

# TỐI ƯU HÓA PHẢN ỨNG THỦY PHÂN SỤN KHỚP CHÂN GÀ VỚI XÚC TÁC ENZYME PROTAMEX NHẪM THU DỊCH AXIT AMIN

Nguyễn Thị Minh Nguyệt<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Kim Chi<sup>1</sup>,

Bùi Viết Cường<sup>1,\*</sup>, Bùi Xuân Đông<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành với mục đích tối ưu hóa phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà với xúc tác enzyme Protamex nhằm thu dịch axit amin. Các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà được lựa chọn để tối ưu: Nhiệt độ phản ứng (°C), pH môi trường phản ứng, tỉ lệ enzyme (% dựa trên cơ chất), thời gian phản ứng (phút) và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất (mL: g). Phương trình hồi quy:  $H = -27,6 + 0,81X_1 - 3,74X_2 + 48,0X_3 + 0,303X_4 + 0,134X_5 + 0,22X_1X_2 - 2,13X_1X_3 - 0,0365X_1X_4 - 0,00865X_1X_5 - 0,88X_2X_3 + 0,0084X_2X_4 + 0,0076X_2X_5 - 1,406X_3X_4 + 0,207X_3X_5 + 0,00902X_4X_5 + 0,0241X_1^2 - 0,481X_2^2 + 68,1X_3^2 + 0,01363X_4^2 + 0,00043X_5^2$ , trong đó, H: Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin (%),  $X_1$ : Nhiệt độ phản ứng (°C),  $X_2$ : pH môi trường phản ứng,  $X_3$ : Tỉ lệ enzyme (% dựa trên cơ chất),  $X_4$ : Thời gian phản ứng (phút),  $X_5$ : Tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất (mL: g). Nghiệm tối ưu:  $X_1 = 28,1079^\circ\text{C}$ ;  $X_2 = 3,92793$ ;  $X_3 = 0,282159\%$ ;  $X_4 = 63,7841$  (phút);  $X_5 = 137,568$  (mL: g) với hiệu suất thu nhận nitơ axit amin đạt giá trị cực đại  $H_{\max} = 87,7969\%$  và kì vọng  $d = 1$ . Nghiệm tối ưu của phương trình hồi quy được kiểm tra bằng thực nghiệm với  $H_{\max} = 86,28 \pm 1,59\%$ . Nghiên cứu đã từng bước góp phần nâng cao khả năng ứng dụng của phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà nhằm thu dịch axit amin với xúc tác enzyme Protamex.

**Từ khóa:** Enzyme Protamex, hiệu suất thu nhận nitơ axit amin, tối ưu hóa, phản ứng thủy phân, sụn khớp chân gà.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xử lý và chế biến chất thải rắn từ các phụ phẩm giết mổ gia súc, gia cầm thành các sản phẩm có giá trị nhằm nâng cao hiệu quả kinh tế và giảm lượng chất thải rắn là thử thách lớn và thu hút sự quan tâm nghiên cứu của cộng đồng khoa học [1]. Công nghiệp giết mổ gà đã thải ra môi trường một lượng lớn phụ phẩm hữu cơ: Nội tạng, chân, đầu... lượng phụ phẩm này chiếm 37% tổng khối lượng của gà giết mổ [2]. Các biện pháp xử lý thông thường: Chôn, lấp, ủ... tiềm ẩn các nguy cơ xấu đến môi trường: Ô nhiễm nước, không khí, lây truyền dịch bệnh... là gánh nặng của việc xử lý môi trường. Hiện nay, sụn khớp chân gà được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi, phân bón hữu cơ, sản

xuất hóa chất ở các nước phát triển. Vì có giá trị dinh dưỡng cao nên sụn khớp chân gà được sử dụng làm thực phẩm cho con người với số lượng nhỏ tại châu Á [1]. Collagen có hoạt tính sinh học cao: Xóa nếp nhăn trên da, làm mượt da, chống lão hóa, và nâng cao sức khỏe xương khớp được phát hiện trong sụn khớp chân gà [3, 4]. Tuy nhiên, collagen không thể tiêu hóa và hấp thụ hoàn toàn trong hệ thống tiêu hóa của con người, phần còn sót lại có thể sẽ bị phân hủy và hình thành độc tố: Amoniac, phenol, benzpyrol,... trong khi đó các axit amin có thể được hấp thụ hoàn toàn [5].

Thủy phân sụn khớp chân gà nhằm thu dịch axit amin (hoặc peptide) với xúc tác enzyme [6-8] và axit hữu cơ [9-12] là một giải pháp thay thế nhằm khắc phục những nhược điểm nêu trên. Hiện tại, các nghiên cứu này chỉ dừng lại ở khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà với xúc tác enzyme hoặc axit

<sup>1</sup> Khoa Hóa, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

\*Email: bvcuong@dut.udn.vn.

hữu cơ, miễn tối ưu của phản ứng thủy phân cùng điều kiện tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng chưa được xác định. Do đó, khả năng ứng dụng của các nghiên cứu này với quy mô sản xuất lớn có thể bị hạn chế. Trong nghiên cứu này, phương pháp bề mặt đáp ứng cấu trúc có tâm được sử dụng để tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà với xúc tác enzyme Protamex với hàm mục tiêu là dịch axit amin.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Sụn khớp chân gà

Sụn khớp chân gà đông lạnh (1 kg/1 block) được cung cấp bởi Công ty TNHH Thương mại và Dịch vụ Hoàng Phát - Đà Nẵng. Quá trình chuẩn bị sụn khớp chân gà cho nghiên cứu được tiến hành dựa trên các phương pháp Ponkham và cs (2011) [11], Potti và cs (2017) [12], Cordeiro và cs (2019) [9], Hammon và cs (2019) [10], Pap và cs (2022) [13].

### 2.2. Chất xúc tác và hóa chất

Enzyme Protamex được cung cấp bởi Công ty TNHH Xuất nhập khẩu Vật tư khoa học Quốc tế STECH International. Các hóa chất dùng để nghiên cứu có độ tinh khiết cao.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Quá trình thủy phân sụn khớp chân gà

Phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà được tiến hành dựa trên nghiên cứu của Bezerra và cs (2019) [8], Pap và cs (2022) [13].

#### 2.3.2. Xây dựng mô hình toán học và ma trận thực nghiệm

Các yếu tố ảnh hưởng chính đến phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà được chọn để tối ưu: Nhiệt độ phản ứng ( $^{\circ}\text{C}$ ), pH môi trường phản ứng, tỉ lệ enzyme (% dựa trên cơ chất), thời gian phản ứng (phút) và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất (v: w). Mức, khoảng biến thiên của các yếu tố ảnh hưởng được trình bày ở bảng 1.

**Bảng 1. Mức, khoảng biến thiên của các yếu tố ảnh hưởng**

| Các yếu tố ảnh hưởng                                       | Khoảng biến thiên |           |          |
|------------------------------------------------------------|-------------------|-----------|----------|
|                                                            | Mức dưới          | Mức cơ sở | Mức trên |
| Nhiệt độ phản ứng ( $^{\circ}\text{C}$ , $X_1$ )           | 35                | 40        | 45       |
| pH môi trường phản ứng ( $X_2$ )                           | 3                 | 4         | 5        |
| Tỉ lệ enzyme (% dựa trên cơ chất, $X_3$ )                  | 0,42              | 0,52      | 0,62     |
| Thời gian phản ứng (phút, $X_4$ )                          | 30                | 40        | 50       |
| Tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất (v: w, $X_5$ ) | 70                | 90        | 110      |

Phương trình hồi quy cấp 2 [14] có dạng:

$$H = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_5X_5 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{15}X_1X_5 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{25}X_2X_5 + b_{34}X_3X_4 + b_{35}X_3X_5 + b_{45}X_4X_5 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{44}X_4^2 + b_{55}X_5^2$$

Trong đó: H: Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin (%),  $X_1$ : Nhiệt độ phản ứng ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $X_2$ : pH môi trường phản ứng;  $X_3$ : Tỉ lệ enzyme (% dựa trên cơ chất),

$X_4$ : Thời gian phản ứng (phút),  $X_5$ : Tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất (v:w). Phần mềm Minitab (Version 18, Minitab Inc., Pennsylvania State, USA) được sử dụng để xây dựng ma trận thí nghiệm với phương pháp bề mặt đáp ứng theo phương án cấu trúc có tâm. Ma trận thí nghiệm được trình bày ở bảng 2.

**Bảng 2. Ma trận thí nghiệm**

| STT | $X_1$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) | $X_2$ | $X_3$ (%) | $X_4$ (phút) | $X_5$ (mL: g) |
|-----|------------------------------|-------|-----------|--------------|---------------|
| 1   | 35                           | 3     | 0,42      | 30           | 70            |
| 2   | 45                           | 3     | 0,42      | 30           | 70            |
| 3   | 35                           | 5     | 0,42      | 30           | 70            |
| 4   | 45                           | 5     | 0,42      | 30           | 70            |
| 5   | 35                           | 3     | 0,62      | 30           | 70            |

## KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

|    |        |       |       |        |         |
|----|--------|-------|-------|--------|---------|
| 6  | 45     | 3     | 0,62  | 30     | 70      |
| 7  | 35     | 5     | 0,62  | 30     | 70      |
| 8  | 45     | 5     | 0,62  | 30     | 70      |
| 9  | 35     | 3     | 0,42  | 50     | 70      |
| 10 | 45     | 3     | 0,42  | 50     | 70      |
| 11 | 35     | 5     | 0,42  | 50     | 70      |
| 12 | 45     | 5     | 0,42  | 50     | 70      |
| 13 | 35     | 3     | 0,62  | 50     | 70      |
| 14 | 45     | 3     | 0,62  | 50     | 70      |
| 15 | 35     | 5     | 0,62  | 50     | 70      |
| 16 | 45     | 5     | 0,62  | 50     | 70      |
| 17 | 35     | 3     | 0,42  | 30     | 110     |
| 18 | 45     | 3     | 0,42  | 30     | 110     |
| 19 | 35     | 5     | 0,42  | 30     | 110     |
| 20 | 45     | 5     | 0,42  | 30     | 110     |
| 21 | 35     | 3     | 0,62  | 30     | 110     |
| 22 | 45     | 3     | 0,62  | 30     | 110     |
| 23 | 35     | 5     | 0,62  | 30     | 110     |
| 24 | 45     | 5     | 0,62  | 30     | 110     |
| 25 | 35     | 3     | 0,42  | 50     | 110     |
| 26 | 45     | 3     | 0,42  | 50     | 110     |
| 27 | 35     | 5     | 0,42  | 50     | 110     |
| 28 | 45     | 5     | 0,42  | 50     | 110     |
| 29 | 35     | 3     | 0,62  | 50     | 110     |
| 30 | 45     | 3     | 0,62  | 50     | 110     |
| 31 | 35     | 5     | 0,62  | 50     | 110     |
| 32 | 45     | 5     | 0,62  | 50     | 110     |
| 33 | 28,108 | 4     | 0,52  | 40     | 90      |
| 34 | 51,892 | 4     | 0,52  | 40     | 90      |
| 35 | 40     | 1,621 | 0,52  | 40     | 90      |
| 36 | 40     | 6,378 | 0,52  | 40     | 90      |
| 37 | 40     | 4     | 0,283 | 40     | 90      |
| 38 | 40     | 4     | 0,757 | 40     | 90      |
| 39 | 40     | 4     | 0,52  | 16,216 | 90      |
| 40 | 40     | 4     | 0,52  | 63,784 | 90      |
| 41 | 40     | 4     | 0,52  | 40     | 42,432  |
| 42 | 40     | 4     | 0,52  | 40     | 137,568 |
| 43 | 40     | 4     | 0,52  | 40     | 90      |
| 44 | 40     | 4     | 0,52  | 40     | 90      |
| 45 | 40     | 4     | 0,52  | 40     | 90      |
| 46 | 40     | 4     | 0,52  | 40     | 90      |
| 47 | 40     | 4     | 0,52  | 40     | 90      |
| 48 | 40     | 4     | 0,52  | 40     | 90      |
| 49 | 40     | 4     | 0,52  | 40     | 90      |

|    |    |   |      |    |    |
|----|----|---|------|----|----|
| 50 | 40 | 4 | 0,52 | 40 | 90 |
| 51 | 40 | 4 | 0,52 | 40 | 90 |
| 52 | 40 | 4 | 0,52 | 40 | 90 |

*Ghi chú: STT: Số thứ tự.*

### 2.3.3. Các phương pháp phân tích

#### - Xác định hiệu suất thu nhận nitơ axit amin

Nitơ axit amin của sản phẩm thô được xác định bằng phương pháp của Pope và Stevens (1939) [15]. Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin được tính theo công thức,

$$H_{N-aa} = \frac{M_{N-aa}}{M_{pm}} \times 100\%$$

Trong đó:  $M_{N-aa}$ : Lượng nitơ axit amin có trong sản phẩm thô thu được sau phản ứng thủy phân (g),  $M_{pm}$ : Lượng nitơ protein có trong sụn khớp chân gà (g),  $H_{N-aa}$ : Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin (%).

- Phân tích, đánh giá phương trình hồi quy và tối ưu hóa theo phương án cấu trúc có tâm

Sự tương thích của phương trình hồi quy đối với thực nghiệm, ý nghĩa của hệ số b, mức độ ảnh hưởng của từng yếu tố và sự tương tác giữa các yếu tố đến hiệu suất thu nhận nitơ axit amin được đánh giá qua hệ số  $R^2$ , kiểm định Student, kiểm định Fisher [14, 16, 17].

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Các thí nghiệm được tiến hành theo ma trận thực nghiệm ở bảng 2, mỗi thí nghiệm cho từng điều kiện phản ứng thủy phân được lặp lại 2 lần. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 3, theo đó, giá trị lớn nhất của hiệu suất thu nhận nitơ axit amin có thể đạt được vào khoảng 58% tương ứng với thí nghiệm 25 và thí nghiệm 28.

**Bảng 3. Kết quả thí nghiệm**

| STT | H <sub>1</sub> (%) | H <sub>2</sub> (%) | STT | H <sub>1</sub> (%) | H <sub>2</sub> (%) |
|-----|--------------------|--------------------|-----|--------------------|--------------------|
| 1   | 17,684             | 17,649             | 27  | 44,088             | 44,266             |
| 2   | 35,157             | 32,292             | 28  | 46,502             | 57,895             |
| 3   | 22,017             | 23,579             | 29  | 44,177             | 43,825             |
| 4   | 27,888             | 39,789             | 30  | 43,738             | 36,979             |
| 5   | 20,673             | 23,485             | 31  | 41,601             | 44,266             |
| 6   | 30,763             | 33,963             | 32  | 39,686             | 43,912             |
| 7   | 26,579             | 30,763             | 33  | 24,582             | 24,681             |
| 8   | 22,061             | 20,427             | 34  | 37,971             | 26,316             |
| 9   | 25,003             | 25,003             | 35  | 13,316             | 11,323             |
| 10  | 29,415             | 30,763             | 36  | 28,252             | 36,145             |
| 11  | 27,723             | 25,103             | 37  | 28,421             | 26,526             |
| 12  | 24,903             | 33,827             | 38  | 30,195             | 30,195             |
| 13  | 19,120             | 21,973             | 39  | 37,819             | 32,211             |
| 14  | 19,044             | 17,579             | 40  | 28,650             | 32,082             |
| 15  | 22,150             | 29,592             | 41  | 13,426             | 15,125             |
| 16  | 25,003             | 22,105             | 42  | 43,443             | 31,795             |
| 17  | 41,684             | 39,290             | 43  | 24,632             | 24,632             |
| 18  | 36,686             | 29,926             | 44  | 32,211             | 32,211             |
| 19  | 30,166             | 32,356             | 45  | 32,146             | 32,146             |
| 20  | 45,948             | 50,644             | 46  | 24,632             | 24,632             |
| 21  | 37,351             | 39,290             | 47  | 32,211             | 32,211             |
| 22  | 36,979             | 39,686             | 48  | 32,146             | 32,146             |

## KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

|    |        |        |    |        |        |
|----|--------|--------|----|--------|--------|
| 23 | 39,368 | 34,876 | 49 | 24,632 | 24,632 |
| 24 | 50,543 | 41,684 | 50 | 32,211 | 32,211 |
| 25 | 51,049 | 57,549 | 51 | 32,146 | 32,146 |
| 26 | 36,759 | 39,134 | 52 | 24,632 | 24,632 |

*Ghi chú: STT: Số thứ tự*

Phương trình hồi quy cấp 2 được xây dựng bởi phần mềm Minitab (Version 18):

$$H = -27,6 + 0,81X_1 - 3,74X_2 + 48,0X_3 + 0,303X_4 + 0,134X_5 + 0,220X_1X_2 - 2,13X_1X_3 - 0,0365X_1X_4 - 0,00865X_1X_5 - 0,88X_2X_3 + 0,0084X_2X_4 + 0,0076X_2X_5 - 1,406X_3X_4 + 0,207X_3X_5 + 0,00902X_4X_5 + 0,0241X_1^2 - 0,481X_2^2 + 68,1X_3^2 + 0,01363X_4^2 + 0,00043X_5^2$$

Có 67,90% kết quả thí nghiệm được mô tả bởi phương trình hồi quy cấp 2 tương ứng với giá trị  $R^2$

= 0,6790. Kết quả này có thể chấp nhận được khi số lượng yếu tố ảnh hưởng được dùng để tối ưu hóa khá lớn (5 yếu tố). Kiểm định Student và kiểm định Fisher sử dụng giá trị P để đánh giá ý nghĩa của hệ số b trong phương trình hồi quy, mức độ ảnh hưởng của từng yếu tố và sự tương tác của từng yếu tố đến hiệu suất thu nhận nitor axit amin [14, 16, 17].

**Bảng 4. Kết quả kiểm định Student và kiểm định Fisher**

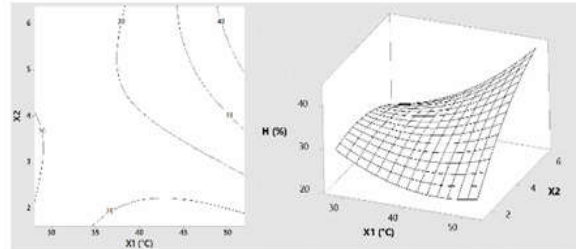
| Phương trình hồi quy | Hệ số b  | Giá trị T | Giá trị F | Giá trị P |
|----------------------|----------|-----------|-----------|-----------|
|                      | $b_0$    | 22,63     |           | 0,000     |
|                      |          |           | 8,78      | 0,000     |
| $X_1$                | $b_1$    | 2,07      | 4,29      | 0,042     |
| $X_2$                | $b_2$    | 2,76      | 7,62      | 0,007     |
| $X_3$                | $b_3$    | -1,19     | 1,41      | 0,238     |
| $X_4$                | $b_4$    | 0,73      | 0,54      | 0,466     |
| $X_5$                | $b_5$    | 11,43     | 130,56    | 0,000     |
| $X_1X_2$             | $b_{12}$ | 1,48      | 2,20      | 0,275     |
| $X_1X_3$             | $b_{13}$ | -1,44     | 2,08      | 0,382     |
| $X_1X_4$             | $b_{14}$ | -2,47     | 6,08      | 0,217     |
| $X_1X_5$             | $b_{15}$ | -1,17     | 1,37      | 0,015     |
| $X_2X_3$             | $b_{23}$ | -0,12     | 0,01      | 0,756     |
| $X_2X_4$             | $b_{24}$ | 0,11      | 0,01      | 0,142     |
| $X_2X_5$             | $b_{25}$ | 0,21      | 0,04      | 0,153     |
| $X_3X_4$             | $b_{34}$ | -1,90     | 3,61      | 0,016     |
| $X_3X_5$             | $b_{35}$ | 0,56      | 0,31      | 0,246     |
| $X_4X_5$             | $b_{45}$ | 2,44      | 5,93      | 0,005     |
| $X_1^2$              | $b_{11}$ | 1,10      | 1,21      | 0,910     |
| $X_2^2$              | $b_{22}$ | -0,88     | 0,77      | 0,837     |
| $X_3^2$              | $b_{33}$ | 1,24      | 1,55      | 0,061     |
| $X_4^2$              | $b_{44}$ | 2,49      | 6,20      | 0,577     |
| $X_5^2$              | $b_{55}$ | 0,31      | 0,10      | 0,017     |

Với mức độ tin cậy 95%, phương trình hồi quy cấp 2 có sự tương thích khá cao đối với thực nghiệm khi  $P = 0,000 < 0,05$ . Các yếu tố có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất thu nhận nitor axit amin: Nhiệt độ phản ứng, pH môi trường phản ứng

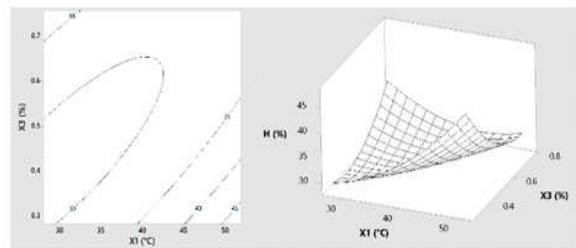
và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất khi P lần lượt là 0,042; 0,007;  $0,000 < 0,05$ . Điều này tương ứng với lý thuyết phản ứng hóa sinh xúc tác bởi enzyme của Lê Ngọc Tú và cs (2002) [18]. Các yếu tố có ảnh hưởng thấp đến hiệu suất thu nhận

nitơ axit amin: tỉ lệ enzyme ( $P = 0,238 > 0,05$ ) và thời gian phản ứng ( $P = 0,466 > 0,05$ ). Đối với quy mô sản xuất pilot và sản xuất lớn, các yếu tố ảnh hưởng: Nhiệt độ phản ứng, pH môi trường phản ứng và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất khi thay đổi để đạt được hiệu suất thu nhận nitơ axit amin cực đại sẽ có chi phí thấp hơn so với sự thay đổi của tỉ lệ enzyme và thời gian phản ứng. Do đó, phương trình hồi quy cấp 2 xây dựng được có mức độ ứng dụng cao trong thực tế sản xuất. Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin chịu ảnh hưởng lớn của sự tương tác giữa các cặp yếu tố: Nhiệt độ phản ứng và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất ( $P = 0,015 < 0,05$ ), tỉ lệ enzyme và thời gian phản ứng ( $P = 0,016 < 0,05$ ). Từ kết quả phân tích này, hai yếu tố ảnh hưởng cùng thay đổi giá trị đồng thời để đạt được hiệu suất thu nhận nitơ axit amin cực đại là các cặp yếu tố: Nhiệt độ phản ứng và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất và tỉ lệ enzyme và thời gian phản ứng. Cặp yếu tố thời gian phản ứng và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất ( $P = 0,905 > 0,05$ ) không nên xem xét để thay đổi đồng thời nhằm tìm giá trị cực đại của hiệu suất thu nhận nitơ axit amin. Tương tác bậc 2 của tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thu nhận nitơ axit amin khi  $P = 0,017 < 0,05$ . Phác đồ đường viền 2D và phác đồ bề mặt 3D cho phép đánh giá tương tác giữa các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất thu nhận nitơ axit amin và dự đoán được hiệu suất thu nhận nitơ axit amin. Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin  $> 40\%$  khi nhiệt độ phản ứng:  $48 - 55^\circ\text{C}$  và pH:  $5 - 6,5$  (Hình 1). Tuy nhiên, trong khoảng biến thiên được khảo sát hiệu suất thu nhận nitơ axit amin không hội tụ do rất khó xác định giá trị của nhiệt độ phản ứng và pH để H đạt giá trị cực đại. Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin  $> 45\%$  khi nhiệt độ phản ứng:  $48 - 55^\circ\text{C}$  và tỉ lệ enzyme:  $0,28 - 0,33\%$  (Hình 2). Mặc dù H hội tụ nhưng đó là giá trị cực tiểu, do đó tương tác giữa nhiệt độ phản ứng và tỉ lệ enzyme có ảnh hưởng nghịch đối với hiệu suất thu nhận nitơ axit amin. Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin  $> 50\%$  khi nhiệt độ phản ứng:  $50 - 55^\circ\text{C}$  và thời gian phản ứng:  $15 - 20$  phút (Hình 3). Tương tự với ảnh hưởng của  $X_1, X_3$  đối với H, hiệu suất thu nhận nitơ axit amin hội tụ tại giá trị cực tiểu. Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin  $> 50\%$  khi nhiệt độ phản ứng:

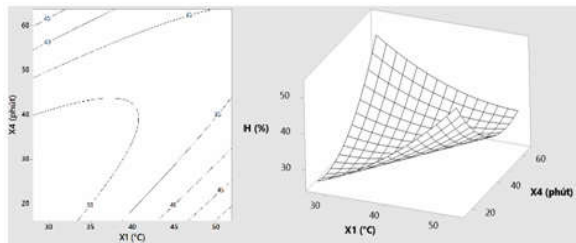
$25 - 33^\circ\text{C}$  và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất:  $131 - 135$  (mL:g) (Hình 4). H có thể tăng khi tăng nhiệt độ phản ứng và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất, điều này phù hợp với lý thuyết phản ứng hóa sinh xúc tác bởi enzyme [18].



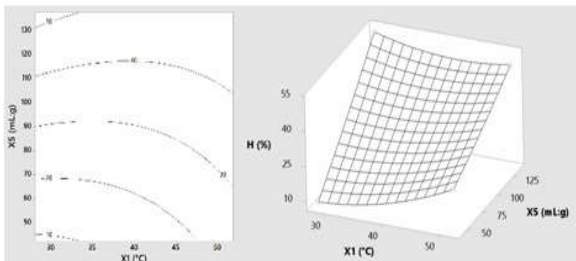
Hình 1. Ảnh hưởng của  $X_1$  ( $^\circ\text{C}$ ) và  $X_2$  đối với H (%) khi  $X_3 = 0,52\%$ ;  $X_4 = 80$  (phút) và  $X_5 = 90$  (mL: g)



Hình 2. Ảnh hưởng của  $X_1$  ( $^\circ\text{C}$ ) và  $X_3$  (%) đối với H (%) khi  $X_2 = 4$ ;  $X_4 = 80$  (phút) và  $X_5 = 90$  (mL: g)



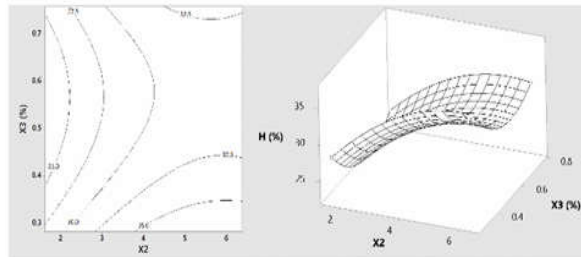
Hình 3. Ảnh hưởng của  $X_1$  ( $^\circ\text{C}$ ) và  $X_4$  (phút) đối với H (%) khi  $X_2 = 4$ ;  $X_3 = 0,52\%$  và  $X_5 = 90$  (mL: g)



Hình 4. Ảnh hưởng của  $X_1$  ( $^\circ\text{C}$ ) và  $X_5$  (mL: g) đối với H (%) khi  $X_2 = 4$ ;  $X_3 = 0,52\%$  và  $X_4 = 40$  (phút)

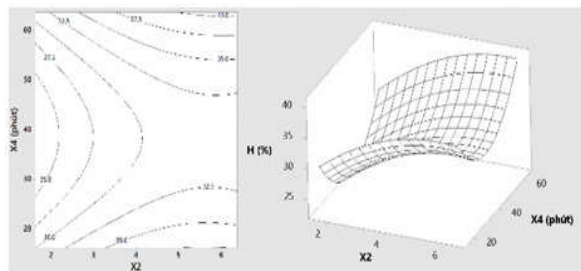
Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin  $> 35\%$  khi pH:  $3,8 - 6,5$  và tỉ lệ enzyme:  $0,28 - 0,35\%$  (Hình 5).

Giá trị của H không hội tụ với ảnh hưởng của  $X_2$  và  $X_3$ , do đó, rất khó để xác định được giá trị cực đại của hiệu suất thu nhận nitơ axit amin với ảnh hưởng của cặp yếu tố pH và tỉ lệ enzyme.

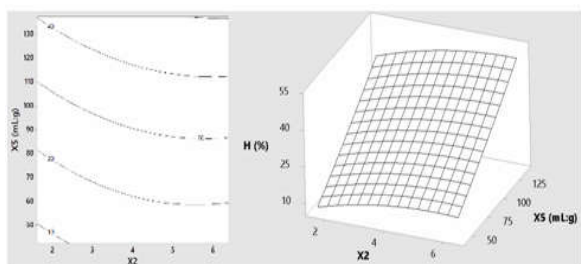


**Hình 5. Ảnh hưởng của  $X_2$  và  $X_3$  (%) đối với H (%) khi  $X_1 = 40^\circ\text{C}$ ;  $X_4 = 40$  (phút) và  $X_5 = 90$  (mL: g)**

Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin > 40% khi pH: 4,8 – 6,5 và thời gian phản ứng: 63 – 65 phút (Hình 6). Dưới ảnh hưởng của cặp yếu tố pH và thời gian phản ứng, hiệu suất thu nhận nitơ axit amin không hội tụ do đó rất khó xác định miền cực đại của hiệu suất thu nhận nitơ axit amin.



**Hình 6. Ảnh hưởng của  $X_2$  và  $X_4$  (phút) đối với H (%) khi  $X_1 = 40^\circ\text{C}$ ;  $X_3 = 0,52\%$  và  $X_5 = 90$  (mL: g)**

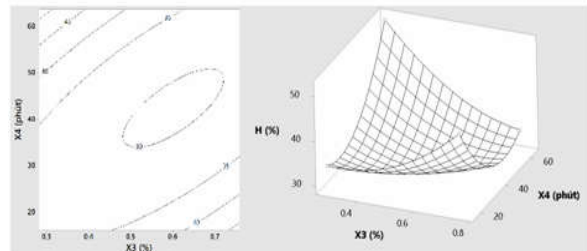


**Hình 7. Ảnh hưởng của  $X_2$  và  $X_5$  (mL: g) đối với H (%) khi  $X_1 = 40^\circ\text{C}$ ;  $X_3 = 0,52\%$  và  $X_4 = 40$  (phút)**

Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin > 50% khi pH: 5,2 – 6,5 và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất: 134 – 135 (mL: g) (Hình 7). Từ phác đồ bề mặt 3D, H tăng khi tăng tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất, ảnh hưởng của pH

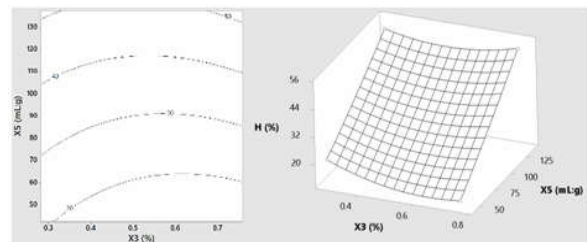
không thay đổi được giá trị của hiệu suất thu nhận nitơ axit amin.

Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin > 50% khi tỉ lệ enzyme: 0,28 – 0,32% và thời gian phản ứng: 62 – 65 phút (Hình 8). Mặc dù P của  $X_3X_4$  là  $0,016 < 0,05$  (Bảng 4), tuy nhiên, miền hội tụ của H đến giá trị cực tiểu và hiệu suất thu nhận nitơ axit amin đạt giá trị lớn nhất tại biên. Do đó, ý nghĩa thực tế khi thay đổi đồng thời cặp yếu tố tỉ lệ enzyme và thời gian phản ứng để có được giá trị cực đại của H bị hạn chế.



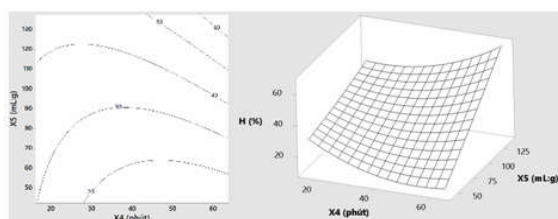
**Hình 8. Ảnh hưởng của  $X_3$  (%) và  $X_4$  (phút) đối với H (%) khi  $X_1 = 40^\circ\text{C}$ ;  $X_2 = 4$  và  $X_5 = 90$  (mL: g)**

Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin > 50% khi tỉ lệ enzyme: 0,67 – 0,8% và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất: 132 – 135 (mL: g) (Hình 9). Tương tự với hình 7, hiệu suất thu nhận nitơ axit amin chịu ảnh hưởng của tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất, sự thay đổi của tỉ lệ enzyme hầu như không ảnh hưởng đến H.



**Hình 9. Ảnh hưởng của  $X_3$  (%) và  $X_5$  (mL: g) đối với H (%) khi  $X_1 = 40^\circ\text{C}$ ;  $X_2 = 4$  và  $X_4 = 40$  (phút)**

Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin > 60% khi thời gian phản ứng: 55 – 65 phút và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất: 125 – 140 (mL:g) (Hình 10). Tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất chiếm ưu thế trong tương tác của  $X_4X_5$  đối với H, do đó ảnh hưởng của cặp yếu tố: thời gian phản ứng và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất đến H rất thấp.



Hình 10. Ảnh hưởng của  $X_4$  (phút) và  $X_5$  (mL: g) đối với  $H$  (%) khi  $X_1 = 40^\circ\text{C}$ ;  $X_2 = 4$  và  $X_3 = 0,52\%$

Phác đồ đường viền 2D và bề mặt 3D cho thấy, hiệu suất thu nhận nitơ axit amin có thể lớn hơn 60% và kết quả phân tích tương thích với kiểm định Student và kiểm định Fisher. Đồng thời chúng cũng cho thấy, hiệu suất thu nhận nitơ axit amin không thể đạt giá trị cực đại với sự thay đổi của một cặp yếu tố ảnh hưởng. Nghiệm tối ưu của phương trình hồi quy:  $X_1 = 28,1079^\circ\text{C}$ ;  $X_2 = 3,92793$ ;  $X_3 = 0,282159\%$ ;  $X_4 = 63,7841$  (phút);  $X_5 = 137,568$  (mL: g) với hiệu suất thu nhận nitơ axit amin đạt giá trị cực đại  $H_{\max} = 87,7969\%$  ở kì vọng  $d = 1$  (Hình 11). Dựa trên hình 11, hiệu suất thu nhận nitơ axit amin sẽ tăng khi nhiệt độ phản ứng ( $X_1$ )

và tỉ lệ enzyme ( $X_3$ ) giảm, tuy nhiên, theo lý thuyết phản ứng hóa sinh xúc tác bởi enzyme của Lê Ngọc Tú và cs (2002) [18], hiệu suất thu nhận sản phẩm sẽ giảm khi giảm nhiệt độ phản ứng và nồng độ enzyme. Cũng theo hình 11, hiệu suất thu nhận nitơ axit amin tăng khi tăng thời gian phản ứng và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất. Tuy nhiên, tại giá trị  $X_4 = 63,7841$  (phút), phản ứng thủy phân đã đạt được trạng thái cân bằng, việc tăng thời gian phản ứng không có ý nghĩa và không có lợi cho quy mô sản xuất pilot và quy mô sản xuất lớn. Xét về tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất, thể tích môi trường phản ứng tăng sẽ kéo theo thể tích thiết bị phản ứng tăng và quá trình cô đặc tách nước sẽ cần thiết nhằm giảm chi phí cho quá trình vận chuyển, bảo quản và ứng dụng sản phẩm thủy phân cho các mục đích tiếp theo. Do đó, dựa trên các phân tích nêu trên, các giá trị tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng đạt được ở nghiên cứu này đáp ứng được mong đợi khi hiệu suất thu nhận nitơ axit amin đạt 87,7969% với kì vọng  $d = 1$ .



Hình 11. Nghiệm tối ưu của phương trình hồi quy và giá trị cực đại của hiệu suất thu nhận nitơ axit amin

Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin thực tế đạt giá trị cực đại  $H_{\max} = 86,279 \pm 1,589\%$  ở điều kiện phản ứng thủy phân tối ưu. Có sự sai khác giữa hiệu suất thu nhận nitơ axit amin tính bằng phương trình hồi quy so với thực nghiệm vì sai số trong quá trình thí nghiệm và tính toán kết quả thí nghiệm.

#### 4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, đã xác định được hiệu suất thu nhận nitơ axit amin đạt giá trị cực đại  $H_{\max} = 86,279 \pm 1,589\%$  khi nhiệt độ phản ứng  $28,11^\circ\text{C}$ ; pH môi trường phản ứng 3,93; tỉ lệ enzyme 0,28%; thời gian phản ứng 63,78 phút; tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: cơ chất 137,57 (mL: g). Nghiên

cứu đã nâng cao khả năng ứng dụng của phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà với xúc tác enzyme Protamex nhằm thu dịch axit amin khi miền tối ưu đã được xác định. Dựa trên kết quả nghiên cứu, quy mô pilot sẽ được tiến hành nhằm kiểm tra lại tính ứng dụng của nghiên cứu ở quy mô sản xuất lớn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Meeker, D. L. (2006). *Essential Rendering - All about the Animal By-products Industry*. National Renderers Association, Virginia.
2. Mangino, E. (2019). AS/Canada projects slightly slower growth in Canadian chicken meat

production for 2020. *GAIN Report Number: CA19029 (8/29/2019) - USDA America*.

3. Nakano, T, Sim, J. S. (1995). A study of the chemical composition of the proximal tibial articular cartilage and growth plate of broiler chickens. *Poultry science*, 74(3): 538-550.

4. Luo, X. M., Fosmire, G. J.; Leach Jr, R. M. (2002). Chicken keel cartilage as a source of chondroitin sulfate. *Poultry Science*, 81(7): 1086-1089.

5. Thureen, P. J. (2012). *Neonatal nutrition and metabolism*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

6. Bui, V. C., Nguyen, T. K. Chi, Bui, X. D. (2020). Screening of factors influencing the hydrolysis reaction of chicken leg cartilage with Protamex enzyme as a catalyst. *The Journal of Agriculture Development*, 19(4): 73-79.

7. Bui, C. V., Nguyen, M. N. T., Nguyen, Q. V., Bui, D. X., Pham, M. T. (2019). Study on hydrolysis reaction of chicken cartilage using Flavourzyme. *UED Journal of Social Sciences, Humanities, Education*, 9(4): 1-6.

8. Bezerra, T. K. A., de Lacerda, J. T. J. G., Salu, B. R., Oliva, M. L. V., Juliano, M. A., Pacheco, M. T. B., Madruga, M. S. (2019). Identification of angiotensin I-converting enzyme-inhibitory and anticoagulant peptides from enzymatic hydrolysates of chicken combs and wattles. *Journal of medicinal food* 22(12): 1294-1300.

9. Cordeiro, A. R. R. d. A., BEZERRA, T. K. A., QUEIROZ, A. L. M. d.; GALVÃO, M. d. S., CAVALCANTI, M. T., PACHECO, M. T. B., Madruga, M. S. (2019). Collagen production from chicken keel bone using acid and enzymatic treatment at a temperature of 30°C. *Food Science Technology*, 40: 491-497.

10. Hammon, K. A., Amanda Dahl BS, CCRA, Guttman, N., Fong, M. (2019). Novel hydrolyzed chicken sternal cartilage extract improves facial epidermis and connective tissue in healthy adult

females: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alternative therapies in health medicine*, 25(5): 12-29.

11. Ponkham, W., Limroongreungrat, K., Sangnark, A. (2011). Extraction of collagen from hen eggshell membrane by using organic acids. *Thai Journal of Agricultural Science*, 44(44): 354-360.

12. Potti, R. B., Fahad, M. (2017). Extraction and characterization of collagen from broiler chicken feet (*Gallus gallus domesticus*) - Biomolecules from poultry waste. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11: 315-322.

13. Pap, N., Mäkinen, S., Moilanen, U., Vahvaselkä, M., Maunuksela, J., Kymäläinen, M., Pihlanto, A. (2022). Optimization of valorization of chicken MDCM to produce soluble protein and collagen peptides. *Applied Sciences*, 12(3): 1327.

14. Montgomery, D. C., Runger, G. C. (2010). *Applied statistics and probability for engineers*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA.

15. Pope, C. G., Stevens, M. Fr. (1939). The determination of amino-nitrogen using a copper method. *Biochemical Journal*, 33(7): 1070.

16. Chen, J., Liu, D., Shi, B., Wang, H., Cheng, Y., Zhang, W. (2013). Optimization of hydrolysis conditions for the production of glucomannan-oligosaccharides from konjac using  $\beta$ -mannanase by response surface methodology. *Carbohydrate polymers*, 93(1): 81-88.

17. Kumar, M, Jain, A. K., Ghosh, M., Ganguli, A. (2012). Statistical optimization of physical parameters for enhanced bacteriocin production by *L. casei*. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 17(3): 606-616.

18. Lê Ngọc Tú, Lê Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thắng, Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẩn, Lê Doãn Diên (2002). *Hóa sinh công nghiệp*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

**OPTIMIZATION OF HYDROLYSIS REACTION OF CHICKEN CARTILAGE BY PROTAMEX ENZYME AS A CATALYST TO OBTAIN AMINO ACID SOLUTION****Nguyen Thi Minh Nguyet<sup>1</sup>, Nguyen Thi Kim Chi<sup>1</sup>, Bui Viet Cuong<sup>1</sup>\*, Bui Xuan Dong<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Faculty of Chemical Engineering, University of Science and Technology,**The University of Danang**\*Email: bvcuong@dut.udn.vn***Summary**

The purpose of this article was to optimize the significant factors affecting the hydrolysis reaction of chicken cartilage by Protamex enzyme as a catalyst to obtain the amino acid solution. The significantly selected factors for optimization with the response surface methodology were reaction temperature (°C), pH, ratio of enzyme (% based on the substrate), reaction time (min), and ratio of reaction volume to the substrate (mL: g). The regression function based on the experimental results was built by Minitab software (Version 18):  $H = -27.6 + 0.81X_1 - 3.74X_2 + 48.00X_3 + 0.303X_4 + 0.134X_5 + 0.220X_1X_2 - 2.13X_1X_3 - 0.0365X_1X_4 - 0.00865X_1X_5 - 0.88X_2X_3 + 0.0084X_2X_4 + 0.0076X_2X_5 - 1.406X_3X_4 + 0.207X_3X_5 + 0.00902X_4X_5 + 0.0241X_1^2 - 0.481X_2^2 + 68.1X_3^2 + 0.01363X_4^2 + 0.00043X_5^2$ , where: H is the efficiency of obtained amino acid (%),  $X_1$  is reaction temperature (°C),  $X_2$  is pH,  $X_3$  is the ratio of the enzyme (% based on the substrate),  $X_4$  is reaction time (min), and  $X_5$  is the ratio of reaction volume to the substrate (mL: g). The optimal solutions of the regression function were  $X_1 = 28.1079^\circ\text{C}$ ,  $X_2 = 3.92793$ ,  $X_3 = 0.282159\%$ ,  $X_4 = 63.7841$  (min), and  $X_5 = 137.568$  (mL: g) which gave the maximal value of obtained amino acid efficiency:  $H_{\max} = 87.7969\%$  with  $d = 1$ . The experimental result at the optimal condition gave the maximal value of obtained amino acid efficiency:  $H_{\max} = 86.279 \pm 1.589\%$ . This research has increased the application ability of the hydrolysis reaction of chicken cartilage using the Protamex enzyme as a catalyst.

**Keywords:** *Protamex enzyme, efficiency of obtained amino acid, optimization, hydrolysis reaction, chicken cartilage.*

**Người phản biện:** PGS.TS. Lê Anh Đức

**Ngày nhận bài:** 4/01/2023

**Ngày thông qua phản biện:** 16/01/2023

**Ngày duyệt đăng:** 24/3/2023