

# Khả năng làm mềm thịt của chế phẩm protease thu nhận từ tụy tạng lợn

Chu Thị Nga<sup>1</sup>, Nguyễn Minh Trí<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Trường THPT Nguyễn Bình Khiêm, Gia Lai, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

Ngày đến tòa soạn: 05/08/2021; Ngày chấp nhận đăng: 20/09/2021

## Tóm tắt

Tụy tạng lợn là một cơ quan tham gia vào quá trình tiêu hóa và là nguồn phụ phẩm từ các cơ sở giết mổ gia súc có thể tận dụng để thu nhận chế enzyme protease. Ở Việt Nam, enzyme protease đã được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau và hiện nay vẫn phải được nhập từ nước ngoài với giá thành tương đối cao. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích tìm ra phương pháp hiệu quả để thu nhận chế phẩm protease từ tụy tạng lợn và ứng dụng vào việc làm mềm thịt. Kết quả cho thấy phương pháp chiết enzyme bằng nước cất rồi kết tủa protein enzyme bằng ethanol 96 % đã cho hiệu quả thu nhận chế phẩm enzyme cao. Chế phẩm này có mặt các enzyme trypsin, chymotrypsin, pepsin và có khả năng làm mềm thịt ở hàm lượng 0,5 % và có tỷ lệ mất nước trong chế biến không đáng kể.

**Từ khóa:** Tụy tạng lợn, trypsin, chymotrypsin, làm mềm thịt.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Có nhiều nghiên cứu trong việc làm mềm thịt và làm cho thịt ngon hơn. Về mặt hóa học, có thể sử dụng  $\text{CaCl}_2$ , muối, phosphates và enzyme để làm giảm lượng mô liên kết. Các phương pháp vật lý cũng đã được thử nghiệm làm mềm thịt bằng xử lý áp lực, kích thích điện [1]. Việc sử dụng protease trong chế biến làm mềm thịt là ứng dụng có tính truyền thống, người dân ở nước ta từ rất lâu đã biết dùng dứa để bổ sung vào quá trình chế biến thịt bò, nấu chân giò với đu đủ xanh... mà thực chất là sử dụng các enzyme papain, bromelain... Trong chế biến thủy sản, protease được bổ sung để tăng lượng nước mắt nhờ thủy phân protein thành các acid amin làm tăng hiệu suất thu hồi đạm của nước mắt [2]. Enzyme protease được thu nhận từ các nguồn động vật, thực vật và vi sinh vật có nguồn gốc tự nhiên và không độc với con người nên ngày càng được sử dụng rộng rãi.

Hiện nay các cơ sở giết mổ gia súc, gia cầm ở nước ta đã thải ra hàng ngày một lượng lớn phế phẩm cần được xử lý hoặc chế biến tiếp để tránh ô nhiễm môi trường. Phụ phẩm của lợn, đặc biệt là tụy tạng là một trong những cơ quan quan trọng chứa nhiều enzyme tiêu hóa tinh bột và protein nhưng người ta chỉ sử dụng làm thức ăn cho gia súc, gia cầm [3]. Trong nội dung nghiên cứu này, tụy tạng lợn đã được dùng để trích ly enzyme protease tạo ra nguồn chế phẩm enzyme nhằm ứng dụng vào việc làm mềm thịt trong quá trình chế biến thay thế cho việc sử dụng phụ gia làm mềm thịt có nguồn gốc hóa học.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu chính dùng trong thí nghiệm là tụy tạng lợn được lấy từ cơ sở giết mổ gia súc

\* Điện thoại: 0914031085 Email: trihatrangthi@gmail.com

ở thành phố Huế, bảo quản bằng nước đá để giữ hoạt tính của enzyme và đưa về phòng thí nghiệm để tiến hành các bước tiếp theo.

Thịt bò loại dai (là phần thịt nạc vai của con bò) sau 2 giờ giết mổ.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Phương pháp thu enzyme protease từ tụy tạng lợn

Phương pháp 1: Tụy tạng lợn sau khi loại bỏ các tạp chất được nghiền với nước cất (4°C) theo tỉ lệ 1: 2 (w/v), hỗn hợp được lọc để thu dịch chiết enzyme và bảo quản ở 4°C để xác định hàm lượng protein enzyme và hoạt độ enzyme [4].

Phương pháp 2: Dịch chiết enzyme bằng nước cất (sản phẩm từ phương pháp 1) sẽ được kết tủa bằng dung dịch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bão hòa theo tỉ lệ dịch chiết và  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1: 2, v/v). Phần kết tủa sau khi ly tâm ở 4°C với tốc độ 10.000 rpm trong 15 phút sẽ được thấm tích bằng túi cellulose liền mạch (seamless cellulose tubing) 36/32. Sau khi thấm tích, mẫu được bảo quản ở 4°C [4]. Phần kết tủa này được hòa tan trong 5 mL nước cất để xác định hàm lượng protein enzyme và hoạt độ enzyme.

Phương pháp 3: Dịch chiết enzyme bằng nước cất (sản phẩm từ phương pháp 1) sẽ được kết tủa với ethanol 96 % theo tỉ lệ dịch chiết và ethanol (1: 4, v/v). Sau đó, hỗn hợp được ly tâm với tốc độ 10.000 rpm trong 15 phút ở nhiệt độ là 4°C, thu phần tủa và bảo quản ở 4°C [4]. Phần tủa này được hòa tan trong 5 mL nước cất để xác định hàm lượng protein và hoạt độ enzyme.

### 2.2. Phương pháp phân tích

Đánh giá khả năng phân giải protein của các phương pháp thu nhận enzyme bằng phương pháp khuếch tán thạch đĩa. Enzyme có khả năng phân giải protein cao thì kích thước vòng phân giải càng lớn [5].

Xác định hàm lượng protein enzyme bằng phương pháp Bradford [6] và xác định hoạt độ protease theo phương pháp Amano [7].

Xác định thành phần enzyme trong chế phẩm bằng phương pháp điện di SDS-PAGE theo Andrew [8]. Phân tích kết quả điện di để xác định trọng lượng phân tử của protein enzyme dựa trên thang chuẩn protein Prestained Protein Ladder, 10 - 180 kDa, của hãng Thermo Scientific.

Phương pháp nghiên cứu làm mềm thịt bằng enzyme: chế phẩm protease thu nhận từ các phương pháp 2 và 3 được hòa tan trong nước cất với nồng độ từ 0,1 - 0,5 %. Thịt bò loại dai được cắt lát với kích thước: dày 1,0 cm, dài 4,0 cm, rộng 3,5 cm, rồi ướp với dung dịch chế phẩm enzyme ở các nồng độ pha sẵn trong thời gian 10 phút [9]. Sau đó đánh giá độ dai và độ mất nước chế biến của thịt theo các phương pháp sau:

Độ dai của thịt bò được xác định theo phương pháp của Wanner bằng máy đo độ dai WDS-1 với tốc độ lưỡi dao 300 mm/phút. Đo độ dai tại 05 vị trí khác nhau trên mẫu thịt trước khi luộc, sau khi luộc và được lặp lại 03 lần.

Độ mất nước chế biến được xác định theo Honikel: cân mẫu thịt, cho vào túi PE chịu nhiệt và luộc trong thiết bị Water bath (WNB10) ở nhiệt độ 95°C trong 3 phút, sau đó làm mát dưới vòi nước. Lấy thịt ra khỏi túi, làm khô bằng giấy thấm và cân khối lượng mẫu.

### Khả năng làm mềm thịt của chế phẩm protease...

Tỷ lệ mất nước chế biến được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ mất nước chế biến (\%)} = \frac{M_1 - M_2}{M_1}$$

Trong đó:  $M_1$ : khối lượng thịt trước khi luộc

$M_2$ : khối lượng thịt sau khi luộc

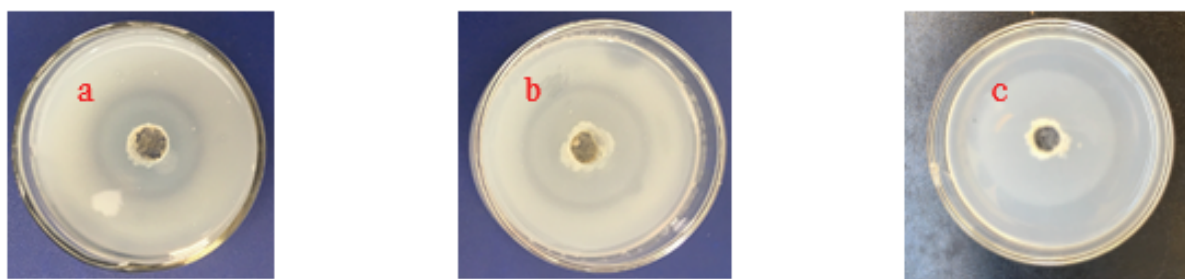
### 2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 03 lần, số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê, so sánh các giá trị trung bình theo phân tích Anova với mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$  bằng chương trình Microsoft Excel [10].

## III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Hiệu quả các phương pháp thu nhận enzyme protease từ tụy tạng lợn

Sau khi trích ly enzyme từ tụy tạng lợn bằng nước cất, kết tủa bằng dung dịch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  50 % bão hòa và kết tủa bằng ethanol 96 %. Tiến hành xác định hàm lượng protein enzyme và đánh giá hoạt tính protease của các chế phẩm thu được, kết quả được thể hiện ở Hình 1.



**Hình 1.** Hoạt tính protease của dịch chiết và chế phẩm từ tụy tạng lợn

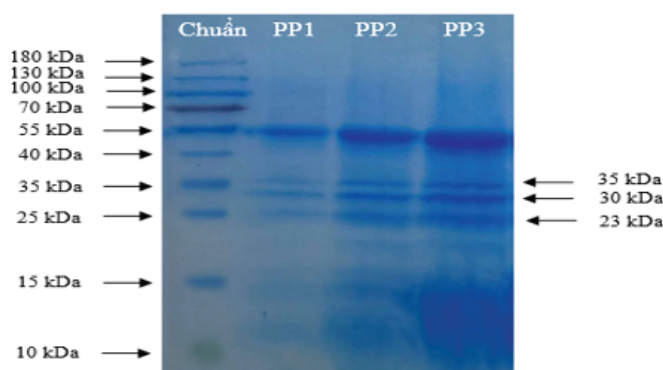
a) Hoạt tính protease của dịch chiết tụy tạng lợn theo phương pháp 1; (b) Hoạt tính protease của chế phẩm theo phương pháp 2; (c) Hoạt tính protease của chế phẩm theo phương pháp 3

Kết quả cho thấy: hoạt tính của enzyme protease cao nhất thu được ở phương pháp 3 với hoạt độ 46,63 U/mL ứng với hàm lượng protein enzyme là 48,6 mg/mL, ở phương pháp 2 là 42,77 U/mL với hàm lượng protein enzyme là 43,5 mg/mL và phương pháp 1 là 35,26 U/mL với hàm lượng protein enzyme là 34,8 mg/mL. Phương pháp 2 và 3 có thực hiện kết tủa protein nên lượng protein enzyme thu được trong mẫu nhiều, do đó hàm lượng protein enzyme hòa tan cao hơn phương pháp 1 (không qua giai đoạn kết tủa protein nên còn lẫn nhiều tạp chất). Ở mẫu thu nhận protein enzyme sử dụng ethanol 96 % thì do khả năng loại bỏ màng hydrate hóa của phân tử protein mạnh hơn so với muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nên cho kết tủa protein nhiều hơn và không qua giai đoạn thẩm tích loại muối nên hàm lượng protein hòa tan cao hơn.

Tóm lại, phương pháp thu nhận protease từ tụy tạng lợn bằng nước cất có sử dụng kết tủa protein bằng muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và kết tủa bằng ethanol đã cho hiệu quả tốt hơn so với dịch chiết bằng nước cất. Hàm lượng protein thu được và hoạt tính của enzyme protease trong hai phương pháp này đều cao hơn so với phương pháp chiết bằng nước cất.

### 3.2. Kết quả phân tích điện di SDS-PAGE

Qua kết quả đánh giá hoạt tính protease từ tụy tạng lợn, bước đầu cho thấy hỗn hợp trích ly từ tuyến tụy có sự hiện diện của enzyme protease. Để xác định chính xác thành phần enzyme protease trong hỗn hợp thu được, chúng tôi tiến hành phân tích điện di SDS-PAGE, kết quả được thể hiện ở Hình 2.



**Hình 2.** Kết quả phân tích thành phần protein enzyme bằng điện di SDS-PAGE

Kết quả phân tích điện di đồ cho thấy: chế phẩm enzyme trích từ các phương pháp trên có sự hiện diện của 3 vạch tương ứng với trọng lượng phân tử khoảng 23 kDa, 30 kDa và 35 kDa. Theo Nguyễn Đức Lượng (2004) thì enzyme chymotrypsin và trypsin có trọng lượng phân tử tương ứng là 22,5 kDa và 23 kDa [4]. Bên cạnh đó, nhiều tác giả cho rằng trong tuyến tụy của lợn chứa nhiều enzyme như amylase, trypsin, chymotrypsin, pepsin, lipase và rennin [11]. Điều này chứng tỏ rằng hỗn hợp enzyme trích được từ tụy tạng lợn bằng 03 phương pháp khác nhau đều có sự hiện diện của enzyme pepsin, chymotrypsin và trypsin. Kết quả này cũng phù hợp với Nguyễn Minh Chơn khi điện di protein enzyme trong tụy tạng của gà cũng có chymotrypsin và trypsin [12].

Từ kết quả đánh giá hoạt động và phân tích thành phần protein enzyme của chế phẩm ở các phương pháp thu nhận, chúng tôi nhận thấy: chế phẩm protease thu nhận bằng cách kết tủa dịch chiết tụy tạng lợn với ethanol có hàm lượng protein và hoạt động phân giải protein cao nhất, từ đó chúng tôi chọn chế phẩm này để khảo sát quá trình làm mềm thịt.

### 3.3. Khả năng làm giảm độ dai của thịt bò bằng chế phẩm protease

Độ dai của thịt là do một loạt các yếu tố bao gồm số lượng mô liên kết bắp, chất béo bắp và chiều dài của sarcomere. Như vậy, thịt không đạt yêu cầu đối với người tiêu dùng nếu thịt quá cứng. Độ dai được thể hiện qua lực cắt của thịt, là một chỉ tiêu được người tiêu dùng rất quan tâm.

Trong thực nghiệm này, thịt bò loại dai (phần thịt nạc vai) sau 2 giờ giết mổ được ướp với chế phẩm protease thu nhận bằng phương pháp sử dụng ethanol với nồng độ từ 0,1 - 0,5 % trong thời gian 10 phút. Sau đó, dùng dụng cụ hình trụ rỗng có đường kính 1 cm lấy mẫu bằng cách xoay dụng cụ hình trụ theo chiều kim đồng hồ và song song với các sợi cơ của các mẫu thịt. Các mẫu thịt hình trụ sau đó được cắt vuông góc với các sợi cơ bằng máy cắt WDS-1, vận tốc lưỡi dao 300 mm/phút.

Tiến hành phân tích độ dai của các mẫu thịt chịu tác động của chế phẩm enzyme trước khi luộc và sau khi xử lý nhiệt (với nhiệt độ 95°C). Kết quả phân tích trên máy đo độ dai được thể hiện ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của chế phẩm protease thu từ tụy tạng lợn đến độ dai của thịt bò

Độ dai của thịt (N)	Mẫu	Hàm lượng chế phẩm protease (%)				
		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
<b>Trước xử lý nhiệt</b>	Thí nghiệm	25,38 <sup>a</sup>	22,83 <sup>a</sup>	20,69 <sup>a</sup>	19,85 <sup>a</sup>	17,91 <sup>a</sup>
	Đối chứng			26,73		
<b>Sau xử lý nhiệt</b>	Thí nghiệm	44,60 <sup>a</sup>	42,05 <sup>a</sup>	38,69 <sup>a</sup>	36,83 <sup>a</sup>	33,38 <sup>a</sup>
	Đối chứng			46,33		

Ghi chú: (a) Khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nhóm liền kề.

Kết quả đo lực cắt cho thấy có sự khác nhau có ý nghĩa giữa các công thức thí nghiệm so với đối chứng, trong đó mẫu thịt được xử lý 0,5 % chế phẩm protease sẽ làm mềm thịt hơn so với đối chứng. Sự thay đổi độ dai của thịt có thể là do enzyme protease phân giải các cơ thịt nên đã làm cho thịt mềm hơn so với đối chứng. Kết quả nghiên cứu này cho thấy việc thấy tận dụng tụy tạng lợn có thể đem lại lợi ích trong việc làm mềm thịt.

### 3.4. Tỷ lệ mất nước chế biến

Tỷ lệ mất nước là một chỉ tiêu quan trọng phản ánh chất lượng thịt. Nếu tỷ lệ mất nước của thịt cao sẽ làm cho bề mặt thịt rỉ nước, kém hấp dẫn và làm giảm khối lượng, giảm giá trị của thịt cũng như làm giảm tính ngon miệng của thịt lúc chế biến. Tiến hành xác định tỷ lệ mất nước chế biến của các mẫu thịt được xử lý bằng chế phẩm protease và mẫu đối chứng (không xử lý chế phẩm), kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của chế phẩm protease thu từ tụy tạng lợn đến tỷ lệ mất nước chế biến của thịt bò

Tỷ lệ mất nước (%)	Hàm lượng chế phẩm protease (%)				
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
<b>Thí nghiệm</b>	16,38 <sup>a</sup>	17,83 <sup>a</sup>	18,69 <sup>a</sup>	19,15 <sup>b</sup>	19,34 <sup>b</sup>
<b>Đối chứng</b>			15,92		

Ghi chú: (a) Khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nhóm liền kề

(b) Khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Tỷ lệ mất nước là một chỉ tiêu quan trọng phản ánh chất lượng thịt. Nếu tỷ lệ mất nước của thịt cao sẽ làm cho bề mặt thịt rỉ nước, kém hấp dẫn và làm giảm khối lượng, giảm giá trị của thịt cũng như làm giảm tính ngon miệng của thịt lúc chế biến. Tiến hành xác định tỷ lệ mất nước chế biến của các mẫu thịt được xử lý bằng chế phẩm protease và mẫu đối chứng (không xử lý chế phẩm), kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

Thông qua kết quả khảo sát độ dai và tỷ lệ mất nước khi sử dụng chế phẩm protease thu nhận từ tụy tạng lợn để xử lý thịt bò dai, chúng tôi nhận thấy: chế phẩm này đã cắt và phá hủy protein mô liên kết bao bọc mô cơ và có thể cắt một phần mạch polipeptide dài tạo thành các mạch ngắn hơn nên làm mềm thịt, do vậy chỉ ứng dụng làm mềm cho các sản phẩm dạng miếng, thịt hầm...Điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của enzym papain đối với các đặc tính chức năng trong quá trình làm mềm thịt bò trưởng thành của Daniela Istrati [13].

#### IV. KẾT LUẬN

Tụy tạng lợn là nguồn nguyên liệu giàu enzyme protease: trypsin, chymotrypsin và pepsin. Phương pháp thu nhận chế phẩm enzyme bằng ethanol và  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  50 % bão hòa đã cho hiệu quả cao, trong đó chế phẩm enzyme thu bằng ethanol cho hiệu quả cao nhất. Chế phẩm này ở nồng độ 0,5 % với thời gian ướp là 10 phút có khả năng làm mềm thịt bò dai và có tỷ lệ mất nước chế biến không đáng kể.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Kemp C.M., Sensky P.L., Bardsley R.G., Buttery P.J. and Parr T. "Tenderness: An Enzymatic View," *Meat Science*, Vol. 84, No. 2, 248-256, 2010.
- [2]. Đ. T. B. Thủy, *Hóa sinh thực phẩm*. Thừa Thiên Huế: NXB Đại học Huế, 2011.
- [3]. N. M. Chon, H. V. Trung và D. C. Ngọc, "Ly trích enzyme từ tụy heo", *Hội Nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc Phía Nam lần 2*, 77, 2011.
- [4]. N. Đ. Lượng, C. Cường, N. A. Tuyết, L. T. T. Tiên và H. N. Oanh, *Công nghệ enzyme*. Hồ Chí Minh: NXB Đại học Quốc Gia TP. HCM, 2004.
- [5]. S. Maqsood, K. Manheem, A.Gani, and A. Abushelaibi, "Degradation of myofibrillar, sarcoplasmic and connective tissue proteins by plant proteolytic enzymes and their impact on camel meat tenderness," *Journal of Food Science Technology*, vol. 55, no. 9, pp. 3427-3438, 2018.
- [6]. M.M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254, 1976.
- [7]. Amano, Protease N "Amano" - Assay method for Protease activity (Amano method). Amano Enzyme Inc., Nagoya, Japan. pp. 77-78, 2002.
- [8]. B. N. Andrew, W. J. Wobig, and D. H. Petering, "Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions," *Metallomics*, vol 6, no. 5, pp: 1068-1078, 2014.
- [9]. M. Dikeman and Carrick Devine, *Encyclopedia of Meat Sciences*. Academic Press, pp.164 - 171, 2014.
- [10]. Đ. V. Giáp, *Phân tích dữ liệu khoa học bằng Microsoft Excel*. Hà Nội: NXB Giáo dục 2000.
- [11]. N. T. K. Đông và N. V. Thu, *Sinh lý gia súc - gia cầm*. Hồ Chí Minh: NXB Nông nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh, 2009.

- [12]. N. M. Chon, N. P. Tuấn, “Ly trích enzyme amylase và protease từ tuyến tụy của gà,” *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 2, tr. 158-169, 2014.
- [13]. D. Istrati, “The influence of enzymatic tenderization with papain on functional properties of adult beef,” *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, vol. 14, pp. 140-146, 2008.

## **Tenderization of meat by protease received from the pig's pancreas**

**Chu Thi Nga<sup>1</sup>, Nguyen Minh Tri<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Nguyen Binh Khiem high school, Gia Lai, Vietnam*

<sup>2</sup>*University of Science, Hue University, Thua Thien Hue, Vietnam*

### **Abstract**

Pig pancreas is an organ involved in the digestive process and is a source of by-products from cattle slaughterhouses that can be utilized to obtain protease enzymes. In Vietnam, protease enzymes have been applied in many different fields and still have to be imported from abroad at a relatively high cost. This study was carried out with the aim of finding an effective method to obtain protease products from pig pancreas and apply it to tenderizing meat. The results showed that the method of enzyme extraction with distilled water and precipitation of enzyme proteins with ethanol gave high efficiency in obtaining enzyme preparations. This preparation has the enzymes trypsin, chymotrypsin, pepsin and has the ability to tenderize meat at the content of 0.5 % and has a negligible rate of dehydration during processing.

**Keywords:** *Pig pancreas, protease enzymes, trypsin, chymotrypsin, pepsin.*