



## NGHIÊN CỨU CHẾ ĐỘ THỦY PHÂN ĐẦU CÁ LÓC (*Channa striata*) THU HỒI DỊCH ĐẠM BẰNG ENZYME FLAVOURZYME

Trương Thị Mộng Thu<sup>1\*</sup>, Nguyễn Văn Mười<sup>2</sup> và Lê Thị Minh Thủy<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Nghiên cứu sinh Ngành Công nghệ Thực phẩm Khóa 2020, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup>Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trương Thị Mộng Thu (email: ttmthu@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 23/02/2021

Ngày nhận bài sửa: 15/03/2021

Ngày duyệt đăng: 28/04/2021

### Title:

The study of the hydrolysis conditions on the recovery of fish protein hydrolysate from snakehead fish (*Channa striata*) head underline flavourzyme

### Từ khóa:

Dịch đạm, đầu cá lóc, flavourzyme, thủy phân

### Keywords:

Fish protein hydrolysate, flavourzyme, hydrolysis, snakehead fish head

### ABSTRACT

Fish protein hydrolysate was performed from snakehead fish head by using flavourzyme. The research included four experiments: (i) the effects of the ratio of material: water (1:0.3; 1:0.8; 1:1.8; 1:2.8 and 1:3.8 w/v), (ii) the ratio of flavourzyme to material (0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.0 and 1.2%), (iii) the hydrolysis time (12, 18, 24, 30 and 36 hours), and (iv) the hydrolysis temperature (30, 40, 50, 60 and 70°C) on the quality of fish protein hydrolysate. The results showed that fish protein hydrolysate had the highest amino acid content, nitrogen recovery and degree of hydrolysis were 6.49 g/L, 42.5% and 39.1%, respectively whereas ammonia content was the lowest at 0.205 g/L when fish head was hydrolysed at the ratio of material: water of 1:0.8 and the ratio of flavourzyme to material of 0.6% for 30 hours at 50°C.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu sản xuất dịch đạm thủy phân từ đầu cá lóc bằng enzyme flavourzyme được thực hiện gồm bốn thí nghiệm (i) ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu: nước (1:0,3; 1:0,8; 1:1,8; 1:2,8 và 1:3,8 w/v), (ii) tỷ lệ enzyme flavourzyme so với nguyên liệu (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 và 1,2%), (iii) thời gian thủy phân (12, 18, 24, 30 và 36 giờ) và (iv) nhiệt độ thủy phân (30, 40, 50, 60 và 70°C) đến chất lượng dịch đạm thủy phân. Kết quả cho thấy dịch đạm thủy phân có hàm lượng đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân cao nhất lần lượt là 6,49 g/L; 42,5% và 39,1% trong khi hàm lượng ammonia thấp nhất là 0,205 g/L khi đầu cá lóc được thủy phân với tỷ lệ nguyên liệu: nước là 1: 0,8 và tỷ lệ enzyme flavourzyme so với nguyên liệu là 0,6% trong 30 giờ ở nhiệt độ 50°C.

## 1. GIỚI THIỆU

Sản phẩm thủy sản trên toàn cầu đang gia tăng hàng năm và đạt 179 triệu tấn năm 2018 (FAO, 2020). Tuy nhiên, trong quá trình chế biến thủy sản, đặc biệt là quá trình chế biến cá, hiệu suất thu hồi thịt cá chỉ xấp xỉ 40%. Như vậy, lượng phụ phẩm thải ra chiếm khoảng 60% tổng khối lượng nguyên

liệu bao gồm đầu, xương, vây, đuôi, nội tạng, thịt vụn,... bị loại ra trong quá trình chế biến (Ghaly et al., 2013). Phụ phẩm thủy sản chứa một lượng đáng kể protein bổ dưỡng và dễ tiêu hóa do có sự cân bằng tốt giữa các amino acid thiết yếu so với protein có nguồn gốc từ thực vật. Do đó, có thể tận dụng protein từ phụ phẩm thủy sản để sản xuất sản phẩm giá trị gia tăng. Tùy thuộc vào mức độ thủy phân,

protein được phân giải thành hỗn hợp các polypeptide, peptide mạch ngắn và amino acid được ứng dụng trong chế biến chế phẩm sinh học, đáp ứng chức năng sinh lý cho cơ thể người hoặc sản phẩm chứa amino acid có giá trị dinh dưỡng cao (Chalamaiah et al., 2012). Việc sử dụng enzyme protease để thủy phân protein từ nguyên liệu và phụ phẩm thủy sản thu hồi protein đã và đang được xem là một trong những phương pháp hiệu quả nhất. Các enzyme được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu thủy phân là alcalase, flavourzyme, neutrase, protamex và kojizyme (Nguyen et al., 2011). Trong đó, enzyme flavourzyme có nguồn gốc từ nấm mốc *Aspergillus oryzae* (Kammerdpetch et al., 2007) và có cả hai hoạt tính endoprotease và exoprotease nhưng chủ yếu là exoprotease, nên khả năng thủy phân protein cao trong điều kiện trung tính hoặc acid nhẹ. Nhờ vào hoạt tính exoprotease của flavourzyme, có thể làm giảm vị đắng của sản phẩm thủy phân và vị ngọt đậm của sản phẩm được nâng lên (Chiang et al., 2019). Do đó, nhiều nghiên cứu sử dụng enzyme flavourzyme trong thủy phân protein từ nguyên liệu thủy sản đã được thực hiện như Đỗ Trọng Sơn và ctv. (2013) đã nghiên cứu thủy phân đầu cá chêm (*Lates calcarifer*) bằng enzyme flavourzyme thu được dịch đậm có hàm lượng protein cao. Nguyễn Thị Mỹ Hương (2014) cũng đã khảo sát thành phần dinh dưỡng của các sản phẩm thủy phân từ đầu và xương cá chêm (*Lates calcarifer*) bằng enzyme flavourzyme. Đỗ Thị Thanh Thủy và Nguyễn Anh Tuấn (2017) đã ứng dụng hỗn hợp alcalase và flavourzyme để thủy phân cá nục gai (*Decapterus ruselli*) thu hồi dịch đậm thủy phân. Nguyễn Thị Mỹ Hương và Đặng Thị Thu Hương (2013) nghiên cứu thủy phân sò lông (*Anadara antiquata*) bằng kết hợp enzyme protamex và flavourzyme. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu ứng dụng enzyme flavourzyme thủy phân đầu cá lóc thu hồi protein. Vì vậy, đề tài ‘‘Nghiên cứu chế độ thủy phân đầu cá lóc (*Channa striata*) thu hồi dịch đậm bằng enzyme flavourzyme’’ được thực hiện nhằm sản xuất sản phẩm dịch đậm đạt chất lượng dinh dưỡng tốt, tận dụng và nâng cao giá trị kinh tế phụ phẩm cá lóc, đồng thời giảm ô nhiễm môi trường.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Phụ phẩm cá lóc (gồm đầu, xương, vây và nội tạng) được mua tại cơ sở khô cá lóc 7 Chóp (Thoại Sơn, An Giang). Phụ phẩm được thu gom tại cơ sở, cho vào tủ đông ở nhiệt độ  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$  trong thời gian

ít nhất 6 giờ để đảm bảo nguyên liệu đông lại và đóng thùng chuyển về phòng thí nghiệm Bộ môn Chế biến Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ không quá 6 giờ.

Flavourzyme là enzyme protease được sản xuất bởi Công ty Novozyme của Đan Mạch, được nhập khẩu và cung cấp bởi Công Ty TNHH TM Nông sản Và Hóa chất Phương Trâm (Thành phố Hồ Chí Minh), có hoạt độ là  $> 3500$  LAPU (leucine aminopeptidase aunits)/g, điều kiện hoạt động thích hợp là  $50-55^{\circ}\text{C}$ , pH 5,0-7,0 tùy thuộc vào cơ chất.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Cách chuẩn bị mẫu

Phụ phẩm sau khi mua về được tách riêng đầu cá và rửa sạch nhớt, máu bằng nước muối loãng, loại bỏ mắt, nắp mang, mang, răng miệng và bông nhớt. Đầu cá lóc được bảo quản lạnh đông ở nhiệt độ  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Khi tiến hành thí nghiệm, đầu cá được rã đông, cắt nhỏ bằng kéo và xay nhuyễn trong 10 giây, xay 5 lần bằng máy xay sinh tố Bluestone BLB-5329, xay ở mức cao nhất của máy (mức 2).

#### 2.2.2. Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu so với nước đến chất lượng dịch đậm từ đầu cá lóc

Đầu cá lóc được xử lý theo mục 2.2.1 và tiến hành thí nghiệm với 3 lần lặp lại, 5 nghiệm thức, tổng số mẫu thí nghiệm là 15, khối lượng 40 g đầu cá xay/mẫu. Tiến hành thủy phân với một nhân tố tỷ lệ đầu cá xay: nước là 1:0,3; 1:0,8; 1:1,8; 1:2,8 và 1:3,8 (w/v). Bổ sung 20% ethanol 95° so với khối lượng đầu cá. Sử dụng ethanol như chất phòng thối trong quá trình thủy phân theo nghiên cứu của Lý Thị Minh Phương (2011). Điều kiện thủy phân cố định là tỷ lệ enzyme flavourzyme so với nguyên liệu là 0,6%, thời gian 24 giờ, nhiệt độ  $50^{\circ}\text{C}$  và pH tự nhiên của nguyên liệu (pH 6,5-6,9).

Sau khi kết thúc quá trình thủy phân, bất hoạt enzyme ở nhiệt độ  $95^{\circ}\text{C}$  trong 10 phút, lọc qua rây để loại bã đầu và thu phần dịch lọc. Phần dịch lọc được ly tâm với tốc độ 7.500 vòng/phút trong 30 phút ở  $4^{\circ}\text{C}$ . Sau ly tâm tách thành 3 lớp: lớp lipid phía trên cùng, lớp dịch đậm ở giữa và lớp rắn dưới đáy. Tiến hành phân tích các chỉ tiêu như hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitrogen trong phần dịch đậm nhằm tìm được tỷ lệ đầu cá so với nước thích hợp nhất.

#### 2.2.3. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme flavourzyme đến chất lượng dịch đậm từ đầu cá lóc

Thí nghiệm được thực hiện kế thừa quy trình và kết quả thí nghiệm 1, tiến hành thủy phân đầu cá với

6 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, tổng số mẫu thí nghiệm là 18, khối lượng 40 g đầu cá xay/mẫu. Thí nghiệm được thực hiện với 1 nhân tố tỷ lệ enzyme flavourzyme so với đầu cá thay đổi lần lượt là 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 và 1,2% (w/w) tương ứng với 30, 60, 90, 120, 150 và 180 U/g protein. Điều kiện thủy phân cố định là thời gian 24 giờ, nhiệt độ 50°C và pH tự nhiên của nguyên liệu (pH 6,5-6,9). Sau khi kết thúc quá trình thủy phân, bất hoạt enzyme, lọc và ly tâm như thí nghiệm 1 thu được dịch đậm. Các chỉ tiêu phân tích dịch đậm như thí nghiệm 1.

#### 2.2.4. Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến chất lượng dịch đậm từ đầu cá lóc

Thí nghiệm được thực hiện kế thừa quy trình và kết quả thí nghiệm 1 và 2, tiến hành thí nghiệm với 5 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, tổng số mẫu thí nghiệm là 15, khối lượng 40 g đầu cá xay/mẫu. Thí nghiệm được thực hiện với 1 nhân tố thời gian thủy phân thay đổi lần lượt là 12, 18, 24, 30 và 36 giờ. Điều kiện thủy phân cố định là nhiệt độ 50°C và pH tự nhiên của nguyên liệu (pH 6,5-6,9). Sau khi kết thúc quá trình thủy phân, bất hoạt enzyme, lọc và ly tâm như thí nghiệm 1 thu được dịch đậm. Các chỉ tiêu phân tích dịch đậm như thí nghiệm 1.

#### 2.2.5. Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến chất lượng dịch đậm từ đầu cá lóc

Thí nghiệm được thực hiện kế thừa quy trình và kết quả thí nghiệm 1, 2 và 3, tiến hành thí nghiệm với 5 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, tổng số mẫu thí nghiệm là 15, khối lượng 40 g đầu cá xay/mẫu. Thí nghiệm được thực hiện với 1 nhân tố nhiệt độ thủy phân (30, 40, 50, 60 và 70°C). Thủy phân ở pH tự nhiên của nguyên liệu (pH 6,5-6,9). Sau khi kết thúc quá trình thủy phân, bất hoạt enzyme, lọc và ly tâm như thí nghiệm 1 thu được dịch đậm. Các chỉ tiêu phân tích dịch đậm như thí nghiệm 1.

### 2.3. Phương pháp phân tích

Hàm lượng protein của nguyên liệu đầu cá lóc và dịch thủy phân được xác định theo AOAC (2016). Xác định hàm lượng đạm amino acid và hàm lượng đạm ammonia theo Bộ Khoa học và Công nghệ (1990). Hoạt tính enzyme flavourzyme ban

đầu được xác định theo phương pháp của Cupp-Enyard (2008).

Độ thủy phân (DH %) được xác định bằng phương pháp OPA (o-phthalaldehyde), dựa trên nguyên tắc các nhóm amin của amino acid hoặc peptide phản ứng với Ortho-phthaldialdehyde với sự có mặt của -SH của dithiothreitol hoặc mercaptoethanol sẽ tạo ra hợp chất có khả năng hấp thụ ở bước sóng 340 nm (Nielsen et al., 2001).

Hiệu suất thu hồi nitrogen (NR %) được xác định theo phương pháp của Wang et al. (2018) với công thức tính như sau:  $NR (\%) = \frac{[(\text{Hàm lượng nitrogen tổng số trong dịch thủy phân})/(\text{Hàm lượng nitrogen tổng số trong nguyên liệu})] * 100}{100}$ .

### 2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập được tính trung bình, độ lệch chuẩn sử dụng chương trình Microsoft Excel 2010. Kết quả được tính toán thống kê, phương pháp phân tích phương sai ANOVA theo kiểm định Duncan để kết luận về sự khác biệt giữa trung bình các nghiệm thức với độ tin cậy 95% bằng phần mềm SPSS 18.0.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu so với nước đến chất lượng dịch đậm thủy phân từ đầu cá lóc

Quá trình thủy phân là quá trình phá vỡ các liên kết peptide khi có mặt của nước. Do liên kết peptide là liên kết bền nên quá trình thủy phân cần có mặt của chất xúc tác. Các tác nhân xúc tác gồm tác nhân hóa học là các acid hay base và tác nhân sinh học là các enzyme thủy phân protein (Nguyễn Đức Lượng và ctv., 2004). Nước không những ảnh hưởng đến vận tốc phản ứng mà còn ảnh hưởng đến chiều hướng thủy phân (Godinho et al., 2016). Kết quả ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu so với nước đến chất lượng dịch đậm từ đầu cá lóc đến hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitrogen được thể hiện trong Bảng 1.

Tỷ lệ nguyên liệu: nước tăng từ 1:0,3 lên 1:3,8 thì hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân có sự thay đổi và khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị *p* tương ứng lần lượt là 0,000; 0,000; 0,000 và 0,000 được thể hiện trong Bảng 1.

**Bảng 1. Hàm lượng đạm ammonia (N<sub>NH3</sub>), đạm amino acid (N<sub>aa</sub>), độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR) theo tỷ lệ nguyên liệu so với nước**

Tỷ lệ NL: N (w/v)	N <sub>NH3</sub> (g/L)	N <sub>aa</sub> (g/L)	DH (%)	NR (%)
1: 0,3	0,261±0,012 <sup>c</sup>	6,30±0,14 <sup>a</sup>	25,7±1,36 <sup>b</sup>	40,3±0,82 <sup>b</sup>
1: 0,8	0,221±0,011 <sup>c</sup>	6,25±0,16 <sup>a</sup>	38,1±1,18 <sup>a</sup>	42,8±0,93 <sup>a</sup>
1: 1,8	0,264±0,019 <sup>b</sup>	4,95±0,08 <sup>b</sup>	21,8±1,33 <sup>c</sup>	28,9±1,07 <sup>c</sup>
1: 2,8	0,287±0,013 <sup>b</sup>	4,01±0,16 <sup>c</sup>	15,9±1,86 <sup>d</sup>	21,2±1,11 <sup>d</sup>
1: 3,8	0,365±0,011 <sup>a</sup>	3,78±0,14 <sup>c</sup>	9,19±1,55 <sup>e</sup>	19,6±0,82 <sup>e</sup>
P value	0,000	0,000	0,000	0,000

Trong cùng một cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn, n=3. NL: N (nguyên liệu: nước)

Bảng 1 cho thấy việc bổ sung nước ở các tỷ lệ khác nhau có ảnh hưởng đến hiệu quả thủy phân thu hồi protein từ đầu cá lóc với sự góp mặt của enzyme flavourzyme. Khi tăng tỷ lệ đầu cá: nước từ 1:0,3 lên 1:0,8 (w/v) thì độ thủy phân tăng từ 25,7 lên 38,1%; hiệu suất thu hồi nitrogen tăng từ 40,3 lên 42,8% và khác biệt có ý nghĩa thống kê, nhưng hàm lượng đạm amino acid không khác biệt. Nguyên nhân là do nước là môi trường để phân tán enzyme và cơ chất, đồng thời tham gia trực tiếp vào quá trình thủy phân (Lương Hữu Đồng, 1975). Vì vậy, khi tăng lượng nước bổ sung trước khi thủy phân dẫn đến tăng khả năng tiếp xúc giữa enzyme protease và cơ chất làm tăng quá trình phân giải protein (Nguyễn Thị Huỳnh Hoa & Đồng Thị Anh Đào, 2016). Tuy nhiên, khi tăng tỷ lệ đầu cá: nước từ 1:0,8 đến 1:3,8 (w/v) thì hàm lượng đạm amino acid, độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitrogen giảm từ 6,25 g/L; 38,1% và 42,8% xuống còn 3,78 g/L; 9,19% và 19,6% và khác biệt có ý nghĩa thống kê. Hàm lượng đạm ammonia tăng từ 0,261 lên 0,365 g/L khi tỷ lệ đầu cá: nước từ 1:0,3 đến 1:3,8 (w/v). Lượng nước bổ sung quá nhiều sẽ làm loãng nồng độ enzyme và cơ chất nên hiệu suất thủy phân giảm, đồng thời khó kiểm soát quá trình thủy phân tạo điều kiện cho vi sinh vật gây thối hoạt động phân hủy amino acid sinh ra nhiều sản phẩm cấp thấp như NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, indol, scaptol,... nên hàm lượng đạm amino acid và hiệu suất thu hồi nitrogen giảm và hàm lượng đạm ammonia tăng (Nguyễn Trọng Cần và ctv., 1998). Cùng tỷ lệ nguyên liệu so với nước là 1:1, Đỗ Thị Thanh Thủy và Nguyễn Anh Tuấn (2013) đã nghiên cứu chế độ thủy phân thu hồi dịch đạm hòa tan giàu amino acid từ protein cá tạp bằng hỗn hợp protamex và flavourzyme cho độ thủy phân (60,5%) và hàm lượng đạm amino acid (13,27 g/L) cao hơn nghiên cứu này. Nguyên nhân có thể là do sử dụng nguồn nguyên liệu từ thịt cá có thể dẫn đến nồng độ cơ chất

(protein) cao hơn phụ phẩm, vì vậy hàm lượng amino acid trong dịch thủy phân cao hơn (Ghaly et al., 2013). Kết hợp protamex và flavourzyme có thể giúp tăng hiệu quả quá trình thủy phân, vì vậy độ thủy phân cao hơn khi sử dụng enzyme flavourzyme riêng lẻ. Protamex là endoprotease thủy phân protein tạo ra nhiều đoạn peptide với đầu-C và đầu-N càng nhiều, tạo điều kiện thuận lợi cho hoạt động của flavourzyme có cả hai tính chất là endoprotease và exoprotease (Chiang et al., 2019).

Nghiệm thức với tỷ lệ nguyên liệu: nước là 1:0,8 (w/v) có hàm lượng đạm amino acid, độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitrogen cao nhất lần lượt là 6,25 g/L; 38,1% và 42,8% và hàm lượng đạm ammonia thấp nhất là 0,221 g/L nên chọn làm thông số thích hợp cho thí nghiệm tiếp theo.

**3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme flavourzyme so với nguyên liệu đến chất lượng dịch đạm**

Sản phẩm thủy phân protein từ phụ phẩm thủy sản có hàm lượng amino acid cao, đặc biệt là các amino acid không thay thế có giá trị dinh dưỡng, rất cần thiết cho cơ thể con người và động vật. Sự khác nhau về hàm lượng protein và amino acid trong sản phẩm thủy phân phụ thuộc chủ yếu vào nguyên liệu, loại enzyme, nồng độ enzyme và điều kiện thủy phân (Ghaly et al., 2013). Hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, độ thủy phân, hiệu suất thu hồi nitrogen theo tỷ lệ enzyme flavourzyme so với đầu cá được thể hiện trong Bảng 2.

Tỷ lệ enzyme flavourzyme so với nguyên liệu thay đổi từ 0,2 đến 1,2% thì hàm lượng đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân có sự thay đổi và khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị p tương ứng lần lượt là 0,000; 0,000 và 0,000, tuy nhiên hàm lượng đạm ammonia không khác biệt có ý nghĩa thống kê (p=0,501) (Bảng 2).



**Bảng 2. Hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, độ thủy phân, hiệu suất thu hồi nitrogen theo tỷ lệ enzyme flavourzyme so với đầu cá (E/S)**

E/S (%)	N <sub>NH3</sub> (g/L)	N <sub>aa</sub> (g/L)	DH (%)	NR (%)
0,2	0,231±0,007 <sup>ns</sup>	3,87±0,21 <sup>e</sup>	26,0±1,52 <sup>c</sup>	33,1±1,20 <sup>c</sup>
0,4	0,241±0,024 <sup>ns</sup>	4,34±0,14 <sup>d</sup>	31,1±1,23 <sup>b</sup>	39,4±1,55 <sup>b</sup>
0,6	0,254±0,010 <sup>ns</sup>	6,30±0,14 <sup>a</sup>	38,7±1,99 <sup>a</sup>	42,3±1,21 <sup>a</sup>
0,8	0,246±0,012 <sup>ns</sup>	6,25±0,08 <sup>ab</sup>	38,3±1,23 <sup>a</sup>	40,9±1,99 <sup>ab</sup>
1,0	0,250±0,007 <sup>ns</sup>	6,02±0,14 <sup>bc</sup>	36,3±1,43 <sup>a</sup>	39,9±1,19 <sup>ab</sup>
1,2	0,247±0,010 <sup>ns</sup>	5,83±0,08 <sup>c</sup>	37,2±0,72 <sup>a</sup>	39,0±1,61 <sup>b</sup>
P value	0,501	0,000	0,000	0,000

Trong cùng một cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn, n=3

Từ kết quả trên Bảng 2, khi tỷ lệ enzyme flavourzyme so với đầu cá tăng từ 0,2% đến 0,6% thì hàm lượng đạm amino acid, độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitrogen trong dịch thủy phân cũng tăng từ 3,87 g/L; 26,0% và 33,1% lên 6,30 g/L; 38,7% và 42,3% và khác biệt có ý nghĩa thống kê. Nguyên nhân là do enzyme flavourzyme có cả hai hoạt tính endoprotease và exoprotease, endoprotease thủy phân cả cấu trúc bậc hai và bậc ba của phân tử protein, tiếp tục quá trình thủy phân giải phóng ra amino acid tự do, dipeptide hoặc tripeptide với sự cắt mạch peptide từ đầu-C và đầu-N dưới hoạt động của exoprotease (Chiang et al., 2019). Nên khi tăng tỷ lệ enzyme so với nguyên liệu sẽ thúc đẩy quá trình phân cắt mạch polypeptide mạnh mẽ để tạo thành các peptide ngắn hơn và các amino acid hòa tan trong dịch thủy phân, dẫn đến độ thủy phân, hiệu suất thu hồi nitrogen và đạm amino acid tăng theo, xu hướng này khá tương thích với sự giải thích của Guérard et al. (2002) và Nguyen et al. (2011). Tuy nhiên, khi tỷ lệ enzyme tăng từ 0,6% đến 1,2% thì hàm lượng đạm amino acid và hiệu suất thu hồi nitrogen giảm từ 6,30 g/L và 42,3% xuống còn 5,83 g/L và 39,0%, nhưng độ thủy phân không khác biệt. Hàm lượng đạm ammonia không khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p=0,501$ ) khi tỷ lệ enzyme alcalase tăng từ 0,2% lên 1,2%. Khi tỷ lệ enzyme tăng, tốc độ phản ứng tăng đến một giá trị giới hạn nhất định. Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng tỷ lệ enzyme, tốc độ phản ứng thủy phân bởi enzyme tăng không đáng kể có thể là do bão hòa cơ chất (Salwanee et al., 2013). Bên cạnh đó, hàm lượng đạm amino acid và hiệu suất thu hồi nitrogen giảm là do các sản phẩm của quá trình thủy phân (các peptide mạch ngắn) có thể tác dụng ngược lại với enzyme, chúng có thể đóng vai trò như chất kim hãm không cạnh tranh khi enzyme có ái lực với cả các sản phẩm tạo thành của quá trình thủy phân và cơ chất (Copeland, 2000).

Khi tỷ lệ enzyme flavourzyme so với nguyên liệu là 0,6% thì độ thủy phân cao nhất đạt 38,7% trong nghiên cứu này cao hơn, nhưng hiệu suất thu hồi nitrogen đạt 42,3% thấp hơn nghiên cứu của Đỗ Trọng Sơn và ctv. (2013) đã sử dụng 0,5% flavourzyme để thủy phân đầu cá chêm (*Lates calcarifer*) với độ thủy phân và hiệu suất thu hồi protein tương ứng là 29,86% và 62,58%. Tốc độ phản ứng thủy phân tăng đến một giới hạn nhất định khi tỷ lệ enzyme tăng. Vì vậy, độ thủy phân trong nghiên cứu này cao hơn nghiên cứu trước có thể là do tỷ lệ enzyme cao hơn (Whitehurst & Oort, 2009). Hàm lượng protein hòa tan trong dịch thủy phân phụ thuộc vào hàm lượng protein và lipid trong nguyên liệu đem thủy phân. Vì vậy, hiệu suất thu hồi protein khác nhau có thể là do thành phần hóa học của các loại nguyên liệu khác nhau, đặc biệt là hàm lượng protein (Thiansilakul et al., 2007).

Nghiệm thức có tỷ lệ enzyme flavourzyme so với nguyên liệu là 0,6% có hàm lượng đạm amino acid, độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitrogen cao nhất lần lượt là 6,30 g/L; 38,7% và 42,3% và hàm lượng đạm ammonia thấp là 0,254 g/L nên được chọn để tiến hành thí nghiệm tiếp theo.

### 3.3. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng enzyme flavourzyme đến chất lượng dịch đậm

Thời gian thủy phân là một trong những yếu tố có ảnh hưởng lớn và cần thiết để tạo ra nhiều sản phẩm mong muốn của quá trình thủy phân. Tuy nhiên, thời gian thủy phân quá dài hoặc quá ngắn cũng ảnh hưởng đến hiệu quả và chất lượng dịch đậm thủy phân (Nguyễn Đức Lượng và ctv., 2004). Kết quả hàm lượng đạm ammonia (N<sub>NH3</sub>), đạm amino acid (N<sub>aa</sub>), hiệu suất thu hồi nitrogen (NR) và độ thủy phân (DH) theo các mốc thời gian thủy phân đã bố trí được thể hiện ở Bảng 3.

**Bảng 3. Hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân theo thời gian thủy phân bằng enzyme flavourzyme**

Thời gian (giờ)	N <sub>NH3</sub> (g/L)	Naa (g/L)	NR (%)	DH (%)
12	0,226±0,022 <sup>b</sup>	5,23±0,08 <sup>d</sup>	35,9±1,50 <sup>c</sup>	31,1±1,43 <sup>c</sup>
18	0,220±0,010 <sup>b</sup>	5,46±0,14 <sup>c</sup>	37,1±1,46 <sup>bc</sup>	33,6±1,99 <sup>b</sup>
24	0,244±0,015 <sup>ab</sup>	6,21±0,08 <sup>b</sup>	39,0±1,86 <sup>b</sup>	35,8±1,89 <sup>ab</sup>
30	0,241±0,013 <sup>b</sup>	6,44±0,14 <sup>a</sup>	42,8±1,32 <sup>a</sup>	38,9±1,37 <sup>a</sup>
36	0,272±0,011 <sup>a</sup>	6,30±0,14 <sup>ab</sup>	40,2±1,08 <sup>ab</sup>	35,8±1,47 <sup>ab</sup>
P-value	0,020	0,000	0,005	0,008

Trong cùng một cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn, n=3

Thời gian thủy phân thay đổi từ 12 đến 36 giờ thì hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân có sự thay đổi và khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị *p* tương ứng lần lượt là 0,020; 0,000; 0,005 và 0,008 (Bảng 3).

Bảng 3 cho thấy khi tăng thời gian thủy phân từ 12 giờ lên 30 giờ thì đạm amino acid tăng từ 5,23 lên 6,44 g/L, độ thủy phân tăng từ 31,1 lên 38,9%, hiệu suất thu hồi nitrogen tăng từ 35,9 lên 42,8%, tuy nhiên hàm lượng đạm ammonia không khác biệt. Theo Nguyễn Văn Mười & Hà Thị Thụy Vy (2018), thời gian thủy phân cần đủ dài để enzyme phân cắt các liên kết trong cơ chất tạo thành các sản phẩm cần thiết. Vì vậy, khi tăng thời gian thủy phân dẫn đến quá trình cắt mạch peptide nhiều hơn, sinh ra nhiều peptide mạch ngắn và amino acid hòa tan vào trong dịch thủy phân nên hàm lượng amino acid và hiệu suất thu hồi nitrogen tăng (Liaset et al., 2002). Tuy nhiên, khi tăng thời gian thủy phân từ 30 lên 36 giờ thì đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân không khác biệt, nhưng đạm ammonia tăng và khác biệt có ý nghĩa thống kê. Điều này có thể là do quá trình thủy phân xảy ra nhanh ở giai đoạn đầu, nên một lượng lớn liên kết peptide dễ bị thủy phân bị cắt mạch trước, tốc độ thủy phân sau đó giảm dần và dừng lại khi các liên kết peptide ít dần và có thể do cơ chất (protein) đã hết (Nguyễn

Đức Lượng và ctv., 2004). Đồng thời, khi kéo dài thời gian thủy phân quá mức sẽ tạo điều kiện cho vi sinh vật gây thối hoạt động sinh ra nhiều sản phẩm cấp thấp như NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, indol, scaptol,... nên lượng đạm ammonia tăng (Trần Thị Bích Thủy & Đỗ Thị Thanh Thủy, 2016).

Nghiệm thức với thời gian thủy phân đầu cao nhất trong 30 giờ cho hàm lượng đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân cao nhất tương ứng lần lượt là 6,44 g/L, 42,8% và 38,9% và hàm lượng đạm ammonia thấp là 0,241 g/L nên được chọn để làm thông số thích hợp cho thí nghiệm tiếp theo.

**3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến chất lượng dịch đạm từ đầu cá lóc**

Tốc độ phản ứng thủy phân do enzyme bị ảnh hưởng rất nhiều bởi điều kiện nhiệt độ. Khi tăng nhiệt độ trong phạm vi thích hợp thì tốc độ phản ứng sẽ tăng, tuy nhiên tốc độ phản ứng chỉ tăng đến một giới hạn nhiệt độ nhất định, vượt qua giới hạn đó thì tốc độ phản ứng sẽ giảm và dẫn đến mức triệt tiêu do enzyme bị biến tính (Nguyễn Đức Lượng và ctv., 2004). Kết quả hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân theo các mức nhiệt độ thủy phân được thể hiện ở Bảng 4.

**Bảng 4. Hàm lượng đạm ammonia, đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân theo nhiệt độ thủy phân bằng enzyme flavourzyme**

Nhiệt độ (°C)	N <sub>NH3</sub> (g/L)	Naa (g/L)	NR (%)	DH (%)
30	0,232±0,021 <sup>ab</sup>	5,69±0,08 <sup>c</sup>	34,3±0,54 <sup>c</sup>	27,8±1,53 <sup>c</sup>
40	0,222±0,010 <sup>ab</sup>	6,16±0,14 <sup>b</sup>	37,3±0,62 <sup>b</sup>	32,7±1,29 <sup>b</sup>
50	0,205±0,006 <sup>b</sup>	6,49±0,08 <sup>a</sup>	42,5±0,82 <sup>a</sup>	39,1±1,14 <sup>a</sup>
60	0,227±0,026 <sup>ab</sup>	4,62±0,14 <sup>d</sup>	33,0±0,62 <sup>d</sup>	18,9±1,77 <sup>d</sup>
70	0,252±0,010 <sup>a</sup>	3,41±0,16 <sup>e</sup>	32,1±0,54 <sup>d</sup>	14,2±1,21 <sup>e</sup>
P-Value	0,087	0,000	0,000	0,000

Trong cùng một cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn, n=3

Nhiệt độ thủy phân thay đổi từ 30 đến 70°C thì hàm lượng đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân có sự thay đổi và khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị  $p$  tương ứng lần lượt là 0,000; 0,000 và 0,000, tuy nhiên hàm lượng đạm ammonia không khác biệt ( $p=0,087$ ) (Bảng 4).

Bảng 4 cho thấy khi nhiệt độ thủy phân tăng từ 30°C lên 50°C thì cả 3 chỉ tiêu đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân đều tăng và đạt cực đại tại 50°C. Cụ thể, hàm lượng đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân tăng tương ứng từ 5,69 g/L; 34,3% và 27,8% lên 6,49 g/L; 42,5% và 39,1% và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p<0,05$ ). Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng nhiệt độ lên 70°C thì lượng đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen, độ thủy phân giảm mạnh tương ứng còn 3,41 g/L; 32,1%; 14,2% và khác biệt có ý nghĩa thống kê. Hàm lượng đạm ammonia thay đổi không khác biệt ( $p=0,087$ ) khi nhiệt độ tăng từ 30 lên 70°C. Điều này có thể giải thích như sau khi tăng nhiệt độ thủy phân trong phạm vi thích hợp (từ 30 lên 50°C) thì có thể làm cho các phân tử protein hình cầu tháo xoắn, các nhóm kỵ nước giấu bên trong phân tử được lộ ra, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình thủy phân, dẫn đến tốc độ phản ứng thủy phân tăng (DeWit & Klarenbeek, 1984). Đồng thời, do các phân tử enzyme có động năng lớn hơn làm tăng cường khả năng tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất, do đó các liên kết peptide bị cắt mạch càng nhiều, tạo nhiều peptide và amino acid hòa tan trong dịch thủy phân làm hiệu suất thu hồi nitrogen và hàm lượng đạm amino acid tăng (Nguyễn Đức Lượng và ctv., 2004). Với bản chất là protein và hoạt động thích hợp ở 50-55°C (Cuong et al., 2019), enzyme flavourzyme có thể bị biến tính, dẫn đến đồng tụ khi tăng nhiệt độ thủy phân lên 60°C và 70°C làm giảm hoạt tính. Vì vậy, quá trình phân cắt mạch peptide bị giảm nên tốc độ phản ứng, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân giảm (Đỗ Trọng Sơn và ctv., 2013).

Nghiệm thức với nhiệt độ thủy phân ở 50°C có hàm lượng đạm amino acid, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân cao nhất lần lượt là 6,49 g/L, 42,5% và 39,1% và hàm lượng đạm ammonia thấp nhất là 0,205 g/L nên được chọn là thích hợp cho quá trình thủy phân đầu cá lóc bằng enzyme flavourzyme.

#### 4. KẾT LUẬN

Dịch đạm thu hồi từ đầu cá lóc khi được thủy phân ở điều kiện thích hợp là tỷ lệ đầu cá: nước là 1:0,8 w/v, tỷ lệ enzyme flavourzyme so với đầu cá 0,6%, thời gian 30 giờ và nhiệt độ 50°C. Chế độ thủy phân đạt hiệu quả cao với hiệu suất thu hồi nitrogen

và độ thủy phân lần lượt là 42,5% và 39,1%. Dịch đạm thu được có giá trị dinh dưỡng cao với hàm lượng đạm amino acid là 6,49 g/L và chất lượng tốt vì hàm lượng đạm ammonia thấp nhất là 0,205 g/L.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện thông qua sự tài trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ (Bộ Giáo dục và Đào tạo), mã số: CT2020.01.TCT.03 thuộc Chương trình KH&CN “Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ tiên tiến trong bảo quản, chế biến nông thủy sản vùng Đồng bằng Sông Cửu Long”.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- AOAC. (2016). *The official methods of analysis of AOAC International* (20<sup>th</sup> ed.) Rockville, Maryland 20850–3250, USA. <http://www.eoma.aoc.org>.
- Bộ Khoa học và Công nghệ. (1990). Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3708: 1990 về “Thủy sản - Phương pháp xác định hàm lượng nitơ axit amin” do Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành. <https://vanbanphapluat.co/tcvn-3708-1990-thuy-san-phuong-phap-xac-dinh-ham-luong-nito-axit-amin>
- Bộ Khoa học và Công nghệ. (1990). Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3707: 1990 về “Thủy sản - Phương pháp xác định hàm lượng nitơ amin-ammonia” do Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành. <https://vanbanphapluat.co/tcvn-3707-1990-thuy-san-phuong-phap-xac-dinh-ham-luong-nito-amin-ammonia>
- Chalamaiah, M., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food chemistry*, 135(4), 3020-3038.
- Chiang, J. H., Loveday, S. M., Hardacre, A. K., & Parker, M. E. (2019). Effects of enzymatic hydrolysis treatments on the physicochemical properties of beef bone extract using endo- and exoproteases. *International Journal of Food Science and Technology*, 54, 111-120.
- Copeland, R. A. (2000). *A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis* (2<sup>nd</sup> ed.) Wiley-VCH, Inc New York. New York, 412 pages.
- Cupp-Enyard, C. (2008). Sigma’s non-specific protease activity assay – casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*, 19, 899-900. DOI: 10.3791/899
- Cuong, B.V., Nguyet, N.T. M., Quang, N.V., Dong, B.X., & My, P.T. (2019). Study on hydrolysis reaction of chicken cartilage using Flavourzyme. *UED Journal of Social Sciences, Humanities and Education*, 9(4), 1-6.
- DeWit, J. N., & Klarenbeek, G. (1984). Effects of various heat treatments on structure and

- solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67(11), 2701-2710.
- Đỗ Trọng Sơn, Nguyễn Xuân Duy & Nguyễn Thị Mỹ Hương. (2013). Nghiên cứu thủy phân đầu cá chêm (*Lates calcarifer*) bằng enzyme flavourzyme. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản Trường Đại học Nha Trang*, 1, 138-144.
- Đỗ Thị Thanh Thủy & Nguyễn Anh Tuấn. (2013). Nghiên cứu chế độ thủy phân thu dịch đậm hòa tan giàu acid amin từ protein cá tạp. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản Trường Đại học Nha Trang*, 4, 138-143.
- Đỗ Thị Thanh Thủy & Nguyễn Anh Tuấn. (2017). Nghiên cứu ứng dụng hỗn hợp alcalase và flavourzyme để thủy phân cá nục gai (*Decapterus ruselli*) thu hồi dịch đậm thủy phân. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản Trường Đại học Nha Trang*, 3, 73-79.
- FAO. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Ghaly, A.E., Ramakrishnan, V.V., Brooks, M.S., Budge, S.M., & Dave, D. (2013). Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins. Amino acids and oils: a critical review. *J Microb Biochem Technol*, 5(4), 107-129.
- Godinho, I., Pires, C., Pedro, S., Teixeira, B., Mendes, R., Nunes, M. L., & Batisa, I. (2016). Antioxidant Properties of Protein Hydrolysates Prepared from Cod Protein Hydrolysates by *Bacillus sp.* *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(6), 1095-1112.
- Guérard, F., Guimas, L., & Binet, A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20, 489-498.
- Kamnerdpetch, C., Weiss, M., Kasper, C., & Schepel, T. (2007). An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 508-514.
- Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., & Espe, M. (2002). Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by protamex protease. *Process Biochemistry*, 37 (11), 1263-1269.
- Lý Thị Minh Phương. (2011). Nghiên cứu sản xuất chế phẩm dịch thủy phân từ thịt hầu biển dùng trong thực phẩm. *Tạp chí Đại học Công nghiệp*, 2 (3), 16-25.
- Lương Hữu Đồng. (1975). *Một số sản phẩm chế biến từ cá và hải sản*. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật Hà Nội, 223 trang.
- Nguyễn Trọng Cần, Nguyễn Thị Hiền, Đỗ Thị Giang & Trần Thị Luyến (1998). *Công nghệ enzyme*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội. 376 trang.
- Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết, Lê Thị Thủy Tiên, Huỳnh Ngọc Oanh, Nguyễn Thúy Hương, Phan Thị Huyền & Tạ Thu Hằng. (2004). *Công nghệ enzyme*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 534 trang.
- Nguyễn Thị Mỹ Hương (2014). Thành phần dinh dưỡng của các sản phẩm thủy phân từ đầu và xương cá Chêm (*Lates calcarifer*) bằng enzyme flavourzyme. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản Trường Đại học Nha Trang*, 1, 49-53.
- Nguyễn Thị Mỹ Hương & Đặng Thị Thu Hương. (2013). Nghiên cứu thủy phân sò lông (*Anadara antiquata*) bằng kết hợp enzyme Protamex và Flavourzyme. *Tạp chí khoa học - Công nghệ thủy sản Trường Đại học Nha Trang*, 1, 25-31.
- Nguyễn Thị Huỳnh Hoa & Đông Thị Anh Đào. (2016). Nghiên cứu thủy phân protein thịt heo bằng enzyme alcalase chế biến thức ăn nuôi qua sonde. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp*, 1, 140-146.
- Nguyễn Văn Mười & Hà Thị Thụy Vy. (2018). Khảo sát điều kiện hoạt động tối ưu của enzyme Alcalase thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ chân trắng. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54, 148-156.
- Nguyen, H. T. M., Sylla, K. S. B., Randriamahatody, Z., Donnay-Moreno C., Moreau, J., Tran, L. T., & Bergé, J. P. (2011). Enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by-products using protamex protease. *Food Technology and Biotechnology*, 49(1), 48-55.
- Nielsen, P., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66, 642-646.
- Salwaneh, S., Wan Aida, W. M., Mamot, S., & Maskat, M. Y. (2013). Effects of enzyme concentration, temperature, pH and time on the degree of hydrolysis of protein extract from viscera of tuna (*Euthynnus affinis*) by using alcalase. *Sains Malaysiana*, 42(3), 279-287.
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., & Shahidi, F. (2007). Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food chemistry*, 103(4), 1385-1394.
- Trần Thị Bích Thủy & Đỗ Thị Thanh Thủy. (2016). Nghiên cứu ứng dụng enzyme protamex để thủy phân cá trích (*Sardinella gibbosa*) thu dịch đậm. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản Trường Đại học Nha Trang*, 2, 93-100.
- Wang, X., Yu, H., Xing, R., Chen, X., Liu, S., & Li, P. (2018). Optimization of antioxidative peptides from mackerel (*Pneumatophorus japonicus*) viscera. *Peer Journal*, 6, 1-21.
- Whitehurst, R.J., & Van Oort, M. eds. (2009). *Enzymes in food technology*. John Wiley & Sons.