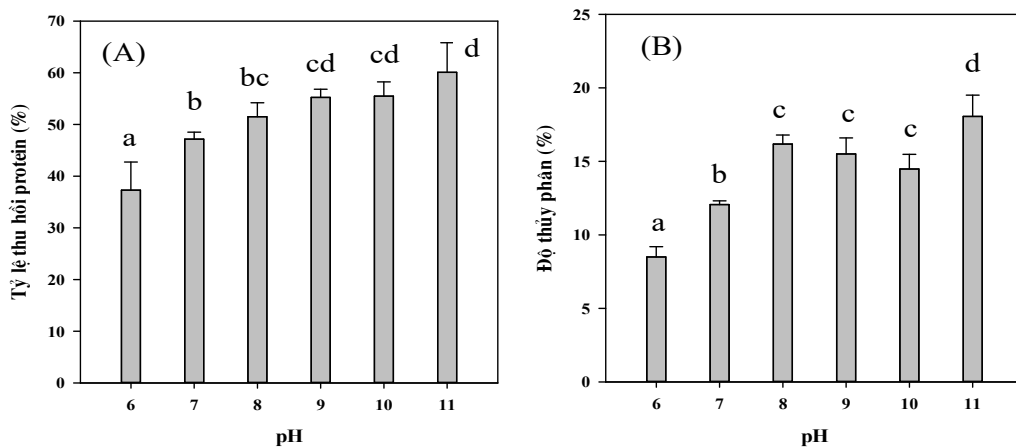
Số liệu trình bày trong bài báo này là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm. Tính giá trị trung bình sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2013, vẽ

biểu đồ sử dụng phần mềm Sigmaplot 12. Sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$) của các giá trị trung bình được phân tích bằng phần mềm SPSS 16.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của pH thủy phân đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân

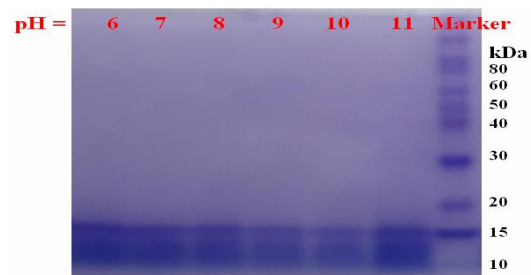
Kết quả nghiên cứu cho thấy khi tăng pH thủy phân trong khoảng pH 6 - 8 tỷ lệ thu hồi protein và độ thủy phân tăng; tăng lần lượt từ 37,3% lên 51,5% (Hình 1A) và từ 8,5% lên 16,2% (Hình 1B). Điều này có thể là do vùng pH tối ưu của enzyme Alcalase, hoạt động thủy phân tăng làm tăng hiệu quả thủy phân. Nếu tiếp tục tăng pH thủy phân từ 9-10 thì tỷ lệ thu hồi tăng nhưng độ thủy phân không tăng cho thấy khi pH thủy phân cao hơn pH thích hợp của enzyme sẽ ảnh hưởng đến mức độ ion hóa cơ chất và độ bền của enzym nên làm giảm khả năng hoạt động của enzym từ đó làm giảm tốc độ của quá trình thủy phân (Nguyễn Đức Lượng và cộng sự, 2004).



Hình 1. Tỷ lệ thu hồi protein (A) và độ thủy phân (B) tại các pH khác nhau

Các giá trị có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

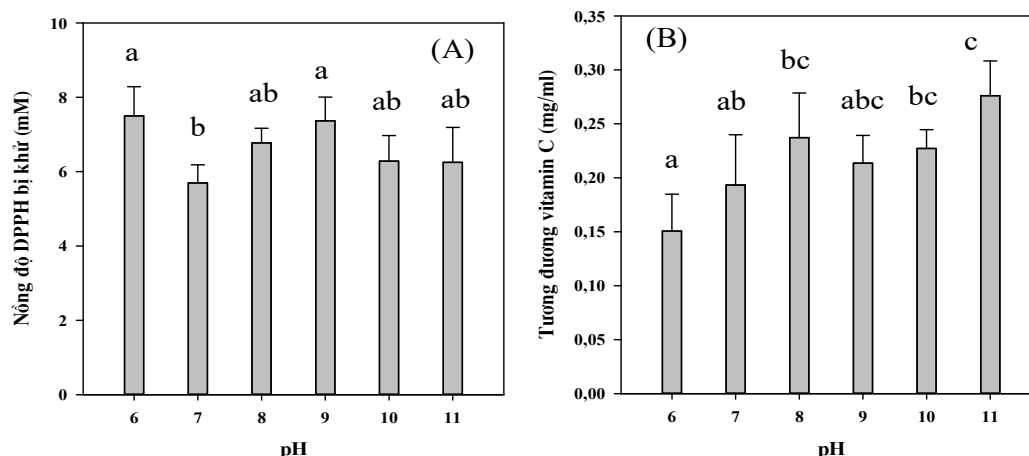
Mặc dù tỷ lệ thu hồi và độ thủy phân khác nhau nhưng các band peptit dưới 15 kDa được quan sát tương tự ở các pH khác nhau (Hình 2), do đó quá trình thủy phân DMPI đã chuyển qua phân đoạn peptit có khối lượng phân tử nhỏ có hoạt tính chống oxy hóa thể hiện thông qua hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử được trình bày ở hình 3. Kết quả các phân đoạn peptit tạo thành có khối lượng phân tử trong khoảng 10-15 kDa tương tự với nghiên cứu của nhóm tác giả Bui Xuan và cộng sự (2021).



Hình 2. Kết quả điện di của dịch thủy phân ở các pH thủy phân khác nhau

Trong khoảng pH nghiên cứu (6-11) thì hoạt tính khử gốc tự do DPPH của dịch thủy phân thay đổi không đáng kể, trong đó tổng năng lực khử của dịch thủy phân có sự tăng nhẹ khi pH của môi trường thủy phân tăng (Hình 3A, B). Khi pH thủy phân càng cao thì hàm lượng cặn có kích thước nhỏ và mịn càng nhiều gây khó khăn cho quá trình tách, ly tâm; đồng thời sản phẩm thủy phân ở các pH thủy phân cao

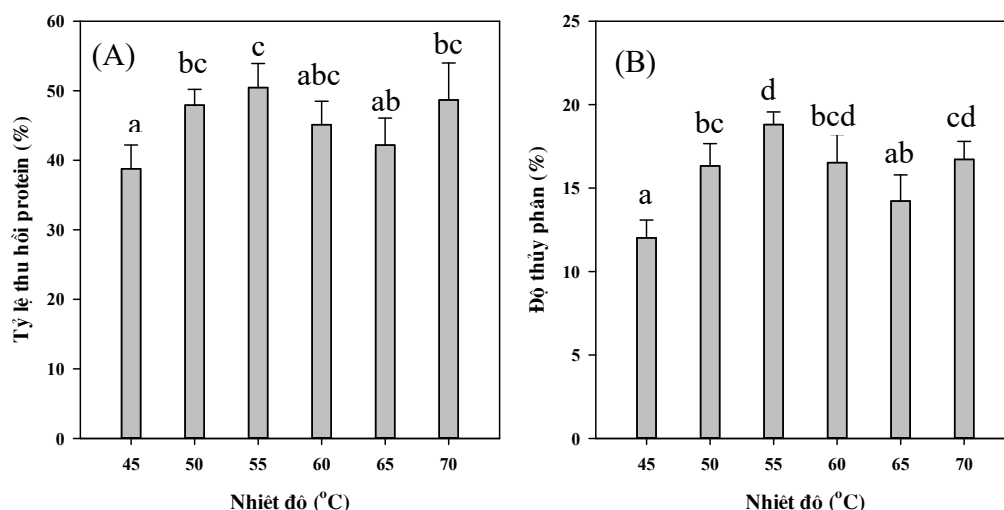
phải được trung hòa bằng axit về pH trung tính làm tăng thêm chi phí cho quá trình sản xuất. Tại pH=6 và 7, tỷ lệ thu hồi protein, độ thủy phân và tổng năng lực khử thấp không đạt được các mục tiêu của quá trình thủy phân. Vì vậy, pH= 8 được chọn là pH thủy phân thích hợp để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3. Hoạt tính khử gốc tự do DPPH (A) và tổng năng lực khử (B) tại các pH thủy phân khác nhau

Các giá trị có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến hoạt tính chống oxy hoá của dịch thủy phân



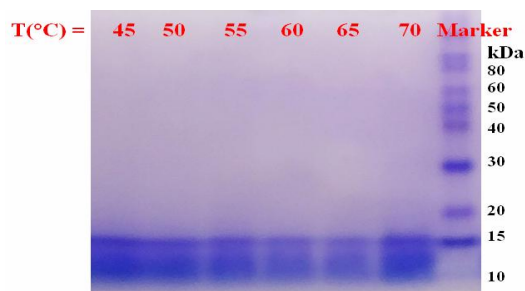
Hình 4. Tỷ lệ thu hồi protein (A) và độ thủy phân (B) tại các nhiệt độ thủy phân

Các giá trị có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Khi tăng nhiệt độ thủy phân từ 45-55°C thì tốc độ phản ứng thủy phân bởi enzyme cũng tăng lên do các phân tử enzyme có động năng lớn hơn, vận tốc di

chuyển tăng lên làm tăng khả năng tiếp xúc giữa enzyme Alcalase và cơ chất MDPI, vì thế mà quá trình thủy phân diễn ra nhanh hơn, hiệu suất thủy

phân độ thủy phân đều tăng và đạt cực đại tại nhiệt độ thủy phân 55°C (Hình 4). Sau đó khi tăng nhiệt độ trên 55°C thì tỷ lệ thu hồi protein và độ thủy phân giảm do khi nhiệt độ cao hơn nhiệt độ tối ưu, hoạt tính của enzyme sẽ bị giảm và tốc độ phản ứng thủy phân giảm (Nguyễn Đức Lượng và cộng sự, 2004).

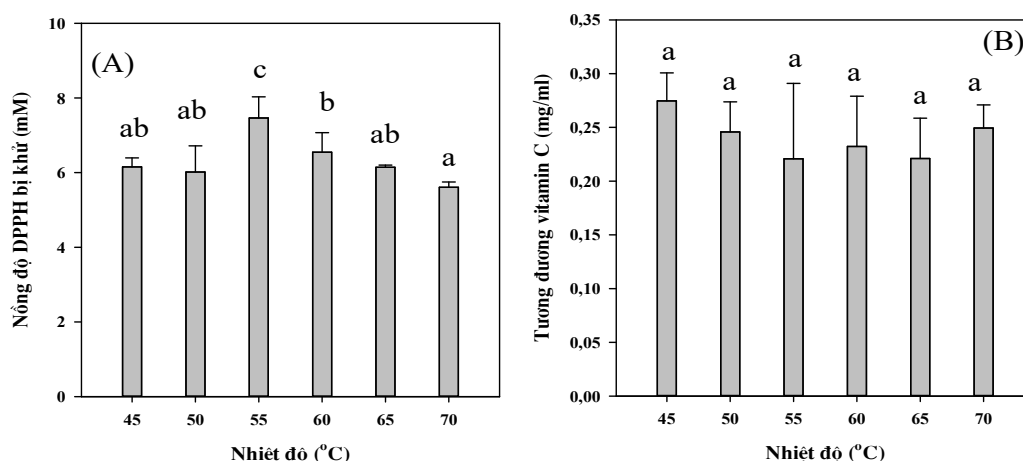


Hình 5. Kết quả điện di của dịch thủy phân ở các nhiệt độ thủy phân khác nhau

Tương tự ảnh hưởng của pH, tại các nhiệt độ thủy phân khác nhau, các band protein trong các

giếng hiện diện chủ yếu ở band dưới 15 kDa (Hình 5).

Hình 6 cho thấy hoạt tính khử gốc tự do DPPH của dịch thủy phân không có sự khác biệt đáng kể ở nhiệt độ thủy phân 45 và 50°C. Khi tăng nhiệt độ thủy phân lên 55°C thì nồng độ DPPH bị khử của dịch thủy phân tăng từ 6 mM protein tại 50°C lên 7,5 mM tại 55°C (Hình 6A). Tuy nhiên, hoạt tính giảm mạnh xuống 5,6 mM khi nhiệt độ thủy phân tăng lên 70°C. Trong khi đó, tổng năng lực khử tương đương vitamin C có giá trị cao nhất là 0,318 mg/ml tại 45°C và giảm xuống còn 0,254 mg/ml tại 55°C và không có sự khác biệt tại các nhiệt độ thủy phân cao hơn (Hình 6B). Điều này có thể giải thích là do khi nhiệt độ tăng vận tốc phản ứng thủy phân tăng, một số peptit có hoạt tính khử bị thủy phân sâu thành các peptit có mạch ngắn hơn và các axit amin tự do làm cho tổng năng lực khử giảm.



Hình 6. Hoạt tính khử gốc tự do DPPH (A) và tổng năng lực khử (B) tại các nhiệt độ thủy phân

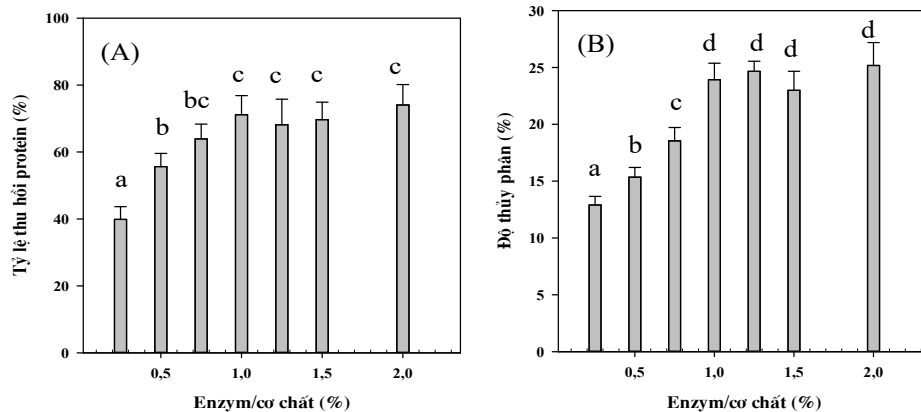
Các giá trị có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Từ các kết quả đánh giá tỷ lệ thu hồi protein, độ thủy phân, hoạt tính chống oxy hoá của dịch thủy phân; chọn nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân là 55°C để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme/cơ chất (E/S) đến hoạt tính chống oxy hoá của dịch thủy phân

Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme/cơ chất (E/S) đến tỷ lệ thu hồi protein, độ thủy phân cũng như hoạt tính chống oxy hoá của dịch thủy phân. Tỷ lệ thu hồi protein và độ thủy phân tăng mạnh lần lượt là 1,8 lần (Hình 7A) và 1,9 lần (Hình 7B) ở các tỷ lệ E/S từ

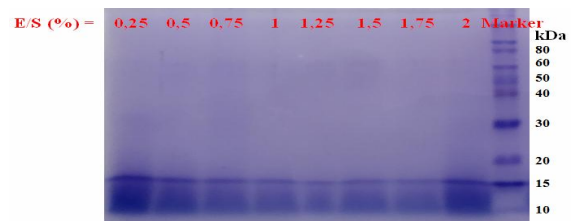
0,25-1%. Ở tỷ lệ E/S trên 1% không có sự thay đổi lớn về tỷ lệ thu hồi cũng như độ thủy phân, do mật độ enzyme tiếp xúc với cơ chất tăng lên làm cắt đứt nhiều liên kết peptit hơn, tuy vậy nếu tỷ lệ enzyme và cơ chất đạt trạng thái bão hòa, các liên kết peptit bị thủy phân ít dần; dịch thủy phân phần lớn là các peptit có khối lượng phân tử thấp hòa tan trong hỗn hợp phản ứng làm giảm cả độ thủy phân và hiệu suất thủy phân. Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây (Guérard và cộng sự (2001); Ramakrishnan (2013); Bougatef và cộng sự (2012); Ambigaipalan và cộng sự (2015)).



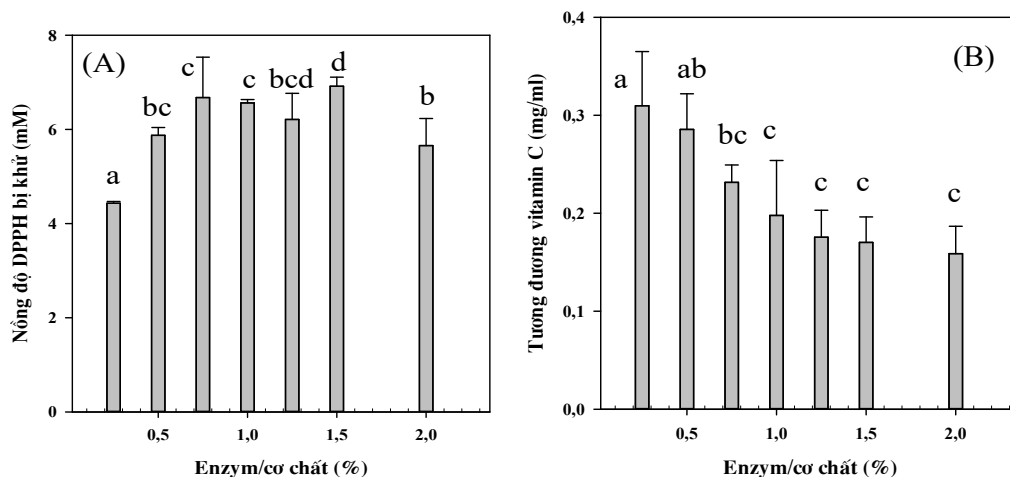
Hình 7. Tỷ lệ thu hồi protein (A) và độ thủy phân (B) ở các tỷ lệ E/S khác nhau

Các giá trị có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme/cơ chất làm thay đổi hiệu suất thủy phân, nhưng tính trên một đơn vị nồng độ protein trong dịch thủy phân thì kết quả phân tích điện di SDS-Page cho thấy dịch thủy phân tại các tỷ lệ E/S khác nhau chứa chủ yếu các phân đoạn peptit có khối lượng phân tử dưới 15 kDa (Hình 8).



Hình 8. Kết quả điện di của dịch thủy phân ở các tỷ lệ enzyme/FPI (E/S) khác nhau



Hình 9. Hoạt tính khử gốc tự do DPPH (A) và tổng năng lực khử (B) ở các tỷ lệ E/S khác nhau

Các giá trị có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Khi tăng tỷ lệ enzyme bổ sung từ 0,25-0,75% so với nguyên liệu thì hoạt tính khử gốc tự do DPPH của dịch thủy phân thông qua nồng độ DPPH bị khử tăng từ 4,4 mM lên 6,7 mM. Trong khoảng tăng tỷ lệ E/S từ 0,75-1,5% thì hoạt tính khử gốc tự do DPPH của dịch thủy phân tăng không đáng kể (Hình 9A).

Tại tỷ lệ 2%, hoạt tính khử gốc tự do DPPH giảm nhẹ nhưng độ thủy phân và tỷ lệ thu hồi đạt giá trị cao nhất tương ứng là 25,2% và 74,1%; điều này có thể được giải thích là do tỷ lệ enzyme bổ sung cao nên các liên kết peptit bị cắt đứt nhiều, giải phóng nhiều các peptit ngắn mạch và axit amin làm tăng hiệu quả

thủy phân, nhưng đồng thời nhiều peptit sẽ bị thủy phân thành peptit mạch ngắn hơn và axit amin làm giảm hoạt tính khử gốc tự do DPPH của dịch thủy phân. Trong khi đó tổng năng lực khử của dịch thủy phân giảm dần khi tăng tỷ lệ E/S, tổng năng lực khử giảm xấp xỉ 2 lần khi tỷ lệ E/S tăng gần 2 lần (Hình 9B). Nguyên nhân là do khi tăng tỷ lệ enzyme bổ sung thì mức độ tiếp xúc giữa enzyme và nguyên liệu tăng làm tăng sự phân cắt các liên kết peptit, bên cạnh đó các peptit có hoạt tính sinh học tạo ra trong quá trình thủy phân lại tiếp tục bị thủy phân thành các mạch ngắn hơn và axit amin tự do làm giảm tổng năng lực khử của dịch thủy phân tại các điều kiện thủy phân với tỷ lệ E/S cao.

Như vậy, khi dùng tỷ lệ E/S quá cao tỷ lệ thu hồi protein, độ thủy phân và hoạt tính khử gốc tự do DPPH tăng không đáng kể; trong khi đó tổng năng lực khử của dịch thủy phân giảm đáng kể. Ngoài ra, việc tăng tỷ lệ enzyme bổ sung còn làm tăng đáng kể chi phí của quá trình thủy phân. Vì vậy, tỷ lệ enzyme bổ sung là 1% so với nguyên liệu thu dịch thủy phân có hoạt tính chống oxy hóa khá tốt.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Protein tách chiết từ cơ thịt sẫm cá ngừ vây vàng có thể là nguồn protein tiềm năng để sản xuất các peptit có hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp sinh học dùng enzyme Alcalase. Điều kiện thủy phân ảnh hưởng tới hiệu quả thu hồi protein, độ thủy phân và hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân. Hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân DMPI cao ở pH 8, nhiệt độ thủy phân 55°C, tỷ lệ enzyme Alcalase bổ sung 1% và thời gian thủy phân 3 giờ. Các phân đoạn peptit có phân tử lượng lớn (10-15 kDa) có hoạt tính tốt hơn các phân đoạn ngắn (dưới 10 kDa) và axit amin. Tuy vậy, để làm rõ nhóm phân đoạn peptit nào có hoạt tính chống oxy hóa tốt cần có những nghiên cứu dùng kỹ thuật cut-off tách riêng rẽ từng phân đoạn peptit trước khi đi thử hoạt tính của chúng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.99-2018.42. Chúng tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới Nguyễn Thị Anh Kỳ, Trần Thị Thủy Vân, Nguyễn Bảo Thoa và Phạm Thị Thanh Hà đã giúp đỡ trong việc chuẩn bị mẫu thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ambigaipalan, Priyatharini, Abdulrahman S. Al-Khalifa and Fereidoon Shahidi, 2015. Antioxidant and Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activities of Date Seed Protein Hydrolysates Prepared Using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods* 18: 1125–37.
2. Bougatef, Ali, Rafik Balti, Anissa Haddar, Kemel Jellouli, Nabil Souissi, and Moncef Nasri, 2012. Protein Hydrolysates from Bluefin Tuna (*Thunnus Thynnus*) Heads as Influenced by the Extent of Enzymatic Hydrolysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17 (4): 841–52.
3. Bui Xuan, Dong, Tuan Vo Cong, Cuong Bui Viet, My Pham Thi, Hien Bui Thi Thu, Toan Nguyen-Sy, Phuong Nguyen Thi Dong, Wayne Chew Kit, Mukatova M. D., and Loke Show Pau, 2021. Optimization of Production Parameters of Fish Protein Hydrolysate from Sarda Orientalis Black Muscle (by-Product) Using Protease Enzyme. *Clean Technologies and Environmental Policy* 23 (1): 31–40.
4. Chi, Chang Feng, Fa Yuan Hu, Bin Wang, Zhong Rui Li and Hong Yu Luo, 2015. Influence of Amino Acid Compositions and Peptide Profiles on Antioxidant Capacities of Two Protein Hydrolysates from Skipjack Tuna (*Katsuwonus Pelamis*) Dark Muscle. *Marine Drugs* 13 (5): 2580–2601.
5. Fu, Hui-Yin, Den-En Shieh, and Chi-Tang Ho, 2001. Antioxidant and Free Radial Scavenging Activities of Edible Mushrooms. *Journal of Food Lipids* 9 (2002): 35–46.
6. Godinho, I., C. Pires, S. Pedro, B. Teixeira, R. Mendes, M. L. Nunes, and I. Batista, 2016. Antioxidant Properties of Fish Protein Hydrolysates Prepared from Cod Protein Hydrolysate by *Bacillus* Sp.. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 178 (6): 1095–1112.
7. Guérard, F., L. Dufossé, D. De La Broise, and A. Binet, 2001. Enzymatic Hydrolysis of Proteins from Yellowfin Tuna (*Thunnus Albacares*) Wastes Using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* 11 (4–6): 1051–59.
8. Hsu, Kuo Chiang, 2010. Purification of Antioxidative Peptides Prepared from Enzymatic

Hydrolysates of Tuna Dark Muscle By-Product. Food Chemistry 122 (1): 42–48.

9. Lowry, Oliver H., and Rose J. Randall, 1951. Protein Measurement Byt the Folin Reagent. The Journal of Biological Chemistry 193 (1): 265–75.

10. Nalinanon, Sitthipong, Soottawat Benjakul, Hideki Kishimura, and Fereidoon Shahidi, 2011. Functionalities and Antioxidant Properties of Protein Hydrolysates from the Muscle of Ornate Threadfin Bream Treated with Pepsin from Skipjack Tuna. Food Chemistry 124 (4): 1354–62.

11. Nguyen Duc Luong, Cao Cuong, Nguyen Anh Tuyet, Le Thi Thuy Tien, Ta Thu Hang, Huynh Ngoc Oanh, Nguyen Thuy Huong, Phan Thi Huyen, 2004. Enzymatic Technology (Bản gốc tiếng Việt). Publisher of Vietnam National University, Ho Chi Minh city.

12. Nguyen, Thi My Huong, Khalifa Serigne, Babacar Sylla, Zo Randriamahatody, Clair Donnay-moreno, Jacques Moreau, and Luyen Thi Tran, 2011. Enzymatic Hydrolysis of Yellowfin Tuna (*Thunnus Albacares*) By-Products Using Protamex Protease. Food Technology and Biotechnology 9862(1): 48–55.

13. Oyaizu, Makoto, 1986. Studies on Products of Browning Reaction. Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics 44 (6): 307–15.

14. Parvathy, U, A A Zynudheen, S K Panda, A Jeyakumari, and R Anandan, 2016. Extraction of Protein from Yellowfin Tuna (*Thunnus Albacares*) Waste by Enzymatic Hydrolysis and Its Characterization. Fishery Technology 53 (2): 115–24.

15. Ramakrishnan, V. V, 2013. Extraction of Proteins from Mackerel Fish Processing Waste Using Alcalase Enzyme. Journal of Bioprocessing & Biotechniques 03 (02).

16. Syed R. Haider , Helen J. Reid, and Barry L. Sharp, 2012. Chapter 8. Tricine-SDS-PAGE (Protein Electrophoresis: Methods and Protocols). Methods in Molecular Biology 869.

17. Undeland, Ingri, D. Kelleher Stephen and O. Hultin Herbert, 2002. Recovery of Functional Proteins from Herring (*Clupea Harengus*) Light Muscle by an Acid or Alkaline Solubilization Process. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50 (25): 7371–79.

EFFECT OF HYDROLYSE CONDITIONS IN PROTEIN ISOLATE EXTRACTED FROM YELLOWFIN (*THUNNUS ALBACARES*) DARK MUSCLE USING ALCALASE ON ANTIOXIDANT PROPERTIES OF PROTEIN HYDROLYSATE

Nguyen Trong Bach, Dinh Thi Huyen Trang, Nguyen Hong Ngan,
Nguyen Thi Kim Cuc, Nguyen Bao, Huynh Nguyen Duy Bao

Summary

This study evaluated the effect of hydrolyse conditions (pH, temperature, Alcalase to substrate ratio (E/S)) on antioxidant properties of protein hydrolysates extracted from yellowfin tuna dark muscle (DMPI). The obtained results showed that the parameters of the hydrolysis process affected the antioxidant activity of the hydrolysate. High E/S ratio or prolonged hydrolysis time will produce many short-chain peptides as well as amino acids which will lose the antioxidant activities of the hydrolysate. The study found that hydrolysis conditions at pH = 8, E/S ratio = 1%, 55°C and 3 hours were suitable for hydrolysing DMPI to obtain hydrolysate with high antioxidant activities.

Keywords: Antioxidant property, DPPH, total reducing power, hydrolysate, tuna dark muscle, enzyme Alcalase.

Người phản biện: TS. Đỗ Văn Nam

Ngày nhận bài: 21/5/2021

Ngày thông qua phản biện: 21/6/2021

Ngày duyệt đăng: 28/6/2021