

NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH THỦY PHÂN TRỨNG CẦU GAI ĐEN (*Diadema savignyi*) BẰNG ENZYME ALCALASE

Đoàn Lan Phương^{1, *}, Đinh Thị Kim Hoa^{2, 3},

Lưu Hồng Sơn³, Nguyễn Lan Nhi⁴

TÓM TẮT

Cầu gai (*Diadema savignyi*) là loài động vật biển không xương sống ngành Echinodermata, ở Việt Nam thường được gọi bằng tên cầu gai đen. Trứng cầu gai đen được coi là một loại thực phẩm giàu dinh dưỡng bởi chứa hàm lượng lipid và protein cao, đặc biệt là có chứa đầy đủ các axit béo và axit amin thiết yếu. Sử dụng enzyme để thủy phân protein là một phương pháp chế biến hiệu quả trong ngành công nghiệp thực phẩm nhằm nâng cao chất lượng dinh dưỡng của sản phẩm. Thủy phân phá vỡ các liên kết peptide, chuyển protein mạch dài thành oligopeptide, peptide mạch ngắn và axit amin tự do giúp nâng cao hiệu quả hấp thụ dinh dưỡng. Bài viết này đề cập tới nghiên cứu tối ưu hóa các thông số của quá trình thủy phân trứng cầu gai đen. Nghiên cứu đã lựa chọn 3 thông số ảnh hưởng tới quá trình thủy phân trứng cầu gai đen bằng enzyme Alcalase là tỉ lệ nước/nguyên liệu; tỉ lệ enzyme bổ sung và thời gian thủy phân để tiến hành tối ưu hóa và đã tìm ra được điều kiện tối ưu: tỉ lệ nước/nguyên liệu 0,88 (mL/g); tỉ lệ enzyme bổ sung là 1,32%; thời gian thủy phân là 6,13 giờ và hàm lượng protein hòa tan tổng số thu được là 212,63 mg/g tăng gấp 2,58 lần so với hàm lượng protein hòa tan ban đầu của nguyên liệu.

Từ khóa: *Diadema savignyi*, protein hoà tan, thủy phân, tối ưu hóa, trứng cầu gai.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cầu gai đen (*Diadema savignyi*) phân bố ở vùng ven biển miền Trung, vịnh Bắc bộ, Trường Sa, Côn Đảo và vùng biển phía Tây Nam Việt Nam. Cầu gai đen là loài sinh vật biển có giá trị kinh tế cao, đã có rất nhiều loài cầu gai được sử dụng để nghiên cứu trong các phương thuốc truyền thống của Trung Quốc để chữa bệnh [1]. Nhiều thành phần hóa học được chiết xuất từ cầu gai và các động vật da gai khác đã được liên tục nghiên cứu và cho thấy được những đặc tính sinh học có lợi và khả năng ứng dụng tiềm tàng trong y học đó là các chất kháng sinh, chống độc và chống ung thư. Những thành phần hóa học có hoạt tính sinh học chính từ cầu gai được phân lập ngày càng nhiều và

đa dạng, chúng bao gồm các sắc tố, protein, polysaccharide, thành phần khoáng chất, sterols, vitamin, các axit béo và các axin amin tự do. Nghiên cứu của Woods và cs (2008) cho thấy, trứng cầu gai có độ ẩm dao động trong khoảng 81,4 - 85,3%, protein từ 7,9 - 8,7%, chất béo tổng số từ 2,8 - 3,8%, carbohydrate từ 2,1 - 5,1% và tro chiếm từ 0,9 - 1,3% [2]. Nhiều công trình khoa học nghiên cứu về y học hiện đại cũng đã chứng minh rằng chính các thành phần có trong vỏ, gai và tuyến sinh dục của cầu gai là một nguồn dược liệu rất có giá trị. Thậm chí một số độc tố có trong loài cầu gai trắng đã được sử dụng để phát triển thuốc gây tê liệt thần kinh [3]. Trứng cầu gai là một loại thực phẩm có giá trị dinh dưỡng, chứa hàm lượng cao các lipid, protein và carbohydrate [4].

Những thành phần này ngoài mang lại giá trị dinh dưỡng cao, còn ảnh hưởng đến các đặc tính cảm quan như màu sắc, kết cấu, độ cứng và hương vị của trứng cầu gai [5]. Bên cạnh đó, trứng cầu

¹ Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

⁴ Trường Đại học Phenikaa

*Email: dinhthikimhoa@tuaf.edu.vn

gai cũng được chứng minh mang lại nhiều giá trị sinh học có lợi [6], [7] như hoạt tính chống oxy hóa [8], [9]; hay hoạt tính kìm hãm sự phát triển của khối u. Mặc dù vậy hiện nay có rất ít thông tin về cấu trúc cũng như chức năng của các loại protein, enzyme có trong cầu gai [10]. Tuy có hàm lượng protein rất cao, nhưng protein dự trữ trong sinh vật biển nói chung và cầu gai nói riêng thường có cấu tạo vững chắc, bộ máy tiêu hoá của con người không thể hấp thụ một cách dễ dàng và triệt để được. Vì vậy, cần có biện pháp để nâng cao hiệu quả hấp thụ protein. Thủy phân protein chuyển hóa chúng thành các axit amin tự do tan trước khi đưa vào cơ thể là một trong những phương pháp công nghệ hiện đang rất được quan tâm nghiên cứu hiện nay [11]. Thủy phân có tác dụng phá vỡ các liên kết peptide của các protein mạch dài, tạo điều kiện cho cơ thể dễ hấp thụ. Đạm thủy phân có thành phần chủ yếu là các axit amin, oligopeptit, được ứng dụng trong sản xuất các sản phẩm bột dinh dưỡng cao đạm, nước mắm, nước chấm, hay các sản phẩm thực phẩm chức năng cao cấp cho con người và động vật. Quá trình thủy phân protein bằng enzyme có thể cải thiện khả năng hòa tan cũng như các tính chất hóa lý khác và có thể dẫn đến việc tạo ra các peptide hoạt tính sinh học [12]. Như vậy, dùng enzyme để thủy phân protein tạo ra các sản phẩm như axit amin, oligopeptit chính là một giải pháp công nghệ hữu hiệu. Báo cáo này giới thiệu quá trình tối ưu hóa quy trình thủy phân trứng cầu gai đen (*Diadema savigny*) bằng enzyme Alcalase để làm tiền đề cho việc phát triển các sản phẩm thực phẩm chức năng giàu protein phân tử lượng thấp, hướng tới phục vụ các đối tượng người khó hấp thụ dinh dưỡng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cầu gai đen được thu thập ở Hòn Tằm, Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam. Tất cả các mẫu đã được làm sạch và bảo quản ở 4°C trong điều kiện tiêu chuẩn.

Enzyme Alcalase sản xuất từ *Bacillus licheniformis* và được cung cấp bởi Novozyme (Kobenhavn, Đan Mạch) và có hoạt tính công bố là 2,4 AU/g và mật độ 1,18 g/mL.

Hóa chất sử dụng: Dung dịch A: cân 4 g NaOH và 20 g Na_2CO_3 pha trong nước cất đạt thể tích 1000 mL; dung dịch B: cân 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ hòa tan trong dung dịch Natri xitrat (1%) hoặc trong dung dịch Natri kali tactorat 1% đạt thể tích 100 mL; dung dịch C: hỗn hợp của hai dung dịch A và B theo tỉ lệ 49: 1 (pha trước khi dùng); thuốc thử Folin - Ciocalteu, Sigma-Aldrich 2N trước khi dùng pha loãng hai lần tới nồng độ 1N. Dung dịch gốc: Albumin huyết thanh bò 1 mg/mL: Cân 0,01 g (10 mg Albumin huyết thanh bò) hoà tan trong 10 mL nước được sử dụng làm chất chuẩn.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Trứng cầu gai đen được rửa lần 1 với nước cất và lần 2 với dung dịch NaCl 0,1% để loại bỏ tạp chất. Nguyên liệu được xác định có hàm lượng protein hòa tan ban đầu là $82,43 \pm 0,17$ mg/g. Sau đó 100 g trứng cầu gai đen được nghiền nhỏ và gia nhiệt ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 15 phút để loại bỏ vi sinh vật bất lợi và giúp cho một số protein cao phân tử, lipid được cắt mạch, hỗ trợ cho quá trình thủy phân tiếp theo. Mẫu sau đó được thủy phân trong môi trường nước ở các tỉ lệ nước/nguyên liệu lần lượt là: 0,5/1,0; 1,0/1,10; 1,5/1,0; 2,0/1,0; 2,5/1,0 (v/w), trong các khoảng tỉ lệ enzyme Alcalase bổ sung là 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5% (w/v) với thời gian thủy phân trong các khoảng: 5; 5,5; 6; 6,5; 7 giờ. Trong suốt quá trình thủy phân, nhiệt độ được duy trì ở 45°C (nhiệt độ tối ưu của enzyme hoạt động được nhà sản xuất công bố) và dịch protein sẽ được khuấy đều bởi cánh khuấy tự động của thiết bị thủy phân. Kết thúc quá trình thủy phân, toàn bộ dịch thủy phân được gia nhiệt ở 90°C trong thời gian 15 phút để vô hoạt enzyme. Để tìm phương án tối ưu, phương pháp quy hoạch bậc hai Box - Behnken

được sử dụng, tối ưu 3 yếu tố với 17 thí nghiệm trong đó có 5 thí nghiệm lặp tại kết quả tốt nhất từng đơn yếu tố [13].

2.2.2. Phương pháp đánh giá hàm lượng protein hoà tan

Hàm lượng protein hòa tan được xác định bằng phương pháp Lowry. Phương pháp này dựa trên cơ sở phức chất đồng protein khử hỗn hợp Photphomolipden - Photphovonphramat (thuốc thử Folin - Ciocalteu) tạo phức chất màu xanh da trời có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 660 nm. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ protein. Dựa vào mức độ hấp thụ quang học của protein chuẩn, có thể xác định được hàm lượng protein trong mẫu nghiên cứu.

Tiến hành lấy chính xác 0,5 mL dịch chứa protein với hàm lượng thích hợp cho vào ống nghiệm, thêm vào đó 2 mL dung dịch C, lắc đều để yên trong 10 phút. Sau đó thêm vào hỗn hợp trong ống nghiệm 0,25 mL Folin 2N, lắc đều và để yên trong 30 phút, màu vàng của hỗn hợp chuyển sang màu xanh da trời và đạt đến cường độ màu cực đại. Dem so màu của hỗn hợp trên máy đo quang ở bước sóng 660 nm, xác định trị số mật độ quang học (OD) của dung dịch nghiên cứu. Đo trên máy 3 lần lặp lại và lấy trị số trung bình. Mẫu đối chứng: 0,5 mL đệm cho vào ống nghiệm, thêm vào đó 2 ml dung dịch C và tiếp theo được tiến hành như mẫu thí nghiệm.

Sau đó pha loãng dung dịch gốc bằng nước cất với các nồng độ 20, 40, 60, 80, 100, 120 µg/mL để tiến hành xây dựng đồ thị chuẩn. Xác định mật độ

quang của dãy dung dịch gốc tương tự như mẫu cần xác định protein nêu trên. Mẫu đối chứng: lấy 0,5 mL nước cất cho vào ống nghiệm, thêm vào đó 2 mL dung dịch C và các bước tiếp theo được tiến hành như mẫu thí nghiệm. Qua 3 lần lặp lại thí nghiệm có thể xây dựng đường hồi quy thể hiện mối quan hệ giữa nồng độ protein hòa tan và mật độ quang học.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu phân tích đơn yếu tố quá trình thủy phân được phân tích phương sai và so sánh cặp đôi các giá trị trung bình với mức $\alpha \leq 0,05$ bằng phần mềm SPSS (version 20). Phần mềm Design-Expert (phiên bản 7.1.5, Stat-Ease Inc., USA) được sử dụng để phân tích phương sai (ANOVA), tính toán hệ số của phương trình hồi quy và đề xuất giải pháp cho mô hình tối ưu hóa.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của tỉ lệ nước bổ sung

Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ nước bổ sung được thiết kế theo mô hình đơn nhân tố. Trong đó trứng câu gai (100 g) được xay nhỏ, bổ sung enzyme với tỉ lệ 1% (v/v), tỉ lệ nước/nguyên liệu thay đổi lần lượt là: 0,5/1,0; 1,0/1,0; 1,5/1,0; 2,0/1,0 và 2,5/1,0 (v/w), sau đó thủy phân ở nhiệt độ 45°C trong 5,5 giờ tiến hành đo hàm lượng protein hòa tan tổng số của dịch sau thủy phân nhằm chọn ra tỷ lệ nước/nguyên liệu thích hợp nhất. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của tỉ lệ nước bổ sung đến quá trình thủy phân protein trong trứng câu gai đen được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của tỉ lệ nước bổ sung đến hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được của dịch thủy phân trứng câu gai

Tỉ lệ nước/nguyên liệu (v/w)	0,5/1,0	1,0/1,0	1,5/1,0	2,0/1,0	2,5/1,0
Hàm lượng protein hoà tan tổng số (mg/g)	138,24 ^e ± 0,16	160,24 ^a ± 0,13	156,71 ^b ± 0,21	153,81 ^c ± 0,09	143,27 ^d ± 0,11

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Dung môi đóng vai trò rất quan trọng trong sự hoạt động của enzyme, bên cạnh loại dung môi, nồng độ dung môi thì tỉ lệ nguyên liệu và dung môi cũng sẽ ảnh hưởng trực tiếp tới sự tiếp xúc

của cơ chất và trung tâm hoạt động của enzyme, từ đó ảnh hưởng tới hoạt tính xúc tác của enzyme [14]. Từ kết quả ở bảng 1 cho thấy thủy phân ở tỉ lệ nước bổ sung khác nhau sẽ được hàm lượng

protein hoà tan tổng số khác nhau, nếu tỉ lệ nước/nguyên liệu càng lớn thì hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được lại càng có xu hướng giảm. Kết quả này cũng tương tự như một số công bố trước đó về nghiên cứu khả năng thủy phân protein của enzyme Alcalase trong môi trường nước [14]. Ngược lại, hàm lượng protein thu được tăng khi tỉ lệ nước/nguyên liệu tăng từ tỉ lệ 0,5/1,0 - 1,0/1,0. Protein hoà tan tổng số cao nhất đạt $160,24 \pm 0,13$ mg/g tại tỉ lệ 1,0/1,0, đây được coi là tỉ lệ tối ưu nhất giữa nước và nguyên liệu trứng cầy gai trong quá trình thủy phân của nghiên cứu này khi nghiên cứu sự thay đổi đơn nhân tố. Điều này có thể được giải thích là khi lượng dung môi quá cao sẽ làm pha loãng nồng độ sản phẩm, còn khi tỉ lệ dung môi quá thấp thì lại gây ra sự cô đặc cơ chất và cả hai yếu tố này đều ảnh hưởng tới khả

năng hoạt động tối ưu của enzyme [15]. Vậy để đảm bảo thu được hàm lượng protein hòa tan cao nhất tỉ lệ nước/nguyên liệu là 1,0/1,0 được lựa chọn làm cơ sở cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng tỉ lệ enzyme bổ sung

Trong điều kiện thừa cơ chất, nếu tăng nồng độ enzyme thì quá trình thủy phân xảy ra càng mạnh. Khi nồng độ enzyme bão hoà với nồng độ cơ chất, dù tăng nồng độ enzyme bao nhiêu đi nữa vận tốc quá trình thủy phân rất ít thay đổi. Trứng cầy gai (100 g) được xay nhỏ, bổ sung nước theo tỷ lệ 1: 1 (v/w), tỷ lệ bổ sung enzyme lần lượt: 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% (v/v). Thủy phân ở nhiệt độ 45°C trong 5,5 giờ tiến hành đo hàm lượng protein hoà tan tổng số nhằm chọn ra tỷ lệ bổ sung enzyme thích hợp nhất. Kết quả thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả nghiên cứu lựa chọn tỉ lệ enzyme alcalase bổ sung thích hợp

Tỉ lệ enzyme (%) (v/v)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Hàm lượng protein hoà tan tổng số (mg/g)	$160,26^b \pm 0,21$	$190,24^a \pm 0,13$	$190,30^a \pm 0,12$	$189,12^a \pm 0,16$	$189,14^a \pm 0,15$

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Từ kết quả bảng 2 cho thấy tỷ lệ bổ sung enzyme có ảnh hưởng tới quá trình thủy phân. Với tỷ lệ bổ sung enzyme là 0,5% hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được là thấp nhất ($160,26 \pm 0,21$ mg/g), do với lượng enzyme này chưa đủ để thủy phân hết lượng mẫu. Khi tiếp tục tăng lượng enzyme lên 1% thì hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được tăng nhanh ($190,24 \pm 0,13$ mg/g). Tiếp tục tăng lượng enzyme bổ sung lên 1,5%, 2,0%, 2,5%, hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được so với tỷ lệ bổ sung 1% là giảm nhẹ nhưng không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Điều này có thể giải thích do tỷ lệ enzyme là 1% đã đủ thủy phân hết lượng cơ chất. So sánh với nghiên cứu cũng sử dụng enzyme Alcalase để thủy phân trứng cầy gai vàng (*Tripneustes gratilla*), cho thấy tỉ lệ

enzyme bổ sung 1% (v/v) cũng cho hàm lượng protein hòa tan tổng số thu được là lớn nhất và không tăng nếu như tiếp tục tăng lượng enzyme [16]. Nghiên cứu của Monirul Islam và cs (2022) cho thấy, với cùng một loại enzyme Alcalase, cùng hoạt độ và nhà sản xuất, khi được dùng để thủy phân protein của đậu tương, thì tỉ lệ enzyme bổ sung hiệu quả nhất là 1%, khi tiếp tục tăng tỉ lệ enzyme lên tới 2,5 và 3% thì hiệu quả thủy phân lại thay đổi không đáng kể [17]. Do vậy nghiên cứu đã lựa chọn tỷ lệ bổ sung enzyme là 1% (so với trọng lượng tươi nguyên liệu) cho các thí nghiệm đơn nhân tố tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân

Thời gian thủy phân ảnh hưởng lớn đến hiệu quả của quá trình thủy phân do enzyme tác động

vào chất lượng của sản phẩm, thời gian thủy phân kéo dài sẽ làm giảm hàm lượng protein hòa tan thu được [18]. Anwar Noman và cs (2019), khi tiến hành thủy phân protein bằng enzyme Alcalase, quá trình phân cắt mạch peptit diễn ra mạnh mẽ vào những giờ đầu, sau đó nó chỉ xảy ra với tốc độ chậm hơn nhiều và sẽ có xu hướng giảm [19]. Bên cạnh đó việc kéo dài quá trình thủy phân có thể dẫn tới sự thâm nhập của các vi sinh vật không mong muốn và hình thành nhiều sản phẩm phụ, có

tác động không tốt tới sản phẩm protein hòa tan. Tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian thủy phân, với các khoảng thời gian như sau: 5 giờ; 5,5; 6; 6,5; 7 giờ. Khối lượng mẫu sử dụng là 100 g trứng cầu gai đen với các thông số về tỷ lệ bổ sung nước, tỷ lệ enzyme đã được tối ưu ở các thí nghiệm trên, nhiệt độ được giữ cố định 45°C trong suốt quá trình thủy phân. Theo dõi tiến trình thủy phân và hàm lượng protein hòa tan tổng số được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được từ trứng cầu gai đen

Thời gian thủy phân (giờ)	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
Hàm lượng protein hoà tan tổng số (mg/g)	168,19 ^d ± 0,13	190,25 ^c ± 0,16	210,13 ^a ± 0,12	210,15 ^a ± 0,14	197,35 ^b ± 0,17

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, thời gian thủy phân thực sự ảnh hưởng tới hàm lượng protein hòa tan thu được có trong dịch thủy phân. Nhìn chung, trong khoảng thời gian từ 5,0 tới 6,5 giờ, thời gian thủy phân tăng hàm lượng protein hòa tan thu được tăng. Hiệu quả thủy phân thu được đạt cao nhất thể hiện thông qua hàm lượng protein hòa tan thu được cao nhất khi thời gian thủy phân đạt 6,0 giờ. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng thời gian thủy phân lên 6,5 giờ thì hàm lượng protein hòa tan thu được gần như không có sự thay đổi, thể hiện ở giá trị chỉ số mũ của hai giá trị protein hòa tan thu được là giống nhau. Bên cạnh đó, khi thời gian thủy phân tăng lên 7 giờ, thì hàm lượng protein hòa tan thu được có sự giảm rõ rệt chỉ đạt 197,35 ± 0,17 mg/g. Điều này có thể được giải thích rằng tại thời điểm sau 6 giờ thì toàn bộ cơ chất đã được

thủy phân hoàn toàn. Như vậy thời gian thủy phân thích hợp nhất được lựa chọn cho thí nghiệm đơn nhân tố là 6 giờ, và được sử dụng để tính toán quá trình tối ưu hóa.

3.4. Tối ưu hóa quá trình thủy phân protein từ trứng cầu gai đen bằng enzyme Alcalase theo phương pháp quy hoạch bậc hai

Thí nghiệm tối ưu hóa quá trình thủy phân protein từ trứng cầu gai đen được thiết kế thử nghiệm bằng mô hình Box-Behnken, với ba biến ba cấp độ và 17 đơn vị thí nghiệm và 3 lần lặp lại với các biến được lựa chọn. Các nhân tố được tối ưu bao gồm tỉ lệ enzyme (X1) ở mức (-1, 0, +1) tương ứng (0,5%, 1,0%, 1,5%); tỉ lệ nước/nguyên liệu (X2) ở mức (-1, 0, +1) là (0,5 mL/g, 1,0 mL/g, 1,5 mL/g) và thời gian thủy phân (X3) ở mức (-1, 0, +1) là (5,5 giờ; 6,0 giờ; 6,5 giờ).

Bảng 4. Ma trận thực nghiệm Box-Behnken ba yếu tố và hàm lượng protein hòa tan thu được trong các điều kiện tách chiết khác nhau

TN	Biến thực			Hàm lượng protein hoà tan (mg/g nguyên liệu)
	A – Tỷ lệ enzyme	B -Nước/nguyên liệu	C-Thời gian thủy phân	
1	0,50	0,50	6,00	89,90
2	1,50	0,50	6,00	126,09
3	0,50	1,50	6,00	43,33
4	1,50	1,50	6,00	149,95
5	0,50	1,00	5,50	30,23
6	1,50	1,00	5,50	44,04
7	0,50	1,00	6,50	42,69
8	1,50	1,00	6,50	192,09
9	1,00	0,50	5,50	20,75
10	1,00	1,50	5,50	36,94
11	1,00	0,50	6,50	125,05
12	1,00	1,50	6,50	101,20
13	1,00	1,00	6,00	209,87
14	1,00	1,00	6,00	204,81
15	1,00	1,00	6,00	203,11
16	1,00	1,00	6,00	197,55
17	1,00	1,00	6,00	200,35

Ghi chú: A: Tỷ lệ enzyme (%); B: Tỷ lệ giữa nước/nguyên liệu (mL/g); C: Thời gian thủy phân (giờ).

Áp dụng phương pháp phân tích hồi quy các số liệu thực nghiệm, thu được mô hình đa thức bậc hai thể hiện hàm lượng protein hòa tan tổng số có trong dịch sau thủy phân như sau:

$$Y = 203,14 + 37,05 \cdot A - 3,74 \cdot B + 39,88 \cdot C + 17,50 \cdot A \cdot B + 31,40 \cdot A \cdot C - 10,01 \cdot B \cdot C - 48,57 \cdot A^2 - 52,35 \cdot B^2 - 79,80 \cdot C^2$$

Trong đó: Y là hàm lượng protein hòa tan thu được, các giá trị A, B, C lần lượt là các giá trị của các yếu tố A: Tỷ lệ enzyme (%); B: Tỷ lệ giữa nước/nguyên liệu (mL/g); C: Thời gian thủy phân (giờ). Xem xét ảnh hưởng của từng yếu tố (khi các yếu tố khác được giữ ở mức trung bình trong khoảng chạy của chúng). Theo phương trình hồi quy thu được cho thấy, yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng protein hòa tan là nhiệt độ, tiếp đến là tỉ lệ

nước/nguyên liệu và thời gian thủy phân. Phân tích ANOVA được sử dụng để đánh giá mô hình. Kết quả phân tích ANOVA được thể hiện qua bảng 5.

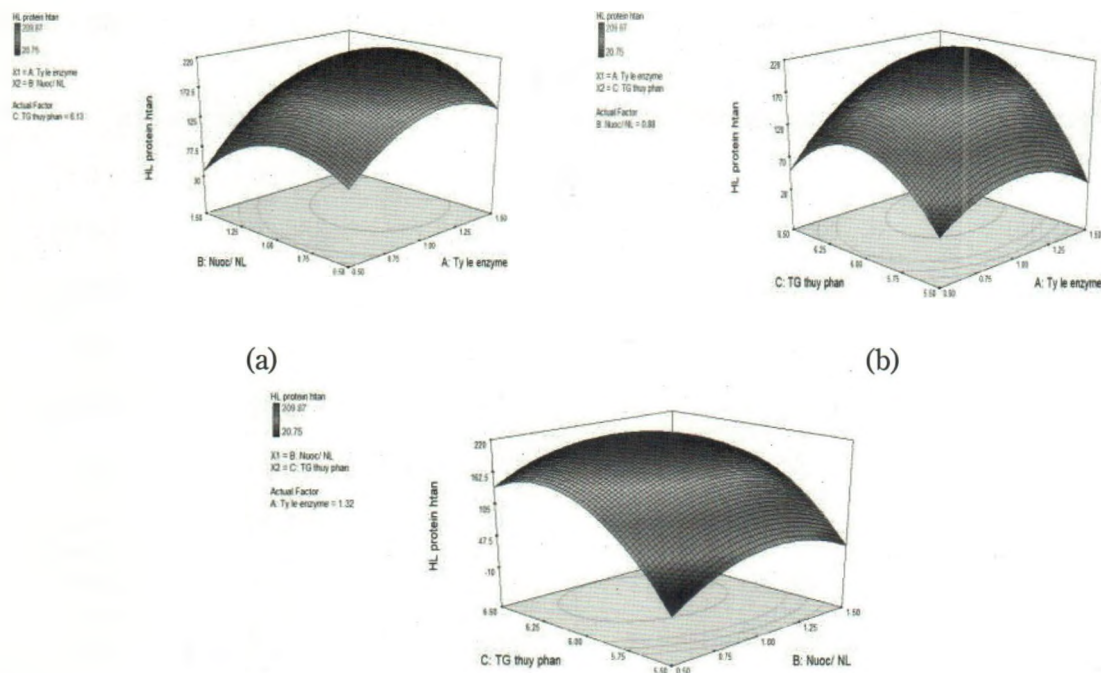
Bảng 5. Phân tích phương sai ANOVA của mô hình thủy phân trứng cầu gai đen

Nguồn	SS	DF	MS	Chuẩn F	Giá trị P
Model	82950,89	9	9216,17	386,26	< 0,0001
A- Tỷ lệ enzyme	10984,44	1	10984,44	460,34	< 0,0001
B-Nước/nguyên liệu	112,13	1	112,13	4,70	0,0668
C-Thời gian thủy phân	12725,87	1	12725,87	533,32	< 0,0001
AB	1225,35	1	1225,35	51,35	0,0002
AC	3943,34	1	3943,34	165,26	< 0,0001
BC	400,80	1	400,80	16,80	0,0046
A ²	9934,56	1	9934,56	416,34	< 0,0001
B ²	11539,59	1	11539,59	483,61	< 0,0001
C ²	26813,98	1	26813,98	1123,73	< 0,0001
Residual	167,03	7	23,86		
Lack of Fit	79,92	3	26,64	1,22	0,4101
Sai số	87,11	4	21,78		
SS tổng số	83117,93	16			

Ghi chú: SS: Tổng phương sai; DF: Bậc tự do; MS: Trung bình phương sai; Chuẩn F: Chuẩn Fisher; Residual: Phần dư; “Lack of Fit”: Chuẩn đánh giá độ không tương thích của mô hình với thực nghiệm.

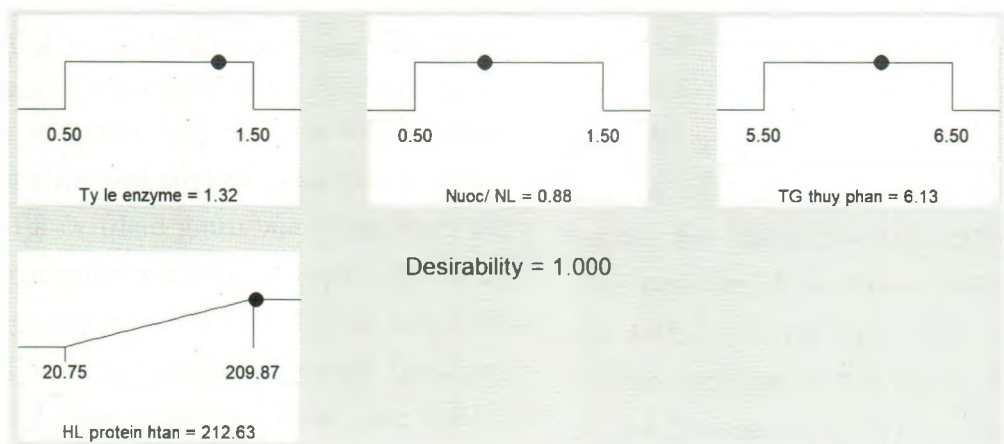
Kiểm tra sự có ý nghĩa và sự tương thích của mô hình được tiến hành bằng phân tích bảng 5, phân tích ANOVA cho thấy giá trị xác suất của mô hình P-value < 0,0001 < 0,05 do đó mô hình được lựa chọn có ý nghĩa. Hệ số hồi quy R² = 0,9954. Kết quả này cho thấy, có 99,54% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán của mô hình. Sử dụng phương pháp hàm kỳ vọng để tối ưu hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được từ dịch thủy phân trứng cầu gai bằng phần mềm Design-Expert (DX 7.1.5). Hình 1 cho thấy, mô hình tương tác giữa tỉ lệ enzyme và thời gian thủy phân (tỉ lệ nước/nguyên liệu được giữ ở mức trung bình) là

lớn nhất, tiếp đến đó mô hình tương tác giữa tỉ lệ enzyme và tỉ lệ nước/nguyên liệu (thời gian thủy phân được giữ ở mức trung bình) và ít tương tác nhất mô hình tương tác giữa tỉ lệ nước/nguyên liệu và thời gian thủy phân (tỉ lệ enzym được giữ ở mức trung bình). Trong đó, phương án tốt nhất để cực đại hàm mục tiêu là: tỉ lệ enzyme 1,32%, tỉ lệ nước/nguyên liệu 0,88/1,0 mL/g nguyên liệu, thời gian thủy phân 6,13 giờ. Khi đó hàm lượng protein hoà tan tổng số đạt được trong các điều kiện trên theo tính toán là 212,63 mg/g trứng cầu gai (Hình 1) kết quả này có độ tương thích cao so với kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm.



Hình 1. Bề mặt đáp ứng hàm lượng protein hoà tan tổng số

- (a): Mô hình tương tác giữa tỉ lệ enzyme và tỉ lệ nước/nguyên liệu (thời gian thủy phân được giữ ở mức trung bình)
- (b): Mô hình tương tác giữa tỉ lệ enzyme và thời gian thủy phân (tỉ lệ nước/nguyên liệu được giữ ở mức trung bình)
- (c): Mô hình tương tác giữa tỉ lệ nước/nguyên liệu và thời gian thủy phân (tỉ lệ enzyme được giữ ở mức trung bình)



Hình 2. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu hàm lượng protein hoà tan tổng số

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này tỉ lệ nước/nguyên liệu, tỉ lệ enzyme Alcalase bổ sung, thời gian xử lý đều ảnh hưởng tới quá trình thu nhận protein hoà tan tổng số từ quá trình thủy phân cầu gai đen. Ở điều kiện nghiên cứu đơn nhân tố, các thông số phù hợp nhất tương ứng là 1/1 (w/v), 1% và 6 giờ. Dựa

trên các nghiên cứu đơn nhân tố, đã tìm được điều kiện tối ưu quá trình thủy phân protein từ trứng cầu gai đen bao gồm nồng độ enzyme 1,32%, tỉ lệ nước/nguyên liệu là 0,88/1 (mL/g), thời gian thủy phân là 6,13 giờ. Trong điều kiện này hàm lượng protein hoà tan tổng số đạt 212,63 mg/g nguyên liệu trứng cầu gai đen tăng 2,58 lần so với hàm

lượng protein hòa tan ban đầu của mẫu trứng cầu gai nguyên liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M. Agnello (2017). Introductory Chapter: Sea Urchin-Knowledge and Perspectives, in Sea Urchin-From Environment to Aquaculture and Biomedicine. *Ed. InTech*. doi: 10.5772/intechopen.70415.
2. C. M. C. Woods., P. J. James., G. A. Moss., J. Wright, and S. Siikavuopio (2008). A comparison of the effect of urchin size and diet on gonad yield and quality in the sea urchin *Evechinus chloroticus* Valenciennes, *Aquac. Int.* Vol. 16, no. 1, pp. 49-68, Feb. 2008. doi: 10.1007/s10499-007-9124-z.
3. X.-H. Shang *et al.* (2014). Traditional Chinese Medicine Sea Urchin. *Mini-Rev. Med. Chem.* Vol. 14, no. 6, pp. 537-542, May 2014. doi: 10.2174/1389557514666140529224147.
4. A. Archana and K. R. Babu (2016). Nutrient composition and antioxidant activity of gonads of sea urchin *Stomopneustes variolaris*. *Food Chem.* Vol. 197, pp. 597-602, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.003.
5. Sten. I. Siikavuopio, T. Dale, and M. Carlehög (2007). Sensory quality of gonads from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, fed different diets. *J. Shellfish Res.* Vol. 26, no. 2, pp. 637-643, Aug. 2007, doi: 10.2983/0730-8000(2007)26[637:SQOGFT]2.0.CO;2.
6. N. Kalogeropoulos, A. Mikellidi, T. Nomikos, and A. Chiou (2012). Screening of macro- and bioactive microconstituents of commercial finfish and sea urchin eggs. *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 46, no. 2, pp. 525-531, May 2012, doi: 10.1016/j.lwt.2011.11.014.
7. E. Ya. Kostetsky, P. V. Velansky, and N. M. Sanina (2012). Phospholipids of the organs and tissues of echinoderms and tunicates from peter the great bay (Sea of Japan), *Russ. J. Mar. Biol.* Vol. 38, no. 1, pp. 64-71, Jan. 2012, doi: 10.1134/S1063074012010099.
8. Kovalev, N. N.; Kryzhanovsky, S. P.; Kostetsky, E. Y.; Kuznetsova, T. A.; Besednova, N. N. (2016). Sea Urchins: Biomedical Aspects of Practical Application; Dalnauka Publishing House: Vladivostok, Russia. *Dalnauka Publ. House Vladivostok Russ.* 2016. Vol. 128 ISBN 978-5-8044-1590-8.
9. J. Mamelona, É. Pelletier, K. Girard-Lalancette, J. Legault, S. Karboune, and S. Kermasha (2011). Antioxidants in digestive tracts and gonads of green urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *J. Food Compos. Anal.* Vol. 24, no. 2, pp. 179-183, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.jfca.2010.09.010.
10. Nevinsky GA, Soboleva SE, Menzorova NI, Burkova EE, Seytkalieva AV, and *et al.* (2017). Sea Urchins Proteins, Enzymes, their Complexes and Functioning. *Biochem Mol Biol.* Vol7. No 416.
11. Md. S. Islam, H. Wang, H. Admassu, A. A. Sulieman, and F. A. Wei (2022). Health benefits of bioactive peptides produced from muscle proteins: Antioxidant, anti-cancer, and anti-diabetic activities. *Process Biochem.* Vol. 116, pp. 116-125, May 2022, doi: 10.1016/j.procbio.2022.03.007.
12. T. J. Ashaolu (2022). Applications of soy protein hydrolysates in the emerging functional foods: a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* Vol. 55, no. 2, pp. 421-428, Feb. 2020, doi: 10.1111/ijfs.14380.
13. G. E. P. Box and K. B. Wilson (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* Vol. 13, no. 1, pp. 1-38, Jan. 1951, doi: 10.1111/j.2517-6161.1951.tb00067.x.
14. O. L. Awuor, M. Edward Kirwa, M. Betty, and M. F. Jackim (2017). Optimization of Alcalase hydrolysis conditions for production of Dagaa (*Rastrineobola argentea*) Protein hydrolysate with antioxidative properties. *Ind. Chem.* Vol. 03, no. 01, 2017, doi: 10.4172/2469-9764.1000122.
15. B. Mbatia, D. Adlercreutz, P. Adlercreutz, A. Mahadhy, F. Mulaa, and B. Mattiasson (2010). Enzymatic oil extraction and positional analysis of ω -3 fatty acids in Nile perch and salmon heads.

Process Biochem. Vol. 45, no. 5, pp. 815–819, May 2010, doi: 10.1016/j.procbio.2010.02.010.

16. Dinh Thi Kim Hoa, Luu Hong Son, Nguyen Thi Tinh, Ta Thi Luong, Nguyen Xuan Vu, Doan Thi Lan and Phuong (2021). Optimization of enzymatic protein hydrolysis conditions of sea urchin *Tripterygion* gratilla by using Alcalase. National Conference on Biotechnology 2021.

17. M. Islam, Y. Huang, S. Islam, B. Fan, L. Tong, and F. Wang (2022). Influence of the Degree of Hydrolysis on Functional Properties and Antioxidant Activity of Enzymatic Soybean Protein Hydrolysates. *Molecules*. Vol. 27, no. 18, p. 6110, Sep. 2022, doi: 10.3390/molecules27186110.

18. A. Y. T. Putra, D. F. Rosida, and A. D. Priyanto (2021). Influence of enzyme concentration and hydrolysis time on soluble protein content of protein hydrolysate prepared from apple snail (*Pila ampullacea*). *Int. J. Eco-Innov. Sci. Eng.*, vol. 2, no. 02, pp. 26–29, Nov. 2021, doi: 10.33005/ijeise.v2i02.46.

19. A. Noman *et al.* (2019). Influence of degree of hydrolysis on chemical composition, functional properties, and antioxidant activities of chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) hydrolysates obtained by using alcalase 2.4L. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* Vol. 28, no. 6, pp. 583–597, Jul. 2019, doi: 10.1080/10498850.2019.1626523.

THE RESEARCH ON THE OPTIMIZATION OF PROTEIN HYDROLYSIS FROM EGG OF SEA URCHIN *Diadema savignyi* BY ALCALASE

Doan Lan Phuong^{1,*}, Dinh Thi Kim Hoa^{2,3},

Luu Hong Son³, Nguyen Lan Nhi⁴

¹*Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology*

^{2,3}*Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University*

⁴*Phenikaa University*

Summary

Sea urchin *Diadema savignyi* is a typical invertebrate of the phylum Echinodermata of marine animals living in shallow tropical waters, in Vietnam, it is often called by the name black sea urchin. Black sea urchin eggs are considered a nutritious food because they contain high levels of lipids and proteins, especially full of essential fatty acids and amino acids. Analysis of protein composition showed that in sea urchin eggs, there are all essential amino acids such as valine, leucine, isoleucine, threonine, methionine, phenylalanine, lysine and histidine. Today, the use of enzymes to hydrolyze proteins is an effective processing method in the food industry to improve the nutritional quality of products. Hydrolysis has the effect of breaking peptide bonds to convert long-chain proteins into oligopeptides, short-chain peptides and free amino acids, which will help improve the absorption of these nutrients for humans and animals. This report refers to the research on optimizing the parameters of the hydrolysis of black sea urchin eggs that has initial soluble protein of 82.43 ± 0.17 mg/g. First of all, the results of research on the influence of single factors on the hydrolysis of *Diadema savignyi* eggs by Alcalase enzyme are presented, thereby selecting the technological factors that have the greatest influence on the soluble protein content for optimizing hydrolysis. The results show the ratio of water/material; the percentage of enzyme addition and hydrolysis time are the factors that most affect the hydrolysis of black sea urchin eggs. Optimal conditions were found including: water/material ratio 0.88/1.0 (mL/g); the percentage of additional enzymes is 1.32%; hydrolysis time is 6.13 hours. With this optimal condition, the total soluble protein content was 212.63 mg/g that increased 2.58 times compared with the initial soluble protein of fresh black sea urchin egg material.

Keywords: *Diadema savignyi*, soluble protein, hydrolyzed, optimized, sea urchin egg.

Người phản biện: TS. Đỗ Văn Nam

Ngày nhận bài: 20/02/2023

Ngày thông qua phản biện: 18/4/2023

Ngày duyệt đăng: 28/4/2023