

NGHIÊN CỨU THU NHẬN DỊCH CHIẾT GIÀU ACID AMIN TỪ NHỘNG TẦM BẰNG ENZYM

EXTRACTION OF HIGHLY AMINO ACID LIQUID FROM SILKWORM PUPAE BY ENZYME

*Vũ Kim Thoa, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Thu Hiền**

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 04/03/2022

Ngày nhận kết quả phản biện đánh giá: 05/09/2022

Ngày bài báo được duyệt đăng: 29/09/2022

Tóm tắt: Pluriamin là hỗn hợp acid amin tự nhiên thu được chiết xuất từ nhộng tằm khô. Trong hỗn hợp đó gồm nhiều acid amin thiết yếu quan trọng như leucin, isoleucin, lysin, threonin, cystein, ... Pluriamin cung cấp acid amin cần thiết cho cơ thể, giúp tăng cường thể trạng. Giá trị dinh dưỡng của protein được quyết định bởi mối quan hệ về số lượng và chất lượng của các acid amin khác nhau trong protein đó các acid amin có đặc tính thúc đẩy phát triển của cơ thể như: arginin, tryptophan, acid glutamic, prolin, cystein, serin, tysosin. Các acid amin thiết yếu đối với cơ thể là: Methionin, lysin, tryptophan, phenylalanin, leucin, isoleucin, threonin, valin. Trong nghiên cứu này, các acid amin từ nhộng tằm được chiết xuất bằng phương pháp sử dụng enzyme protease nhằm thu nhận hỗn hợp acid amin và các peptid sinh học có giá trị, có tiềm năng ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất thực phẩm chức năng. Hàm lượng acid amin tổng thu được khi thủy phân bằng protease được xác định bằng phương pháp chuẩn độ formol, kết quả đạt 22.7 g/l. Phân tích sản phẩm thủy phân bằng sắc ký TLC cho thấy trong dịch chiết chứa các acid amin có giá trị cao như lysine, alanine, glutamic...

Từ khóa: Pluriamin, acid amin, nhộng tằm, peptid sinh học, enzyme.

Abstract: Pluriamine is a natural amino acid mixture obtained from dried silkworm pupae. In that mixture, there are many important essential amino acids such as leucin, isoleucin, lysine, threonin, cysteine, etc. Pluriamine provides essential amino acids for the body, helping to strengthen the body. The nutritional value of protein is determined by the relationship in quantity and quality of different amino acids in the protein, in which amino acids have growth promoting properties such as: arginine, tryptophan, glutamic acid, proline, cysteine, serine, tysosin. The essential amino acids for the body are: Methionine, lysine, tryptophan, phenylalanine, leucin, isoleucin, threonin, valine. In this study, amino acids from silkworm pupae were extracted using protease enzyme method to obtain a mixture of amino acids and valuable biological peptides, which have potential applications as raw materials

* Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Mở Hà Nội

in food production. function. The total amino acid content obtained by protease hydrolysis was determined by formol titration method, the result was 22.7 g/l. Analysis of hydrolysis products by TLC chromatography showed that the extract contained high-value amino acids such as lysine, alanine, glutamic...

Keywords: *Pluriamin, acid amin, silkworm pupae, black yeast, enzyme.*

I. Đặt vấn đề

Axit amin là thành phần quan trọng, cấu thành nên các protein khác nhau, đảm nhiệm nhiều vai trò và chức năng trong các hoạt động sống của cơ thể. Ngoài ra, axit amin còn có tác dụng tổng hợp nên những loại nội tiết tố và chất dẫn truyền thần kinh cần thiết để hỗ trợ cho các quá trình sinh hóa trong cơ thể[11].

Axit amin kết hợp với nhau theo những trình tự nhất định trong những liên kết khác nhau sẽ tạo thành các phân tử khác nhau cả về thành phần lẫn tính chất. Như vậy, giá trị dinh dưỡng của protein được xác định dựa trên mối liên quan về số lượng và chất lượng của các axit amin khác nhau cấu thành nên protein đó[6].

Nhộng tằm là dạng chuyển tiếp của ấu trùng thành con trưởng thành, chứa nhiều chất dinh dưỡng và hoạt chất sinh học. Từ ngàn năm nay, nhân dân đã sử dụng nhộng tằm (sau khi được dùng để kéo lấy tơ) như một món ăn bổ dưỡng quen thuộc[2]. Gần đây, các nhà khoa học đã tiến hành nghiên cứu về tác dụng đối với sức khỏe con người của các acid amin trong nhộng tằm, cụ thể là Pluriamin. Hàm lượng protein của nhộng tằm tươi sau khi xử lý tẩy dầu mỡ lên đến 60%, chứa nhiều axit amin thiết yếu[4,9].

Các nghiên cứu gần đây về nhộng tằm chủ yếu tập trung vào chức năng của các peptit hoạt tính sinh học thu được bằng cách thủy phân bằng enzym. Một số peptit ức chế enzym chuyển đã được tiếp

cận bằng cách thực hiện thủy phân protein của nhộng tằm, và các peptit hoạt tính sinh học của nhộng tằm được cho là có hiệu quả trong việc chống tăng huyết áp, tiềm năng để điều trị bệnh tiểu đường[7]. Ngoài ra, các enzym thủy phân của nhộng tằm có thể ngăn cản sự phân hóa tiền tế bào và tạo mỡ, có thể được sử dụng để điều trị chứng béo phì trong tương lai.

Chiết xuất hợp chất acid amin bằng phương pháp thủy phân bằng axit là phương pháp đầu tiên để sản xuất acid amin, thường sử dụng axit clohydric. Phương pháp này có nhiều hạn chế, quy trình sản xuất nguy hại, ô nhiễm lớn, đồng thời vì sự khác biệt trong quá trình phản ứng xảy ra nhiều phản ứng, khó kiểm soát, cảm giác ngon miệng và an toàn kém, sản phẩm phụ nhiều, do đó, thường được sử dụng khi sản xuất hóa chất công nghiệp hoặc sản phẩm có giá trị thấp. Trong những năm gần đây, sản xuất acid amin bằng con đường sinh học ngày càng được quan tâm. Các phương pháp sinh học bao gồm phương pháp enzyme, phương pháp lên men và bán lên men.

Enzyme sinh học thủy phân nhộng tằm là phương án khả quan, vì có điều kiện phản ứng nhẹ nhàng, ít sản phẩm phụ, đồng thời thân thiện với môi trường và các đặc tính tốt như cảm giác ngon miệng của sản phẩm đã xác định rằng phương pháp này đáng được nghiên cứu chuyên sâu[1].

II. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu: Nhộng tằm là nhộng tươi (thu được sau quá trình ươm

to) thu mua tại chợ dân sinh khu vực Hoàng Mai, Hà Nội sau khi làm sạch được sấy ở nhiệt độ 50°C trong 6h, sau đó xay nhỏ làm nguyên liệu bột.

Enzym protease (Spectrum Chemical, P1820).

2.2. Phương pháp thủy phân nhộng tằm bằng enzyme protease

Bột nguyên liệu nhộng tằm hòa vào nước theo tỷ lệ 1:10 (w/v), bổ sung hoặc không bổ sung enzym protease, sau đó ủ ở nhiệt độ 50°C trong 4h, khuấy liên tục trong quá trình giữ nhiệt. Sau khi thủy phân tiến hành ly tâm 5000 vòng trong 15 phút, loại bỏ mỡ nổi trên bề mặt, lọc bằng giấy lọc, thu được dịch chứa hỗn hợp acid amin từ nhộng tằm. Các mẫu thí nghiệm được ly tâm (10.000 rpm ở 10°C trong 10 phút), thu dịch và tiến hành phân tích.

2.3. Xác định acid amin tổng bằng phương pháp chuẩn độ formol

Cho vào bình nón 20ml dung dịch chứa acid amin và 0,5ml dung dịch phenolphthalein 1%. Để trung hòa dung dịch acid amin, cho từng giọt NaOH 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt. Cho thêm 20ml dung dịch fomanđehit 30% đã trung hòa và lắc đều bình nón. Sau 5 phút dung dịch mất màu. Chuẩn độ bằng NaOH 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng đậm (pH = 9,0). Thí nghiệm kiểm tra cũng được tiến hành tương tự với các hoá chất trên nhưng thay dung dịch chứa acid amin bằng nước cất cùng thể tích.

2.4. Phương pháp định tính amino acid bằng sắc ký lớp mỏng TLC (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY)

Sắc ký lớp mỏng là quá trình tách các hợp chất dựa trên ái lực khác biệt

của chúng, trong đó pha tĩnh là lớp mỏng của silica gel trên tấm nhôm và pha động là dung môi. Mẫu phân tích được pha động đưa qua pha tĩnh thông qua các mao quản.

Sấy khô bản sắc ký ở 100°C trong 15 phút. Chấm mẫu cần phân tích và dung dịch acid amin chuẩn (hòa tan 4 axit amin Alanine, Arpartic acid, Glutamic acid, Lysine vào nước RO đạt nồng độ chuẩn 5mg/ml) lên bản sắc ký (thể tích 1-2 μ l). Các vết chấm phải nhỏ, có đường kính 2 - 4 mm. Dùng máy sấy sấy khô vết chấm. Đổ dung môi chạy sắc ký (Pha 100 ml dung môi chạy sắc ký gồm 60ml n-butanol, 15ml acetic acid glacial, 25ml nước RO (tỷ lệ 12:3:5) vào bể chạy sắc ký (chiều cao dung môi từ 1-1.5cm), đặt bản sắc ký đứng vào trong bể chạy sắc ký, sao cho chiều cao dung môi thấp hơn vị trí chấm mẫu trên bản sắc ký). Đập nắp, chạy trong 2-3h, đến khi vạch dung môi chạy đến cách mép trên bản sắc ký 1cm thì lấy bản sắc ký ra, sấy khô dung môi. Phun dung dịch thuốc thử ninhydrin (Thuốc thử ninhydrin: 0.2g ninhydrin trong 100ml ethanol) lên bản sắc ký, sau đó để bản sắc ký ở 80-100°C trong 5 phút và đọc kết quả. Xuất hiện vết mẫu chạy trên bản sắc ký, so sánh vết chất của mẫu phân tích với 4 axit amin chuẩn về màu sắc, hệ số di chuyển R_f, từ đó xác định được các axit amin có trong dịch chiết.

Giá trị R_f của mỗi acid amin được tính theo công thức sau:

$$R_f = \frac{\text{(Khoảng cách di chuyển của mẫu)}}{\text{(Khoảng cách di chuyển của dung môi)}}$$

III. Kết quả và thảo luận

3.1. Lựa chọn phương pháp xử lý nguyên liệu bột nhộng tằm

Bước đầu tiên của quá trình tách chiết là xử lý nguyên liệu nhộng tằm. Đây là bước đầu quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả trích ly. Nhộng tằm sau khi làm sạch được sấy ở nhiệt độ 50°C trong 6h, sau đó xay nhỏ làm nguyên liệu bột.

Quá trình sấy cũng ảnh hưởng một phần không nhỏ tới quá trình thu nhận acid amin. Quá trình sấy không đảm bảo dẫn tới việc bảo quản nhộng sẽ bị hỏng, ẩm mốc. Tiến hành xử lý nguyên liệu theo 2 phương án: (1) Sấy nhộng ở 50°C trong 6h, sau đó đem xay nhuyễn thu bột nhộng. (2) Sấy nhộng ở 50°C trong 6h, sau đó đem xay nhuyễn, tiếp tục sấy ở nhiệt độ trên trong 2h và thu bột nhộng.



Hình 3.1 Hình ảnh nhộng tằm khi được sấy xay

Kết quả khảo sát cho thấy, việc sấy lần 2 bột nhộng sau khi sấy lần 1 và xay là rất quan trọng. Bột nhộng sấy 1 lần độ ẩm còn cao, do nguyên liệu ban đầu khá lớn, nước còn giữ lại trong nguyên liệu khá nhiều. Vì vậy, bột nhộng sấy 1 lần dễ bị hỏng mốc, trọng lượng không ổn định. Với phương án 2, bột nhộng sau khi xay có kích thước nhỏ, khi sấy ở nhiệt độ 50°C trong 2h sẽ giúp loại bỏ hoàn toàn lượng ẩm còn lưu lại trên nguyên liệu, giúp việc bảo quản dễ dàng và thuận lợi.

3.2. Lựa chọn phương pháp chiết xuất acid amin từ nhộng

Trong những nghiên cứu gần đây, pluriamin từ nhộng tằm có thể chiết xuất bằng một trong 3 phương pháp gồm chiết xuất bằng axit, chiết xuất bằng nước và chiết xuất bằng enzym. Mỗi phương pháp có ưu và nhược điểm, hiệu suất tách cũng phụ thuộc vào nhiều yếu tố.

Trong thí nghiệm này, chúng tôi ưu tiên hai phương pháp chiết xuất Pluriamin bằng nước hoặc enzym protease, do tính an toàn của hai phương pháp này. Bột nguyên liệu nhộng tằm hòa vào nước theo tỷ lệ 1:10 (w/v), bổ sung hoặc không bổ sung enzym protease, sau đó ủ ở nhiệt độ 50°C trong 4h, khuấy liên tục trong quá trình giữ nhiệt.

Kết quả thể hiện ở bảng 3.1:

Bảng 3.1. Hàm lượng amin tổng thu được theo 2 phương pháp

Phương pháp	Hàm lượng acid amin tổng (g/l)
Chiết xuất bằng nước	3.25
Chiết xuất bằng enzym	14.3

Trong thí nghiệm khảo sát trên, hàm lượng amino acid tổng thu được khi chiết xuất trong nước đạt 3.25g/l (tương đương hiệu suất 6.5% trọng lượng khô). Nghiên cứu của Niphattha Chatsuwana và cộng sự cho kết quả hàm lượng protein hòa tan trong nước chiết xuất từ nhộng tằm, Bombyx mori Linn là 3,96% theo trọng lượng ướt. Các axit amin chính được tìm thấy trong dịch chiết nhộng tằm là axit glutamic, phong phú nhất, tiếp theo là histidine, phenylalanine và glycine [7].

Dễ dàng nhận thấy, enzym protease có hiệu quả cao khi chiết xuất acid amin

từ nguyên liệu bột nhộng. Hàm lượng acid amin tổng thu được cao gấp 5 lần so với khi không bổ sung enzym. Kết quả này khá dễ hiểu, bởi protein chiếm tới 60% thành phần của nhộng, với việc bổ sung protease hoạt độ cao sẽ thúc đẩy hiệu suất tách chiết pluriamin từ nhộng.

3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân nhộng tằm bằng enzyme

Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình chiết xuất acid amin bằng enzym protease

Thời gian là có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả chiết tách acid amin bằng enzym, do enzym có bản chất là protein do vậy chúng có khả năng chịu đựng hay độ bền của phân tử protein phụ thuộc vào đặc tính và cấu trúc của enzym đó. Khi kéo dài thời gian ở nhiệt độ và điều kiện thích hợp, sau thời gian nhất định thì hoạt tính sẽ giảm xuống bởi phân tử protein bị thay đổi cấu trúc phân tử. Đồng thời sản phẩm sau quá trình chuyển hóa tạo ra cũng có thể ức chế quá trình chuyển hóa do vậy việc chọn đúng thời điểm ngừng sau quá trình chuyển hóa sẽ đem lại nhiều lợi ích kinh tế cũng như lượng sản phẩm thu hồi.

Tiến hành các bước chiết xuất thu nhận acid amin theo các bước sau:

(1) Xử lý nguyên liệu: nguyên liệu nhộng tằm được làm sạch, loại bỏ tạp chất, sau đó đem đi sấy khô ở nhiệt độ 50°C trong 4 - 6h thu được bột nhộng nguyên liệu.

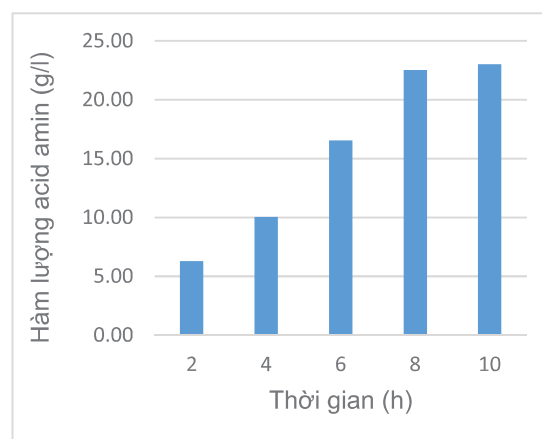
(2) Thủy phân: lấy 10g nhộng tằm sấy khô bổ sung nước cất và enzym protease, gia nhiệt 60°C với thời gian chiết xuất lần lượt là 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h.

(3) Sau khi thủy phân tiến hành ly tâm 5000 vòng trong 15 phút, loại bỏ mỡ

nổi bên trên và đem đi lọc bằng giấy lọc, thu được dịch chứa hỗn hợp acid amin từ nhộng tằm (Pluriamin).

(4) Định tính acid amin trong dịch chiết bằng phương pháp TLC và xác định hàm lượng acid amin tổng.

Kết quả thể hiện ở hình 3.3.



Hình 3.2. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình thủy phân nhộng tằm bằng enzyme

Kết quả đồ thị cho thấy hàm lượng axit amin tăng dần theo thời gian, tăng mạnh trong 6h đầu và cao nhất ở mức 8h (đạt 22.54 g/l). Tại thời điểm 10h, hàm lượng acid amin tổng thu được chỉ đạt 23.02 g/l, gần như tăng rất ít so với mốc thời gian trước. Trong khi đó, để tách chiết amin, chúng ta phải duy trì nhiệt độ và khuấy trong suốt quá trình. Do đó, chúng tôi lựa chọn thời gian thích hợp để chiết xuất là 8h.

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình chiết xuất acid amin bằng enzym protease

Để xác định khoảng nhiệt độ thích hợp cho quá trình chiết xuất axit amin, tiến hành như sau: cân 10g bột nhộng tằm, bổ sung 100ml nước và 100μl enzym. Các mẫu thí nghiệm ủ nhiệt ở các mức nhiệt

độ 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C trong 6h, duy trì khuấy nhẹ trong quá trình gia nhiệt. Phân tích định tính các thành phần trong dịch chiết bằng phương pháp sắc ký bản mỏng TLC. Hàm lượng acid amin tổng của các mẫu chiết xuất xác định bằng phương pháp Anson cải tiến.

Kết quả trên hình 3.3 cho thấy, dịch chiết acid amin có chứa hỗn hợp nhiều acid amin khác nhau, dễ dàng nhận thấy sự có mặt của lysine và alanine cùng rất nhiều các acid amin khác.



Hình 3.3. Phân tích acid amin bằng TLC

G – glutamic L – Lysine

Al – Alanin Ar – Arginin

30°C, 40°C, 50°C, 60°C: mẫu dịch thủy phân nhộng tằm bằng enzyme ở các nhiệt độ khác nhau.

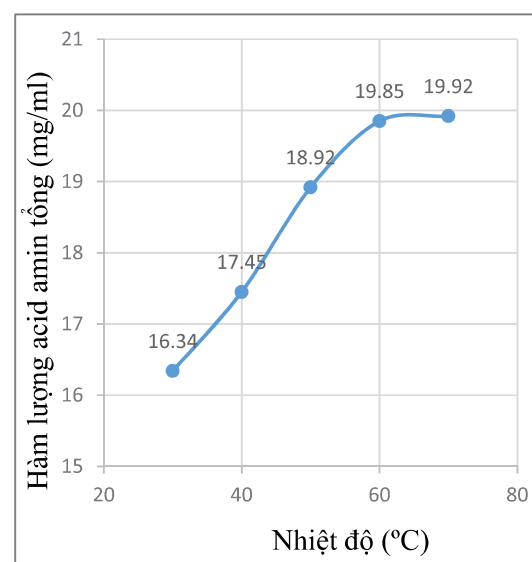
Khi định lượng hàm lượng acid amin tổng trong dịch chiết ở các mức nhiệt độ khác nhau, kết quả khảo sát cho thấy, nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất tách chiết acid amin từ nguyên liệu.

Từ bảng 3.2, khi nhiệt độ tăng lượng acid amin thu được tăng dần. Ở 30°C,

hàm lượng acid amin thu được là 16.34 g/l. Hàm lượng acid amin tăng dần và đạt 19.85 khi nhiệt độ là 60°C (tăng hơn 20% so với ở nhiệt độ 30°C).

Bảng 3.2. Hàm lượng acid amin tổng thu được ở các nhiệt độ khác nhau

Mẫu thí nghiệm	Nhiệt độ	Hàm lượng acid amin (g/l)
1	30	16.34
2	40	17.45
3	50	18.92
4	60	19.85
5	70	19.92



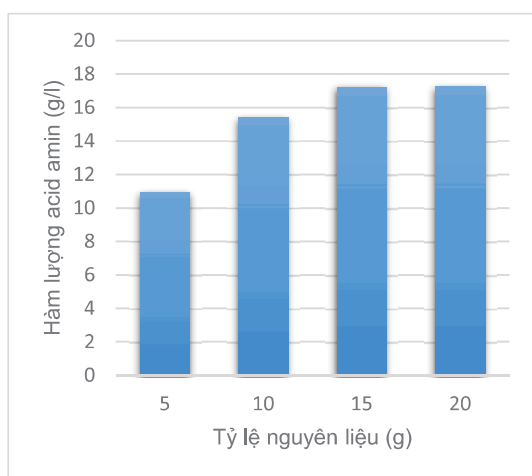
Hình 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân nhộng tằm bằng enzyme

Tiếp tục tăng nhiệt độ, ở mức nhiệt độ 70°C thu được hàm lượng axit amin nhiều hơn lượng thu được ở 60°C, tuy nhiên hàm lượng tăng thêm không đáng kể. Ngoài ra, ở nhiệt độ 70°C, một số enzym bị ảnh hưởng đến độ bền và không còn đảm bảo được hoạt tính của enzym trong thời gian dài.

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu nhộng đến quá trình chiết xuất acid amin bằng enzym protease

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu nhộng đến khả năng chiết xuất hàm lượng axit amin của nhộng tằm với các tỷ lệ như sau: lượng bột tằm lần lượt là 5g, 10g, 15g, 20g trong 100ml nước, bổ sung enzym và gia nhiệt ở 50°C. Sau 6h ủ nhiệt, tiến hành ly tâm thu dịch.

Kết quả xác định dựa trên hàm lượng axit amin của dịch sau ly tâm được biểu thị trong hình 3.5.



Hình 3.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu nhộng đến quá trình thủy phân nhộng tằm bằng enzyme

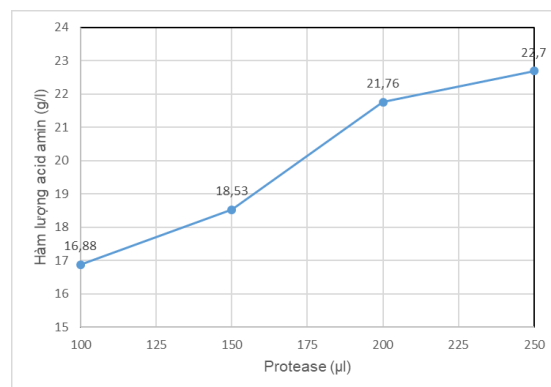
Kết quả đồ thị cho ta thấy khi tăng hàm lượng nguyên liệu nhộng, hàm lượng axit amin thu được tăng dần. Hàm lượng nguyên liệu tăng lên 15g và 20g hàm lượng axit amin tăng không đáng kể. Điều này dễ dàng giải thích đối với các phản ứng thủy phân, khi protein của nhộng tằm là cơ chất tạo thành các acid amin dưới tác dụng của enzym xúc tác. Với khảo sát này, nhóm nghiên cứu lựa chọn tỷ lệ nguyên liệu/nước là 15/100 (w/v).

Ảnh hưởng của tỷ lệ protease đến quá trình chiết xuất acid amin bằng enzym

Tỷ lệ enzym là một trong những chỉ tiêu quan trọng để chiết xuất axit amin.

Trong phản ứng thủy phân, protein nhộng tằm đóng vai trò cơ chất, phân giải bởi enzym protease xúc tác thủy phân các thành phần có trong nhộng tằm, giúp quá trình trích ly acid amin đạt hiệu quả cao hơn.

Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ enzym bổ sung đến khả năng chiết xuất hàm lượng axit amin của nhộng tằm với các tỷ lệ được bố trí với lượng enzym tăng dần 100μl, 150μl, 200μl, 250 μl. Tiến hành thí nghiệm với tỷ lệ 10g nhộng, sau 6h ủ nhiệt, nhiệt độ 50°C, và ly tâm thu dịch. Kết quả xác định dựa trên hàm lượng axit amin của dịch sau ly tâm được biểu thị trong đồ thị sau.

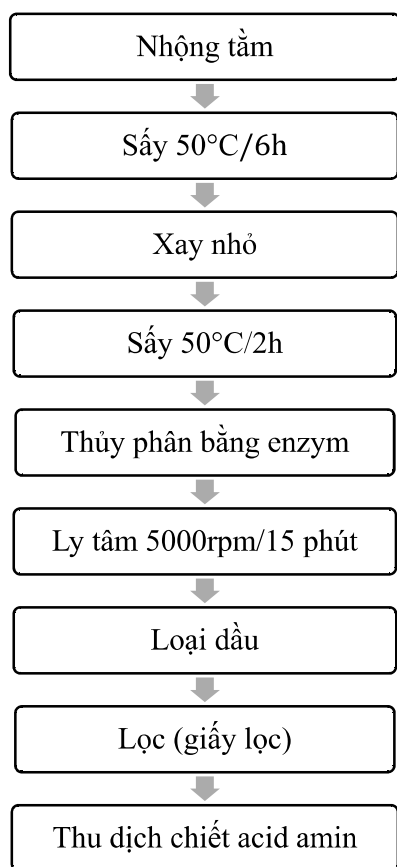


Hình 3.6. Ảnh hưởng của tỷ lệ protease bổ sung đến quá trình thủy phân nhộng tằm bằng enzyme

Biểu đồ trên đã thể hiện một cách rõ nét về ảnh hưởng của enzyme đến hiệu quả tách chiết acid amin từ nhộng. Thể tích enzym tăng từ 0μl enzym đến 250μl, lượng acid amin tăng lên rõ rệt. Khi thể tích enzym vừa đủ để phản ứng thủy phân diễn ra triệt để, tốc độ tăng của sản phẩm có xu hướng chậm lại, so sánh mức thí nghiệm 200 và 250μl để thấy rõ điều đó.

Dựa trên đồ thị khảo sát hình 3.6, lựa chọn thể tích enzym thích hợp cho quá trình tách acid amin là 250 μl enzym protease/10g nguyên liệu bột nhộng tằm.

3.4. Quy trình thu nhận dịch chiết giàu acid amin từ nhộng tằm bằng enzyme



Thuyết minh qui trình công nghệ:

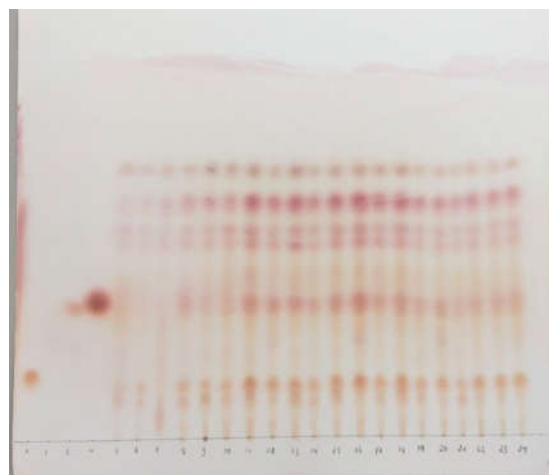
Xử lý nguyên liệu: nguyên liệu nhộng tằm được làm sạch, loại bỏ tạp chất, sau đó đem đi sấy khô ở nhiệt độ 50°C trong 6h. Sau khi sấy, dùng máy xay để xay nhuyễn, tiếp tục cho vào sấy 50°C trong 2h thu được bột nhộng nguyên liệu.

Thủy phân: lấy 10g nhộng tằm sấy khô bổ sung 100ml nước cất và 100μl enzym protease, gia nhiệt 60°C trong 8h.

Sau khi thủy phân tiến hành ly tâm 5000 vòng trong 15 phút, loại bỏ mỡ nổi bên trên và đem đi lọc bằng giấy lọc, thu được dịch chứa hỗn hợp acid amin từ nhộng tằm (Pluriamin).

Từ các kết quả khảo sát trên, có thể thấy rằng các điều kiện để chiết xuất acid amin rất là quan trọng, hơn thế nữa còn

đóng vai trò lớn về việc đảm bảo cũng như bảo quản được sản phẩm sau này một cách hiệu quả.



Hình 3.7. Phân tích sản phẩm thủy phân nhộng tằm bằng phương pháp sắc ký bản mỏng

Sau khi các thí nghiệm lặp đi lặp lại nhiều lần, nhóm đã thống nhất đưa ra quy trình chiết xuất acid amin từ nhộng tằm bằng enzym.

Một số lưu ý cho quy trình tách chiết nhóm nghiên cứu đã tổng kết sau khi hoàn thành các thí nghiệm trên:

Thứ nhất, tầm quan trọng của công đoạn xử lý nguyên liệu ban đầu. Việc sấy 2 lần giúp bảo quản nguyên liệu nhộng tằm được tốt nhất. Khi sấy một lần, nhộng tằm chưa khô do trong cơ thể nhộng tằm có lượng mỡ khá lớn nhộng tằm chưa khô để một thời gian ngắn sẽ bị ẩm mốc và hỏng.

Thứ hai, dịch chiết acid amin thu được sau khi thủy phân có chứa một lượng lớn mỡ/dầu (thành phần có mặt trong nhộng tằm). Để chiết được dịch dễ dàng cần tách mỡ, có thể dùng giấy lọc. Mỡ sẽ được tách được khỏi dịch nhộng nhanh gọn, không tốn thời gian.

Cuối cùng, sản phẩm dịch chứa acid amin sau ly tâm cần được bảo quản cẩn thận trong tủ lạnh, phân tích ngay sau khi

thu nhận để đảm bảo kết quả chính xác. Các thí nghiệm cần tiến hành cẩn thận và tỉ mỉ, đảm bảo các bước thực hành chính xác, nguyên liệu và dụng cụ vệ sinh.

IV. Kết luận

Quá trình chiết xuất acid amin từ nhộng tằm bằng phương pháp enzyme chịu ảnh hưởng của một số yếu tố bao gồm nhiệt độ chiết, thời gian chiết, tỷ lệ nguyên liệu và enzyme bổ sung. Trên cơ sở các kết quả khảo sát, đề xuất quy trình thu nhận với một số thông số cụ thể như sau: Nhiệt độ thích hợp cho phản ứng thủy phân 60°C; tỷ lệ enzym thích hợp 250 μ l/10g nguyên liệu (xử lý theo quy trình đã đề xuất); thời gian thủy phân acid amin là 8h;

Tỷ lệ nguyên liệu/nước: 1/10.

Tài liệu tham khảo:

- [1]. CN100591226C. Method for extracting composite amino acid from silkworm pupa by biological enzyme method. Guangdong Huanxi Health Technology Inc.
- [2]. D. Paul, Sudipta Dey. Essential amino acids, lipid profile and fat-soluble vitamins of the edible silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Published online by Cambridge University Press: 19 November 2014.
- [3]. Đặng Thị Thu, Nguyễn Thị Xuân Sâm, Tô Kim Anh. Thí nghiệm Hóa sinh Công nghiệp, trường ĐH Bách Khoa Hà Nội, 1997.
- [4]. Hiroyuki Tomotake, Mitsuaki Katagiri, Masayuki Yamato. Silkworm pupae (*Bombyx mori*) are new sources of high quality protein and lipid. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo) 2010; 56(6):446-8.
- [5]. Hou Y, Yin Y, Wu G. Dietary essentiality of “nutritionally non-essential amino acids” for animals and humans. *Exp Biol Med* (Maywood). 2015 Aug;240(8):997-1007.
- [6]. Hou Y, Wu G. Nutritionally Essential Amino Acids. *Adv Nutr*. 2018 Nov 01;9(6):849-851.
- [7]. Niphattha Chatsuwan, Yuporn Puechkamut and Praphan Pinsirodom. Characterization, Functionality and Antioxidant Activity of Water-Soluble Proteins Extracted from *Bombyx mori* Linn. *Current Applied Science and Technology* Vol. 18 No. 2 May-August 2018.
- [8]. Perrin D.D and Boyd Dempsey (1974). Buffer for pH and Metal Ion Control.
- [9]. Reeds PJ. Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J Nutr*. 2000 Jul;130(7):1835S-40S.
- [10]. Srinivas V. Bandlamori, Mousumi Mondal, C Rajendra Singh, Ashwini M. Karkada. Evaluation of Nutritional Composition of Hybrids of Waste Silkworm Pupa *Bombyx Mori* L As A Potential Raw Material For Poultry Feed- A Sustainable Technology For Futur. Volume 01, Issue 10 (12.2012).
- [11]. Wu G. Axit amin: chuyển hóa, chức năng và dinh dưỡng. *Axit amin*. 2009 Tháng 5; 37 (1): 1-17.
- [12]. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Rhoads JM, Satterfield MC, Smith SB, Spencer TE, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*. 2009;37:153–68.
- [13]. Xiaotong Li, Hongqing Xie, Yajie Chen, Mingzi Lang, Yuyin Chen, and Liangen Shi. Silkworm Pupa Protein Hydrolysate Induces Mitochondria-Dependent Apoptosis and S Phase Cell Cycle Arrest in Human Gastric Cancer SGC-7901 Cells. *Int J Mol Sci*. 2018 Apr; 19(4): 1013.
- [14]. Zilin Yu, Hongrui Jiang, Rongcan Guo, Bo Yang, Gang You, Mouming Zhao, Xiaoling Liu. Taste, umami-enhance effect and amino acid sequence of peptides separated from silkworm pupa hydrolysate. *Food Res Int* 2018 Jun;108:144-150.

Địa chỉ tác giả: Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Mở Hà Nội

Email: kimthoacnsh@hou.edu.vn