

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH CALCIUM-BINDING CỦA ĐẠM CÁ PHÂN LẬP TỪ PHỤ PHẨM CÁ TRA (*Pangasius hypophthalmus*)

Cao Xuân Thủy^{1,*}, Trần Bích Lam²

¹Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp. HCM

²Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia Tp. HCM

*Email: thuycx@cntp.edu.vn; ninhc@yahoo.com

Đến Tòa soạn: 8/3/2014; Chấp nhận đăng: 29/4/2014

TÓM TẮT

Đạm cá phân lập (Fish Protein Isolate - FPI) từ phụ phẩm cá Tra *Pangasius hypophthalmus* có những tính năng công nghệ có thể ứng dụng vào công nghệ chế biến thực phẩm như: khả năng hòa tan, tạo nhũ, tạo bọt, tạo màng... Bên cạnh đó, chúng còn có một hoạt tính sinh học quan trọng là calcium-binding. Điều này mở ra triển vọng trong việc sản xuất các sản phẩm giúp tăng cường hấp thu can-xi cho con người. Nghiên cứu này tập trung tối ưu hóa điều kiện thủy phân protein từ phụ phẩm cá Tra để thu nhận sản phẩm FPI có hoạt tính calcium-binding cao nhất. Trong quá trình thủy phân sử dụng enzyme proteaza (có tên thương mại là Alcalaza 2.4L) ở các điều kiện thủy phân khác nhau và tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Kết quả cho thấy khả năng calcium-binding của FPI cao nhất đạt 26,85 (mg Ca²⁺/g FPI) tại các điều kiện thủy phân là pH: 7,0; tỉ lệ enzyme/cơ chất (E/S): 0,15 % w/v; nhiệt độ thủy phân: 55 °C; thời gian thủy phân: 120 phút. Kết quả phân tích sản phẩm sau thủy phân bằng kĩ thuật sắc kí lỏng cao áp (HPLC) cho biết các phân tử protein trong FPI có khối lượng phân tử nhỏ (< 3 kDa: 82,88 %; từ 3÷7 kDa: 17,12 %).

Từ khóa: Alcalaza 2.4L, FPI, calcium-binding, phụ phẩm cá Tra, tăng cường hấp thụ canxi.

1. MỞ ĐẦU

FPI chứa các protein có khối lượng phân tử nhỏ, có thể gọi là pepton từ cá. FPI có tính năng công nghệ và hoạt tính sinh học khác nhau tùy thuộc nguồn gốc và phương pháp công nghệ. Một trong những hoạt tính sinh học quan trọng của FPI là khả năng calcium-binding [1]. Một số nghiên cứu đã cho thấy protein trong FPI có nguồn gốc từ surimi cá Đù vàng (*Pseudoscianea crocea*), cá Tuyết đại dương (*Gadus morhua*) sau khi liên kết với can-xi ở dạng ion, được bổ sung vào thực phẩm sẽ tăng cường khả năng hấp thụ can-xi của người sử dụng [2, 3]. Khả năng calcium-binding của FPI được quyết định bởi hai yếu tố chính: Cấu trúc của các phân tử protein (số lượng, thành phần, trình tự sắp xếp các acid amin) và sự tương tác giữa các phân tử protein có trong FPI [4, 5]. Peptide trong FPI có chiều dài khoảng 7 đến 30 gốc axit amin thường có hoạt tính calcium-binding tốt nhất. Khả năng calcium-binding của FPI từ surimi cá rô phi

(*Oreochromis niloticus*) tốt hơn nhiều so với đạm sữa phân lập (whey protein isolate -WPI) và tốt nhất khi FPI có thành phần protein với khối lượng phân tử từ 1 - 3 kDa chiếm trên 75 % tổng protein có trong FPI [6].

Hiện nay, nguồn phụ phẩm cá Tra tại các nhà máy chế biến thủy sản thuộc khu vực đồng bằng sông Cửu Long rất lớn (khoảng hơn 1 triệu tấn/năm) nhưng chủ yếu dùng làm thức ăn chăn nuôi [7]. Việc nghiên cứu chế biến phụ phẩm cá Tra thành những sản phẩm có giá trị gia tăng như đạm cá phân lập có khả năng calcium-binding sẽ mang lại hiệu quả kinh tế cao cho nhà sản xuất. Bài báo này tập trung vào nội dung nghiên cứu thu nhận các peptide có khả năng calcium-binding từ quá trình thủy phân phụ phẩm cá Tra bởi enzyme Alcalase 2.4L để thu được sản phẩm có hoạt tính calcium-binding cao nhất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Phụ phẩm cá Tra gồm các phần đầu xương do công ty Cổ phần Thủy sản Cần Thơ cung cấp. Phụ phẩm được bảo quản lạnh; vận chuyển về phòng thí nghiệm; chia thành các phần nhỏ cho mỗi lần thí nghiệm và bảo quản lạnh đông ở -20°C trong thời gian tiến hành nghiên cứu.

Enzyme Alcalase 2.4L của hãng Novozyme được mua từ công ty EAC. Enzyme Alcalase 2.4L được thu nhận bằng phương pháp lên men chìm vi khuẩn *Bacillus licheniformis*. Thành phần enzyme chủ yếu là Subtilisin A (Subtilisin carisbera), đây là một endo-protease, hoạt tính là 2.4 đơn vị Anson/g; nhiệt độ tối ưu $55\pm 7^{\circ}\text{C}$ ($131\text{--}158^{\circ}\text{F}$), pH tối ưu $6,5\pm 0,5$ tùy thuộc vào kiểu cơ chất.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thủy phân và thu nhận FPI từ phụ phẩm cá Tra

- Quy trình thủy phân phụ phẩm cá Tra: Phụ phẩm cá Tra đem xay nhỏ (kích thước trung bình 5 mm); bổ sung nước (tỉ lệ 2 : 1); xử lý nhiệt (95°C , 15 phút); làm nguội đến nhiệt độ thích hợp; thủy phân protein bằng enzyme alcalase 2,4 L (tỉ lệ E/S, pH, nhiệt độ, thời gian khác nhau); lọc tách dịch và xác cá; bất hoạt enzyme (ở 90°C /10 phút). Dịch thủy phân được làm lạnh đến 4°C để tách mỡ sơ bộ; lọc chân không qua giấy lọc không tro và li tâm tách mỡ ở tốc độ 15000 vòng/phút trong 20 phút. Phần dịch trong thu được sau li tâm được sấy thăng hoa. Bột protein isolate (có hàm lượng protein trong bột đạt trên 90 %) được đem đi đánh giá hoạt tính calcium-binding và phân tích thành phần khối lượng.

- Xác định mức độ thủy phân (Degree of Hydrolysis - D.H.) theo phương pháp pH-start [1].

- Xác định khối lượng phân tử và thành phần khối lượng của protein trong FPI sau thủy phân bằng phương pháp sắc kí lỏng cao áp - HPLC [8]. Đây là phương pháp có ưu thế hơn so với điện di vì cho phép xác định chính xác khối lượng phân tử và thành phần khối lượng phân tử của các protein trong FPI.

2.3. Tối ưu hóa các yếu tố trong quá trình thủy phân phụ phẩm cá Tra

Quy hoạch thực nghiệm: Phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Method - RSM) [9] với phương án quay bậc 2 có tâm (cánh tay tròn $\alpha = 2$) được áp dụng để tối ưu hóa các điều

kiện của quá trình thủy phân. Các thông số cần tối ưu gồm có: Tỉ lệ E/S, nhiệt độ, thời gian thủy phân, pH.

2.3. Xác định hoạt tính calcium-binding

Hoạt tính calcium-binding được xác định theo phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử ngọn lửa - FAAS [10].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu hóa quá trình thủy phân

Khi tối ưu hóa các yếu tố thủy phân đến khả năng calcium-binding của FPI, trước đó đã tiến hành khảo sát sơ bộ ảnh hưởng riêng lẻ của từng yếu tố: Tỉ lệ E/S, nhiệt độ, thời gian thủy phân, độ pH đến khả năng calcium-binding của FPI. Kết quả khảo sát sơ bộ được sử dụng làm nền tảng cho việc xác định ảnh hưởng tổng hợp của các yếu tố thủy phân đến hoạt tính calcium-binding.

Khi xây dựng bài toán tối ưu, độ pH (X_1), tỉ lệ E/S (X_2 , % v/w), nhiệt độ thủy phân (X_3 , °C) và thời gian thủy phân (X_4 , phút) được khảo sát đồng thời nhằm 2 mục đích: (1) Xây dựng phương trình hồi quy thực nghiệm mô tả mối quan hệ giữa các yếu tố ảnh hưởng và hoạt tính calcium-binding của FPI từ phụ phẩm cá Tra. (2) Tìm ra điều kiện của quá trình thủy phân để hoạt tính calcium-binding đạt cao nhất. Các mức của yếu tố trong thí nghiệm tối ưu hóa như Bảng 1.

Bảng 1. Các mức của yếu tố trong thí nghiệm tối ưu hóa.

Yếu tố thí nghiệm	Mức yếu tố				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Độ pH (X_1)	5	6	7	8	9
Tỉ lệ E/S (X_2 , % v/w)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25
Nhiệt độ thủy phân (X_3 , °C)	50	55	60	65	70
Thời gian thủy phân (X_4 , phút)	30	60	90	120	150
Các mức của biến mã hóa: mức trên, +1; mức cơ sở, 0; mức dưới, -1; $\alpha = 2$					

Số thí nghiệm được tính theo công thức: $N = 2^k + 2k + n_0 = 2^4 + 2.4 + 6 = 30$ (k: số yếu tố thí nghiệm (k = 4), n_0 : số thí nghiệm tại tâm ($n_0 = 6$). Phương trình hồi quy thực nghiệm là một đa thức bậc 2 có dạng:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} X_i X_j$$

trong đó: Y là hàm mục tiêu (hoạt tính calcium-binding), X_i và X_j là các mức của biến độc lập (yếu tố thí nghiệm) đại diện cho ảnh hưởng của X_1 ; X_2 ; X_3 ; X_4 lên hàm mục tiêu Y. β_0 là hằng số; β_i , β_{ii} , β_{ij} là các hệ số của phương trình hồi quy.

Để xây dựng mô tả toán học dưới dạng phương trình hồi quy, cần phải tiến hành xác định các hệ số của phương trình. Các hệ số của phương trình hồi quy có giá trị như sau:

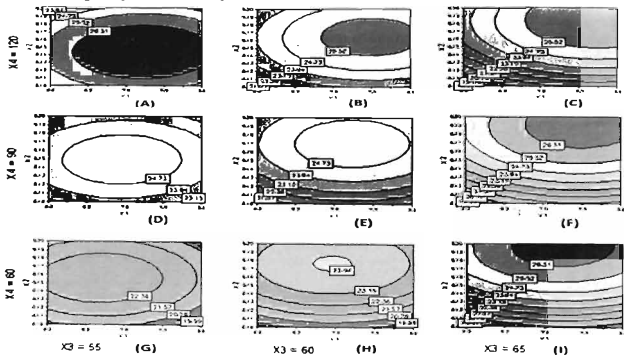
$$\begin{array}{lllll} b_0 = 24,90 & b_1 = 0,37 & b_2 = 1,30 & b_3 = 0,12 & b_4 = 1,01 \\ b_{12} = 0,04 & b_{13} = 0,45 & b_{14} = 0,46 & b_{23} = 1,31 & b_{24} = -0,42 \\ b_{34} = -1,08 & b_{11} = -0,87 & b_{22} = -1,59 & b_{33} = 0,47 & b_{44} = -0,36 \end{array}$$

Kết quả cho thấy 2 hệ số b_3 và b_{12} không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Như vậy, hệ số b_3 và b_{12} bị loại khỏi phương trình hồi quy. Phương trình hồi quy thực nghiệm có dạng sau:

$$Y = 24,90 + 0,37X_1 + 1,30X_2 + X_4 - 0,87X_1^2 - 1,59X_2^2 + 0,47X_3^2 - 0,36X_4^2 + 0,45X_1X_3 + 0,46X_1X_4 + 1,31X_2X_3 - 0,42X_2X_4 - 1,08X_3X_4$$

Kết quả kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy với thực nghiệm cho thấy các yếu tố thí nghiệm có ảnh hưởng mạnh lên hoạt tính calcium-binding ($P < 0,05$). Tính tương thích của phương trình hồi quy (lack of fit) được kiểm tra với sự hỗ trợ của phần mềm Modde 5.0. Kết quả kiểm định "lack of fit" là không có ý nghĩa thống kê (Lack of fit có $P = 0,228$, như vậy $P > 0,05$) nên phương trình hồi quy có sự tương thích cao với thực nghiệm.

Sự ảnh hưởng của các yếu tố thí nghiệm lên hoạt tính calcium-binding được thể hiện trên biểu đồ đường đồng mức như trong Hình 1.



Hình 1. Bề mặt đáp ứng thể hiện ảnh hưởng của các yếu tố thí nghiệm lên hoạt tính calcium-binding.

Nhìn chung, hoạt tính calcium-binding tăng dần cùng với sự gia tăng của yếu tố thí nghiệm đến một giá trị tối hạn; tuy nhiên, sau đó hoạt tính này giảm xuống khi các mức yếu tố tăng quá mức tối hạn này. Chẳng hạn trong hình 1B, thể hiện ảnh hưởng của cặp yếu tố pH và hàm lượng enzyme lên hoạt tính calcium-binding. Kết quả chỉ ra hoạt tính calcium-binding tăng xấp xỉ 27 % cùng với sự gia tăng của hàm lượng enzyme (đến 0,15 % v/w), nhiệt độ thủy phân (đến 54 °C) và thời gian thủy phân 118 phút. Hoạt tính calcium-binding giảm khi quá trình thủy phân được tiến hành ở pH, hàm lượng enzyme và nhiệt độ cao hơn. Các cặp yếu tố còn lại: hình 1- F thể hiện sự ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian thủy phân lên hoạt tính calcium-binding. Ở nhiệt

độ thủy phân từ 50 đến 56 °C, hoạt tính calcium-binding có xu hướng tăng gần 15 % (từ 18,73 mg Ca²⁺/g FPI lên 21,33 mg Ca²⁺/g FPI); tuy nhiên, khi nhiệt độ thủy phân tiếp tục tăng thì hoạt tính calcium-binding giảm xuống. Quy luật tương tự cũng được quan sát thấy khi xét sự ảnh hưởng đồng thời của tỉ lệ enzyme/cơ chất và nhiệt độ thủy phân (Hình 1E), ảnh hưởng của độ pH và thời gian thủy phân tới hoạt tính calcium-binding (Hình 1D).

Kết quả tối ưu hóa cho thấy, khi tổ hợp cả 4 yếu tố thí nghiệm, hoạt tính calcium-binding của FPI cao nhất là 26,85 (mg Ca²⁺/g FPI) với điều kiện thủy phân như sau: pH là 7,0; tỉ lệ enzyme/cơ chất là 0,15 % w/v, nhiệt độ thủy phân là 55 °C, thời gian thủy phân là 120 phút.

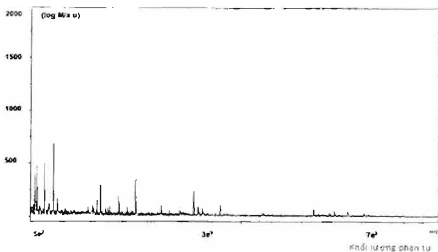
Kết quả nghiên cứu ở trên phù hợp với các kết quả nghiên cứu đã công bố trước đó của Fabienne Guérard, Fereidoon Shahidi, Rozenn Ravallec về khả năng calcium-binding của FPI từ cá *Tropical tuna*, cá *Salmon*, cá *Mallotus villosus*. Ở cá *Tropical tuna* thì khả năng calcium-binding là 24,38 (mg Ca²⁺/g FPI) với các điều kiện thủy phân: pH là 7,5; tỉ lệ E/S là 0,12 % w/v, nhiệt độ 60 °C, thời gian 110 phút. Trong khi đó ở cá *Mallotus villosus* thì khả năng calcium-binding là 23,92 (mg Ca²⁺/g FPI) trong điều kiện thủy phân: nhiệt độ 58 °C, pH là 7,0, tỉ lệ E/S là 0,18 % w/v [11, 12, 13]. Kết quả nghiên cứu trên cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Hordur G. Kristinsson về khả năng calcium-binding trên FPI có nguồn gốc từ phụ phẩm cá *Salmo salar*: FPI có khả năng calcium-binding cao nhất (25,30 mg Cd²⁺/g FPI) với các điều kiện thủy phân pH là 7,0; tỉ lệ E/S là 0,17 % w/v; thời gian thủy phân 120 phút [14].

3.2. Kết quả phân tích khối lượng phân tử của các protein trong FPI

Kết quả phân tích thành phần khối lượng phân tử của các protein trong FPI thu được từ phụ phẩm cá Tra ở các điều kiện thủy phân sau khi tối ưu hóa để có hoạt tính calcium-binding của FPI cao nhất là 26,85 (mg Ca²⁺/g FPI) được thể hiện trong Bảng 2 và Hình 2.

Bảng 2. Kết quả phân tích tỉ lệ thành phần khối lượng phân tử của FPI.

STT	Khối lượng phân tử (kDa)	Tỉ lệ (%)
1	≥ 20	0
2	10 ÷ < 20	0
3	7 ÷ < 10	0
4	3 ÷ < 7	17,12
5	< 3	82,88



Hình 2. Kết quả phân tích HPLC xác định thành phần khối lượng của các phân tử polypeptide trong FPI.

Dựa vào kết quả Bảng 2 cho thấy ở các điều kiện tối ưu, nhất là thời gian thủy phân tối ưu tương đối dài (120 phút), các mạch protein trong phụ phẩm cá Tra đã bị phân cắt bởi enzyme để tạo ra các peptide có khối lượng phân tử nhỏ (82,88 % peptide có khối lượng phân tử nhỏ hơn 3 kDa) và peptide có khối lượng phân tử vừa (17,12 % peptide có khối lượng phân tử từ 3 đến 7 kDa). Các polypeptide có khối lượng phân tử vừa và nhỏ sẽ quyết định đến khả năng calcium-

binding của FPI. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Jung, Rozenn Ravallecple, M.B.K Foh. Trong đó, các tác giả khẳng định khả năng calcium-binding của FPI thu nhận từ phế phẩm cá *Johnius belengerii* và cá *Oreochromis niloticus* cao nhất khi các phân tử protein trong FPI có khối lượng phân tử từ 1 kDa đến 8 kDa ở thời gian thủy phân từ 120+130 phút [2, 14, 15].

4. KẾT LUẬN

Dạm cá phân lập (Fish Protein Isolate) thu nhận từ phụ phẩm chế biến cá Tra (*Pangasius hypophthalmus*) thông qua quá trình thủy phân bằng Alcalase 2.4L có hoạt tính calcium-binding cao. Hoạt tính calcium-binding của FPI này đạt cao nhất là 26,85 mg Ca^{+2} /g FPI; tương ứng với điều kiện tối ưu của quá trình thủy phân như sau: pH là 7,0; hàm lượng enzyme/cơ chất là 0,15 % w/v; nhiệt độ thủy phân là 55 °C; thời gian thủy phân là 120 phút.

Thành phần các phân tử protein trong FPI có khối lượng phân tử nhỏ (< 3 kDa: 82,88 %; từ 3 - 7 kDa: 17,12 %).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nabil Souissi et al. - Biochemical and Functional Properties of *Sardinella (Sardinella aurita)* By-Product Hydrolysates, Food Technol., Biotechnol. **45** (2) (2007) 187-194.
2. Jung et al. - Bioactive Peptides from Marine Sources, State of Art. Report to the NORA fund, Skirsla Matis **30** (2009) 14-09.
3. Michael P. Walsb et al. - Enzymatic Assays to Compare Calmodulin Isoforms, Mutants, and Chimeras, Calcium Binding Protein Procotols **2** (2009) 198-227.
4. Amanda L. et al - Investigation of Calcium-Binding Proteins Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Calcium Binding Protein Procotols **2** (2009) 28-32.
5. Seiko Shimamoto et al. - Ca^{2+} /S100 proteins inhibit the interaction of FKBP38 with Bcl-2 and Hsp90, Bj. Biochemical **458** (2014) 187-196.
6. Bogouri G. A., Linder M., and Pamentier M. - Influence of hydrolysis degree on the funtional properties of salmon by-product hydrolysate, Journal of food science **69** (2004) 8-10.
7. Vietnam Association of Seafood Exporters and Producers (VASEP) - Forecasting of Vietnam seafood exports in 2014, Journal of Vietnam Fishery **4** (2014) 121-119.
8. Vyam Hellado - HPLC Methodology in determination of protein molecular weight applied in FPI, Bioprocess Technol. **6** (2011) 99-122.
9. Kun-Nan Chen and Ming-Ju Chen - Statistical Optimization: Response Surface Methodology, Optimization in Food Engineering, CRC Press, 2008, pp.140-165.
10. Dunga K. and Sung-Hoon Moon - EX-SPECTROSCOPY for calcium & cobalt binding determination, Process Biochemistry **41** (2009) 120-129.
11. Fabienne Guerard et al. - Enzymic solubilisation of proteins from *Tropical tuna* using alcalase and some biological properties of the hydrolysates, Engineering and Manufacturing for Biotechnology **4** (2002) 39-50.

12. Fereidoon Shahidi and Xiao-Qing Han & Jozef Synowiecki Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*), Food Chemistry 53 (1995) 285-293.
13. Rozenn Ravallec-ple et al. - Influence of the experimental conditions on the hydrolysis process in fish hydrolysates, Engineering and Manufacturing for Biotechnology 4 (2001) 51-58.
14. Hordur G. Kristinsson, Barbara A. Rasco - Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins, Process Biochemistry 36 (2000) 131-139.
15. Foh M. B. K, et al. - Chemical Properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) FPH and Concentrate, International Journal of Biological Chemistry 5 (1) (2011) 21-36.

ABSTRACT

CALCIUM BINDING PROPERTIES OF FISH PROTEIN ISOLATE FROM BY-PRODUCTS OF PANGASIOUS HYPOPTHALMUS

Cao XuanThuy^{1,*}, Tran Bich Lam²

¹Faculty of Food Technology, HCM City University of Food Industry

²HCM City University of Technology

*Email: thuycx@cntp.edu.vn; ninhc@yahoo.com

Fish protein isolate (FPI) from *Pangasius hypophthalmus* by-products has many beneficial technological features that can be applied in food industry. Besides, it can bind calcium. This ability is regarded as one of its outstanding biological characteristics. This opens up prospects for the production of FPI to enhance calcium absorption. This study focuses on the optimization of the proteolytic conditions of the by-products of *Pangasius hypophthalmus* to obtain FPI with the highest calcium binding capacity. The enzymatic hydrolysis was performed using endoprotease (Alcalase 2.4L) at different hydrolysis conditions. Optimization was done by response surface method. Results showed that the highest calcium binding capacity of 26.85 (mg Ca²⁺/g FPI) was obtained under the following hydrolysis conditions: pH 7.0; enzyme/substrate ratio (E/S) 0.15 % w/v; hydrolysis temperature 55 °C; hydrolysis time 120 minutes. Molecular weight analysis by HPLC shows that 82.88 % FPI protein molecules are smaller than 3 kDa and 17.12 % are from 3 to 7 kDa.

Keywords: alcalase 2.4L, fish protein isolate, calcium binding, *Pangasius hypophthalmus* by-products, calcium absorption strengthening.