

NGHIÊN CỨU THỦY PHÂN PROTEIN THỊT HEO BẰNG EMZYME ALCALASE CHẾ BIẾN THỨC ĂN NUÔI QUUA SONDE

Nguyễn Thị Quỳnh Hoa và Đồng Thị Anh Đào

Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa Thành phố Hồ Chí Minh

Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 24/10/2016

Title:

Research on the process of hydrolysis for enteral feeding product from pork loin by Alcalase

Từ khóa:

Thủy phân thịt heo nạc vai, độ nhớt, alcalase, mức độ thủy phân, tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt

Keywords:

Hydrolysed pork loin, viscosity, alcalase, degree of hydrolysis, optimal screening design

ABSTRACT

The study was performed to find optimally hydrolyzing conditions using Alcalase[®] 2.4L for loin pork meat at the same time to keep the vitamin B₁ loss at minimal level aiming at production of enteral feeding product. The main aim of this study was to determine conditions for the hydrolysis of meat in order to shorten the time and increase the efficiency of hydrolysis of meat, on the other hand ensure that the loss of vitamin B₁ is minimal. The enzymatic hydrolysis was optimized for minimum viscosity of the hydrolysate using response surface methodology. The hydrolysis of pork loin meat by the commercial protease, Alcalase[®] 2.4L, was studied to evaluate the influence of pH (6.5 to 8.5), temperature (55 to 75°C), enzyme: substrate ratio (0.5% to 2.5%), and time (180 min to 300 min) on the responses of viscosity of the hydrolysate. The results showed that, the most appropriate conditions for pre-cooking prior to hydrolysis included pork loin meat to water ratio of 1.5/1, pre-cooking temperature of 80°C and duration of 5 minutes. With these conditions, the remaining vitamin B₁ content was kept at level of 0.611 mg/100 g. The optimum conditions for hydrolysis of pork loin meat using commercial protease, Alcalase[®] 2.4L, included temperature of 64.6°C, enzyme to substrate ratio of 1.77% (w/w), duration of 256 minutes and pH value of 7.54. With these conditions, viscosity of hydrolysate reached a value of 2.4 cP, while the level of hydrolysis reached a maximum of 56.58%. A characterization of the protein hydrolysate showed that the hydrolysate fraction of molecular weights smaller than 50 kDa accounted for 60.07%.

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định chế độ thủy phân tối ưu sử dụng chế phẩm Alcalase^R cho loại nguyên liệu thịt than heo đồng thời đảm bảo tổn thất vitamin B₁ là thấp nhất. Quá trình thủy phân được tối ưu hóa theo độ nhớt tối thiểu bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Tiến hành thủy phân thịt heo bằng chế phẩm enzyme Alcalase^R 2,4 L nhằm đánh giá mức độ ảnh hưởng của pH (6,5 đến 8,5), nhiệt độ (55 đến 75°C), tỉ lệ enzym cơ chất (0,5% đến 2,5%), và thời gian thủy phân (180 phút đến 300 phút) lên độ nhớt của dịch thủy phân. Từ nghiên cứu, tỉ lệ nguyên liệu: nước trộn trước khi thủy phân thích hợp nhất là 1,5/1, chế độ xử lý nhiệt trước khi thủy phân là ở nhiệt độ 80°C trong 5 phút trong khi vitamin B₁ còn lại là 0,611 mg/100 g. Điều kiện tối ưu của quá trình thủy phân như sau: nhiệt độ 64,6°C, tỉ lệ enzyme cơ chất 1,77% (w/w), thời gian 256 phút và pH 7,54. Ở điều kiện này, độ nhớt của dịch thủy phân thấp nhất đạt 2,4 cP. Trong khi đó, mức độ thủy phân đạt tối đa là 56,58%. Phân tích dịch thủy phân cho thấy thành phần protein có khối lượng dưới 50 kDa chiếm 60,07%.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Quỳnh Hoa và Đồng 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 (Tập 1): 140-146.

1 GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây, thị trường thế giới ngày càng phát triển nhiều loại sản phẩm nuôi ăn qua ống thông dùng qua đường tiêu hóa góp phần cải thiện tình trạng dinh dưỡng bệnh nhân (Gerlach & Murphy, 2011). Tuy nhiên, tại Việt Nam phần lớn nguồn cung cấp đạm trong các sản phẩm qua ống thông mũi dạ dày cho bệnh nhân chủ yếu là đạm thực vật, còn nguồn đạm động vật vẫn là hàng nhập ngoại. Với mục tiêu tạo ra sản phẩm nuôi ăn qua ống thông mũi dạ dày từ nguyên liệu tự nhiên của Việt Nam cung cấp đạm từ nguồn gốc động vật, nghiên cứu chế biến bột đạm nuôi ăn qua ống thông mũi dạ dày từ nguyên liệu thịt heo, dựa trên việc thủy phân thịt heo nhằm tạo ra dịch thủy phân có kích thước phân tử đã được cắt nhỏ phù hợp chảy qua ống thông nuôi ăn làm tiền đề cho chế biến sản phẩm nuôi ăn qua ống thông cho bệnh nhân được thực hiện.

Có rất nhiều enzyme khác nhau được dùng để thủy phân protein (như Papain, Alcalase®, Protamex®, Flavourzyme®, Neutrase®) (Aspmo *et al.*, 2005), bao gồm enzyme có nguồn gốc thực vật như papain (Shahidi *et al.*, 1995), nguồn gốc từ động vật như pepsin (Vieira *et al.*, 1995) và chymothrypsine hay trypsin (Simpson *et al.*, 1998), nguồn gốc từ vi sinh vật như Alcalase®, Protamex®, Flavourzyme®, Neutrase®. Enzyme có nguồn gốc từ vi sinh vật có nhiều ưu điểm hơn các nguồn gốc khác như hoạt tính thủy phân tốt hơn, có mức pH cao hơn và bền nhiệt (Diniz and Martin, 1997). Alcalase® là một enzyme protease vi khuẩn từ *Bacillus licheniformis* hiệu quả nhất để sản xuất các loại protein thủy phân (Kristinsson and Rasco, 2000). Chính vì thế, enzyme Alcalase^R AF 2.4 L (Novozyme – Đan Mạch) được lựa chọn trong nghiên cứu thủy phân thịt heo.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành tại Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa thành phố Hồ Chí Minh.

2.1.1 Nguyên liệu

Thịt heo được lựa chọn ở phần thịt nạc vai có hàm lượng protein cao nhất từ trang trại nuôi heo do Công ty TNHH một thành viên kỹ nghệ súc sản VISSAN cung cấp. Thịt heo được giữ ở 0°C đến khi sử dụng (tối đa 05 ngày).

2.1.2 Hóa chất sử dụng

Enzyme Alcalase^R AF 2.4 L của hãng Novozyme – Đan Mạch và được phân phối bởi

công ty Nam Giang, đặt tại 133/11, Hồ Văn Huê, phường 9, quận Phú Nhuận, thành phố Hồ Chí Minh.

2.2 Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại ít nhất 3 lần, kết quả trình bày là giá trị trung bình. Các số liệu thí nghiệm được tiến hành tính sai số và phân tích phương sai ANOVA để xác định sự khác biệt của các số liệu ($p < 0,05$) và sai số chuẩn bằng phần mềm Statgraphics nhằm kiểm định độ tin cậy của kết quả thu được từ các thí nghiệm.

Để xác định kết quả tối ưu hóa của các thí nghiệm ảnh hưởng tương tác của các yếu tố lên hàm mục tiêu, phương pháp bề mặt đáp ứng RSM (Response Surface Method) và phần mềm Modde 5.0 được sử dụng để xử lý kết quả, tối ưu hóa bốn yếu tố với mô hình ma trận quy hoạch cấu trúc có tâm cấp hai, bốn yếu tố, sử dụng kế hoạch hỗn hợp bậc hai xoay tâm thay cho kế hoạch bậc hai không xoay tâm khi xác định các hệ số của phương trình hồi quy. Để kế hoạch hỗn hợp là xoay tâm, giá trị của tay đòn α chọn từ điều kiện:

$$\alpha = 2^{k/4} \text{ (khi nhân kế hoạch } 2^k)$$

2.3 Phương pháp phân tích

Bảng 1: Các phương pháp phân tích

Thành phần	Phương pháp
Hàm lượng tro	Phương pháp nung ở 600°C theo TCVN 7038 : 2002 (ISO 928 : 1997).
Hàm lượng protein hòa tan	Phương pháp Lowry
pH	Sử dụng pH kế, theo ISO 2917:1999(E).
Hàm lượng vitamin B ₁	Phương pháp sắc ký lỏng cao áp TCVN 5164:2008.
Độ ẩm (%)	Phương pháp NMKL số 23-1991.
Đạm tổng số (%)	Phương pháp Kjeldahl, TCVN 8125:2009.
Lipid tổng số (%)	Phương pháp Soxhlet, AOAC 920.39.
Vi sinh vật tổng số (cfu/g)	Phương pháp định lượng vi sinh vật trên đĩa thạch. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C, TCVN 4884:2005.
Mức độ thủy phân (DH%)	Phương pháp xác định TCA thông qua chỉ số N hòa tan trong TCA.

2.4 Trình tự thực hiện trong nghiên cứu

Nguyên liệu thịt heo nạc vai được rửa sạch, cắt nhỏ (kích thước 10 x 10 mm) rồi đem đi xay làm giảm kích thước nguyên liệu (đến khoảng 0.5 – 1 mm) để tạo điều kiện cho quá trình xử lý nhiệt.

Dem thịt sau khi xay đi xử lý nhiệt (ở nhiệt độ thay đổi từ 60 đến 100°C, thời gian thay đổi từ 3,4,5 và 6 phút) và xay lần hai nhằm tách các phân tử thịt với nhau tạo điều kiện cho quá trình thủy phân. Tiếp theo bổ sung nước vào thịt nạc với các tỉ lệ nguyên liệu: nước thay đổi từ 2,5: 1 đến 0,5:1 (w/w). Tiến hành thủy phân thịt heo trong bể điều nhiệt với việc điều khiển pH môi trường, thay đổi từ 6,5 đến 8,5 (sử dụng NaOH 0,1N để điều chỉnh), nhiệt độ thủy phân (từ 55 đến 75°C, thời gian thủy phân (150 phút, 180 phút, 210 phút, 240 phút, 270 phút, 300 phút) và tỉ lệ enzyme sử dụng (nồng độ [E/S] thay đổi từ 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5% (v/w) tương ứng lần lượt với hoạt độ là 8,93 UI/g, 17,81 UI/g, 26,74 UI/g, 35,62 UI/g, 44,55 UI/g). Dựa trên ảnh hưởng của từng nhân tố riêng lẻ đến hiệu quả thủy phân thịt heo bằng enzyme Alcalase, quá trình thủy phân được tối ưu hóa theo độ nhớt của dịch thủy phân dùng phương pháp đáp ứng bề mặt.

3 KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

3.1 Thành phần dinh dưỡng thịt heo nạc

Thành phần dinh dưỡng ban đầu của thịt heo nạc vai được phân tích, làm cơ sở cho việc nghiên cứu quá trình thủy phân, tạo dịch protein. Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2: Kết quả đánh giá chất lượng nguyên liệu

Chỉ tiêu	Giá trị
Hàm ẩm	72,90 % ± 0,01
Hàm lượng protein	22,70 % ± 0,01
Hàm lượng béo thô	2,11 % ± 0,011
Hàm lượng tro	1,024 % ± 0,001
Hàm lượng vitamin B ₁	1,384(mg/100g) ± 0,001

Kết quả khảo sát cho thấy thịt heo nạc có hàm ẩm cao (72,9%), protein cao chiếm 83,76% so với tổng lượng chất khô, lượng vitamin B₁ là 1,384 mg/100 g.

3.2 Ảnh hưởng của điều kiện tiền xử lý (trước thủy phân) đến hiệu quả thủy phân

Lượng nước bổ sung trước khi thủy phân ảnh hưởng đến khả năng tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất. Giá trị tối ưu khi tỉ lệ nguyên liệu : nước là 1,5:1.

Bảng 3 cho thấy mức độ thủy phân tăng khi tỉ lệ nguyên liệu : nước tăng theo thứ tự; 0,5:1; 1:1; 1,5:1 ($p < 0,05$). Sau đó, mức độ thủy phân giảm khi tỉ lệ nguyên liệu : nước tiếp tục tăng 2:1; 2,5:1. Khi tỉ lệ nguyên liệu : nước thấp 0,5:1; mức độ thủy phân thấp do tỉ lệ pha loãng cao nên nồng độ cơ chất giảm xuống, xác suất enzyme kết hợp với cơ chất thấp dẫn đến mức độ thủy phân thấp.

Bảng 3: Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu: nước đến mức độ thủy phân

Tỉ lệ nguyên liệu : nước (w/w)	2,5:1	2,0:1	1,5:1	1,0:1	0,5:1
Mức độ thủy phân DH (%)	28,005 ^d	33,026 ^b	34,395 ^a	30,972 ^c	26,864 ^c

(^aCác giá trị có ký tự ở trên giống nhau nằm trong cùng một hàng thì khác nhau không có ý nghĩa ($p < 0,05$))

Khi tăng tỉ lệ nguyên liệu : nước lên thì mức độ thủy phân tăng do tăng khả năng tiếp xúc enzyme và cơ chất. Tuy nhiên, khi tăng quá nhiều cơ chất 2:1; 2,5:1 thì mức độ thủy phân giảm do nồng độ cơ chất trong dung dịch cao, độ nhớt của dung dịch đồng thời cũng cao khiến cho enzyme khó khuếch tán trong dung dịch gây cản trở khả năng xúc tác thủy phân cơ chất nên mức độ thủy phân sẽ thấp.

3.3 Nhiệt độ xử lý nhiệt thịt trong quá trình tiền xử lý trước thủy phân

Quá trình xử lý nhiệt ban đầu với mục đích làm biến tính protein, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình thủy phân. Tuy nhiên, khi xử lý nhiệt đồng thời cũng sẽ làm thất thoát vitamin B₁ do quá trình biến đổi nhiệt.

Chế độ nhiệt độ xử lý nhiệt được lựa chọn sao cho vừa đảm bảo độ nhớt dịch thủy phân cuối cùng và làm hàm lượng vitamin B₁ tồn thất thấp nhất. Kết quả phân tích Anova cho ta sự khác biệt về độ nhớt khi được xử lý ở ba chế độ 80°C, 90°C, 100°C không có ý nghĩa thống kê. Chúng tôi chọn 80°C làm nhiệt độ xử lý mẫu nhằm giữ được một phần

lượng vitamin, khi đó hàm lượng vitamin B₁ còn lại là 0,613mg/100g.

Bảng 4: Ảnh hưởng của nhiệt độ xử lý nhiệt đến hàm lượng vitamin B₁ và độ nhớt của dịch sau thủy phân

Chế độ nhiệt (°C)	Vitamin B ₁ (mg/100g)	Độ nhớt (cP)
60	0,706	3,26025 ^c
70	0,626	3,00117 ^b
80	0,613	2,64163 ^a
80	0,613	2,64163 ^a
90	0,510	2,63447 ^a
100	0,392	2,62798 ^a

(^aCác giá trị có ký tự ở trên giống nhau nằm trong cùng một hàng thì khác nhau không có ý nghĩa ($p < 0,05$))

3.4 Thời gian xử lý nhiệt thịt trước quá trình thủy phân

Cùng nhiệt độ xử lý, thời gian xử lý nhiệt càng lâu thì mức độ biến tính của nguyên liệu càng lớn, dẫn đến độ nhớt dịch thủy phân càng giảm. Ở thời gian xử lý nhiệt 5 và 6 phút thì độ nhớt dịch thủy

phân thay đổi không đáng kể (phân tích Anova) vì lúc này thịt đã biến tính hoàn toàn. Chọn thời gian xử lý nhiệt là 5 phút để đảm bảo thất thoát vitamin B₁ thấp nhất.

Bảng 5: Ảnh hưởng thời gian xử lý nhiệt đến hàm lượng vitamin B₁ và độ nhớt của dịch sau quá trình thủy phân

Thời gian (phút)	Vitamin B ₁ (mg/100g)	Độ nhớt (cP)
3	0,658	2,64297 ^c
4	0,613	2,62731 ^b
5	0,611	2,60538 ^a
6	0,5425	2,59532 ^a

(^aCác giá trị có ký tự giống nhau nằm trong cùng một cột thì khác nhau không có ý nghĩa ($p < 0,05$))

Bảng 6: Ảnh hưởng của pH đến độ nhớt của dịch sau thủy phân

pH	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
Độ nhớt (cP)	3,06807 ^d	2,85955 ^c	2,62686 ^{ab}	2,56108 ^a	2,61232 ^{ab}	2,6989 ^b

(^aCác giá trị có ký tự ở trên giống nhau nằm trong cùng một hàng thì khác nhau không có ý nghĩa ($p < 0,05$))

3.5.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến độ nhớt dịch thủy phân

Nhiệt độ tăng trong một khoảng nhất định thì hoạt tính enzyme tăng theo làm vận tốc phản ứng tăng theo, đến một nhiệt độ nào đó sẽ không tăng nữa và có thể giảm xuống do nhiệt độ cao làm biến

3.5 Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân protein thịt heo

3.5.1 Ảnh hưởng của pH của môi trường đến độ nhớt dịch thủy phân

pH ảnh hưởng rất lớn đến khả năng hoạt động của enzyme, vì nó ảnh hưởng đến mức độ ion hóa cơ chất và độ bền của enzyme. Cùng một chủng enzyme nhưng khi cơ chất khác nhau thì pH tối ưu cũng khác nhau. Cụ thể, khi cơ chất là da cá hồi thì giá trị tối ưu là 8,39 (See et al., 2011), còn đối với cơ chất là máu cá ba sa thì giá trị tối ưu là 7,05 (Trần Thanh Nhân, Trần Nguyễn Tú Oanh, 2009).

Tại pH là 7,5 thì độ nhớt của dịch thủy phân là thấp nhất. Tuy giá trị độ nhớt tại pH 8,0 và 7,0 khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê nhưng nhằm giảm ảnh hưởng đến vitamin B₁ nên chúng tôi chọn pH là 7,5.

tính bất thuận nghịch protein, enzym protease bị vô hoạt, quá trình thủy phân sẽ bị ngừng lại.

Nhiệt độ càng cao càng tổn thất vitamin. Dù ở 65 hay 70°C thì độ nhớt khác biệt không đáng kể, nên nhiệt độ được chọn cho quá trình thủy phân là 65°C.

Bảng 7: Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến độ nhớt của dịch sau thủy phân

Nhiệt độ (°C)	50	55	60	65	70	75
Độ nhớt (cP)	2,97253 ^c	2,76423 ^b	2,56355 ^a	2,51589 ^a	2,59934 ^a	2,7394 ^b

(^aCác giá trị có ký tự ở trên giống nhau nằm trong cùng một hàng thì khác nhau không có ý nghĩa ($p < 0,05$))

3.5.3 Ảnh hưởng của nồng độ enzyme sử dụng đến độ nhớt dịch thủy phân

Khi tăng lượng chế phẩm enzyme thì phản ứng chuyên hóa cơ chất thành sản phẩm sẽ xảy ra

nhANH hơn. Tuy nhiên, việc tăng hàm lượng enzyme sử dụng sẽ tăng chi phí cho quá trình sản xuất.

Bảng 8: Ảnh hưởng của nồng độ đến độ nhớt của dịch sau thủy phân

Nồng độ (v/w)	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	2,5%
Độ nhớt (cP)	2,65863 ^b	2,51007 ^a	2,46398 ^a	2,46152 ^a	2,45839 ^a

(^aCác giá trị có ký tự ở trên giống nhau nằm trong cùng một hàng thì khác nhau không có ý nghĩa ($p < 0,05$))

Nồng độ enzyme tăng làm giảm nhanh độ nhớt của dịch thủy phân, nhưng khi nồng độ (1,5%) thì độ nhớt của dịch giảm không đáng kể (phân tích Anova). Giá trị được chọn là 1,5% (v/w).

3.5.4 Ảnh hưởng của nồng độ thời gian thủy phân đến độ nhớt dịch thủy phân

Thời gian càng dài số lượng liên kết bị cắt càng nhiều làm cho độ nhớt của dịch thủy phân giảm. Tuy nhiên, đến một giới hạn thời gian thì quá trình

thủy phân sẽ xảy ra không đáng kể. Quá trình thủy phân xảy ra nhanh ở giai đoạn đầu, khi mà có một lượng lớn liên kết peptide phù hợp bị phân cắt. Tốc độ thủy phân sau đó giảm dần và dừng lại khi các liên kết peptide dễ bị thủy phân ít dần. Sự có mặt của các peptide mạch ngắn mới sinh ra cũng làm ức chế phần nào tác dụng thủy phân của enzyme (Jun & Sakayu, 2002). Các sản phẩm này hoạt động như là cơ chất cạnh tranh hiệu quả với các

phân tử chưa thủy phân hoặc đã thủy phân một phần (Souissi N. et al., 2007).

Bảng 9: Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến độ nhớt của dịch thủy phân

Thời gian (phút)	150	180	210	240	270	300
Độ nhớt (cP)	3,07746 ^d	2,72038 ^c	2,53312 ^b	2,46242 ^{ab}	2,45369 ^a	2,45235 ^a

(^aCác giá trị có ký tự ở trên giống nhau nằm trong cùng một hàng thì khác nhau không có ý nghĩa ($p < 0,05$))

Khi thời gian thủy phân đến 270 phút, dù có kéo dài thêm thì độ nhớt cũng giảm không đáng kể. Sau thời gian này, sự thay đổi về độ nhớt của sản phẩm không có ý nghĩa về mặt thống kê khi tiếp tục tăng thời gian. Do đó, thời gian thủy phân được chọn là 270 phút.

3.6 Tối ưu hóa quá trình thủy phân protein thịt heo bằng Alcalase

Quá trình thủy phân sẽ cắt các phân tử có kích thước lớn thành các phân tử nhỏ hơn tạo điều kiện cho quá trình tiêu hóa được thực hiện dễ dàng [16]. Độ nhớt dịch thủy phân càng thấp, kích thước phân tử càng nhỏ thì dịch thủy phân càng dễ hấp thụ.

Tiến hành tối ưu hóa theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm trực giao bốn yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân gồm: pH, nhiệt độ, nồng độ và thời gian, với cấu trúc xoay tâm và hàm mục tiêu là độ nhớt của sản phẩm dịch thủy phân (Y).

Qua khảo sát, chúng tôi thấy enzyme Alcalase^R có khả năng hoạt động khá rộng như sau: pH từ 6,5 – 8,5; nhiệt độ từ 55 - 75°C phù hợp với tiêu chuẩn mà nhà sản xuất công bố; nồng độ E/S (v/w) chúng tôi lựa chọn khảo sát từ 1 - 2% và thời gian là 210 - 270 phút.

Sự thay đổi đồng thời của các yếu tố khảo sát trong quá trình quy hoạch có thể xác định quy luật ảnh hưởng của các yếu tố này đến hàm mục tiêu. Trên cơ sở đó, chúng tôi chọn ra các thông số tối ưu. Số thí nghiệm tối ưu trong quá trình này là N = 31 thí nghiệm, trong đó có 7 thí nghiệm ở tâm nhằm tăng mức độ chính xác của quá trình.

Cánh tay đòn của phương án là $\alpha = 2^{\frac{k}{4}} = 2$ (với k là số yếu tố).

Các thông số của thí nghiệm và kết quả được tóm tắt trong bảng.

Bảng 10: Thông số của quá trình tối ưu hóa

Thông số	- α	-1	0	+1	+ α
X ₁ (pH)	6,5	7	7,5	8	8,5
X ₂ (°C)	55	60	65	70	75
X ₃ [E/S] (%)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
X ₄ (T) (phút)	180	210	240	270	300

Trong đó: X₁ là thông số pH của quá trình thủy phân; X₂ là nhiệt độ của quá trình thủy phân (°C); X₃ là nồng độ của quá trình thủy phân (%); X₄ là thời gian của quá trình thủy phân (phút).

Giải bài toán quy hoạch thực nghiệm cho hàm mục tiêu bằng phần mềm Modde 5.0 với phương pháp xoay tâm cấp 2, thu được phương trình hồi quy thể hiện mối quan hệ của các biến trong quá trình thủy phân như sau:

$$Y = 2,4469 - 0,018X_1 - 0,082X_3 - 0,077X_4 + 0,0316X_3X_4 + 0,0884X_1^2 + 0,0682X_2^2 + 0,0596X_3^2 + 0,0569X_4^2$$

Để tìm được phương trình hồi quy với biến số thực ta cần phải quy đổi sang biến số thực theo các công thức quy đổi và kết quả như sau:

$$Y = 39,9311 - 5,34Z_1 - 0,3546Z_2 - 1,3848Z_3 - 0,03587Z_4 + 0,002107Z_3Z_4 + 0,3531Z_1^2 + 0,002728Z_2^2 + 0,2384Z_3^2 + 0,000063Z_4^2$$

Trong đó: Z₁: là biến số thực của thông số pH quá trình thủy phân; Z₂: là biến số thực của thông số nhiệt độ quá trình thủy phân (°C); Z₃: là biến số thực của thông số nồng độ quá trình thủy phân (%); Z₄: là biến số thực của thông số thời gian quá trình thủy phân (phút).

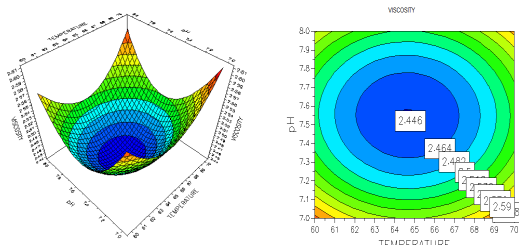
Kết quả phân tích phương sai như sau:

Bảng 11: Kết quả phân tích phương sai Anova của thí nghiệm tối ưu hóa

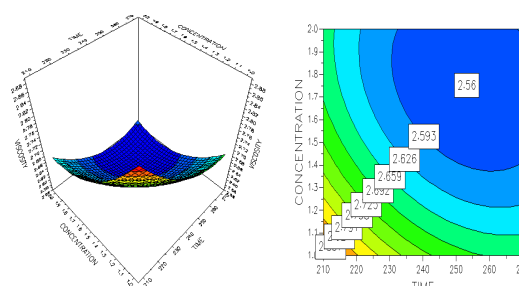
Y	DF	SS	MS	F	p	SD
Total	31	219,846	7,0918			
Constant	1	219,069	219,069			
Total Corrected	30	0,77728	0,0259			0,161
Regression	14	0,75444	0,05389	37,74	0	0,2321
Residual	16	0,02285	0,00143			0,0378
Lack of Fit	10	0,02265	0,00226	67,83	0	0,0476
Điểm sai số tiêu chuẩn	6	0,0002	3,34E-05			0,0058
N = 31			Q ² = 0,832			
DF = 16			R ² = 0,971			

Trong đó R²: hệ số xác định; SS: tổng bình phương (sum of squares); DF: bậc tự do (degrees of freedom); MS: trung bình bình phương (mean square); F: F-value. Giá trị F có độ tin cậy ở 95%. Dựa vào kết quả của bảng phân tích Anova, kết quả có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$ vì giá trị F từ kết quả quy hoạch thực nghiệm (37,739) lớn hơn nhiều so với giá trị tra Bảng (2,9).

Giá trị trong thí nghiệm này, R² = 0,971 và Q² = 0,832 (Bảng 4.7) thỏa mãn tất cả những điều kiện trên, cho thấy các giá trị hồi quy có ý nghĩa và mô hình đáng tin cậy. Các ảnh của các biến độc lập lên hàm mục tiêu có thể được đánh giá thông qua việc biểu diễn ở không gian ba chiều và bề mặt đáp ứng tương ứng với các yếu tố còn lại ở điều kiện tối ưu.



Hình 1: Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH môi trường đến độ nhớt dịch thủy phân trong không gian ba chiều



Hình 2: Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian thủy phân đến độ nhớt dịch thủy phân trong không gian ba chiều

Điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân được xác định bằng phần mềm Modde 5.0, tương tác

giữa nhiệt độ thủy phân và pH có đường cong có cực đại. Hai yếu tố ảnh hưởng cao nhất đến độ nhớt của dịch thủy phân. Tại điều kiện tối ưu pH = 7,5407; nhiệt độ 64,5918°C; nồng độ E/S (v/w) là 1,7684% và thời gian 256,03 phút thì độ nhớt dịch thủy phân đạt cực tiểu là 2,4033 cP.

Để kiểm chứng tính chính xác của giá trị nhận được từ phương trình hồi quy chúng tôi đã tiến hành 3 mẫu thí nghiệm lặp lại độc lập dựa trên giá trị tối ưu như đã nêu ở trên. Độ nhớt thu được của dịch thủy phân là 2,425 ± 0,0166 cP. Kết quả này gần với kết quả dự đoán từ phương trình hồi quy nêu trên.

3.7 Đánh giá kích thước phân tử của sản phẩm dịch thủy phân

Dịch sau thủy phân đưa đi lọc qua cột lọc và màng lọc Amicon – Milipore (750, 50, 30, 10, 3 kDa), sau đó xác định hàm lượng protein hòa tan theo phương pháp Lowry, kết quả của thu được như sau:

Bảng 12: Kết quả đánh giá kích thước phân tử của dịch thủy phân

Kích thước phân tử (kDa)	Tỉ lệ từng phân đoạn (%)
> 750	31,18
< 750	68,82
50 < x < 750	8,75
< 50	60,07
30 < x < 50	8,62
< 30	51,45
10 < x < 30	6,17
< 10	45,28
3 < x < 10	6,00
< 3	39,28

Kết quả cho thấy dịch thủy phân có kích thước phân tử nhỏ hơn 3kDa chiếm tỉ lệ khá cao (39,28%). Các phân tử có kích thước dưới 50 kDa cũng chiếm tỉ lệ khá cao 60,07% thích hợp với các bệnh nhân có đường tiêu hóa yếu và bắt đầu hồi phục chức năng tiêu hóa (Fink M., Hayes M., Soni N., 2008).

3.8 Xác định mức độ thủy phân

Để xác định mức độ thủy phân tôi lựa chọn phương pháp TCA và kết quả được tóm tắt trong bảng sau:

Bảng 13: Kết quả mức độ thủy phân

Độ hấp thu (OD)	Nồng độ protein (mg/mL)	DH (%)
0,5105	12,844	56,58

Mức độ thủy phân alcalase khá cao (56,58%). So với cùng một loại chế phẩm enzyme alcalase thì quá trình thủy phân trên cơ chất thịt có mức độ cao hơn quá trình thủy phân máu cá ba sa (5,58%) (Trần Thanh Nhân, Trần Nguyễn Tú Oanh, 2009), nhưng thấp hơn quá trình thủy phân da cá hồi (77,03%) (See et al., 2011).

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, quá trình lựa chọn nguồn nguyên liệu từ Vissan với thành phần dinh dưỡng của phần thịt nạc lưng khá ổn định, ẩm (72,9%), protein (22,7%), lipid (2,11%), tro (1,024%), vitamin B₁(1,384mg/100g)). Quá trình thủy phân tạo ra dịch có độ cực tiểu là 2,46 cP phù hợp chấy qua ống sonde nuôi ăn với mức độ thủy phân đạt 44,18% và hàm lượng vitamin B₁ là 0,611 mg/100 g.

Từ kết quả của các quá trình nghiên cứu trên, chúng tôi có thông số công nghệ cho quá trình thủy phân như sau:

Loại enzyme sử dụng là alcalase, điều kiện thủy phân tối ưu tại pH 7,54; nhiệt độ 64,6 °C; nồng độ 1,77%; thời gian: 256 phút. Khi đó, độ nhớt dịch thủy phân đạt cực tiểu là 2,4033 cP, mức độ quá trình thủy phân đạt 56,58 % và khối lượng phân tử tập trung dưới 50 kDa chiếm 60,07%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aspmo SI, Horn SJ, Eijssink VGH, 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*. 40: 1957–1966.
- Diniz AM, Martin AM. 1997. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the hydrolysates. *International Journal of Food and Nutritional Sciences*. 48: 191–200.
- Fink M., Hayes M., Soni N., 2008. Nitrogen requirements in severely injured patients, in *Classic Pappers in Critical Care*, 2nd ed., London, Springer, 287.
- Gerlach and Murphy, 2011. An Update on Nutrition Support in the Critically Ill. *Journal of Pharmacy Practice*. 24: 70-77.
- Jun and Sakayu, 2002. Industrial microbial enzymes: the discovery by screening and use in large scale production of useful chemicals in Japan, *Current Opinion in Biotechnology*. 13:367-375.
- Kristinsson, H.G., Rasco, B.A, 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 40:43-81.
- See, S. F., Hoo, L. L. and Babji, A. S., 2011. *Optimization of enzymatic hydrolysis of salmon (Salmo salar) skin by Alcalase*. *International Food Research Journal*. 18(4), 1359-1365.
- Simpson BK, Nayeri G, Yaylayan V, Ashie NA. 1998. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. *Food Chemistry*. 61: 131–138.
- Shahidi F, Han XQ, Syniowiecki J, 1995. *Food Chemistry*. 53: 285–293.
- Trần Thanh Nhân, Trần Nguyễn Tú Oanh, 2009. *Tối ưu hóa quy trình xử lý máu cá ba sa bằng enzyme*, Nghiên cứu Y học thành phố Hồ Chí Minh, Tập 13, phụ bản số 2, trang 5.
- Vieira G., Martin A., Saker-Sampaio S., Omar S., 1995. Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian lobster (*Panulirus* spp) processing wastes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 69: 61–65.