

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN SỤN CÁ HỒI (*Salmon Salar*) BẰNG TỔ HỢP ENZYME ALCALASE - PAPAIN THEO PHƯƠNG PHÁP MẶT ĐÁP ỨNG

Đinh Hữu Đông¹, *

TÓM TẮT

Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu tối ưu hóa quá trình thủy phân sụn cá hồi (*Salmon salar* (Linnaeus, 1758)) bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain. Kết quả nghiên cứu đã xác định được khoảng thông số biên thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain: Khoảng nồng độ enzyme thích hợp là 0,3 - 0,6%, khoảng nhiệt độ thích hợp là 45 - 65°C và khoảng thời gian thích hợp là 3 - 6 giờ. Kết quả tối ưu hóa đã xác định được các thông số tối ưu cho quá trình thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain: Nồng độ enzyme là 0,4%, nhiệt độ thủy phân là 55°C và thời gian thủy phân là 4 giờ. Kết quả thủy phân sụn cá hồi với các thông số ở trên thu được dịch thủy phân với hiệu suất thu chondroitin sulfate đạt 98,52%.

Từ khóa: Tối ưu hóa, hỗn hợp enzyme alcalase - papain, hiệu suất thu chondroitin sulfate, dịch thủy phân sụn cá hồi.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sụn cá hồi (*Salmon salar*) được cho là nguồn nguyên liệu tự nhiên có chứa chondroitin sulfate (CS) với hàm lượng cao nhất [1]. CS là thành phần cơ bản cấu tạo nên sụn khớp và các tổ chức sợi chun giúp cho sự vận động linh hoạt, tính đàn hồi trong hoạt động khớp [2]. Ngoài ra, CS còn là nguyên liệu để cơ thể sản xuất chất nhầy của dịch khớp và giúp chống thoái hóa mô sụn và đảm bảo cho sự vận động của ổ khớp [3, 4, 5]. Chính vì thế, CS được coi là thực phẩm chức năng để hỗ trợ điều trị các bệnh lý về xương khớp. Do đó, đã tiến hành nghiên cứu thủy phân sụn cá hồi bằng phương pháp sử dụng enzyme protease và thu dịch thủy phân chứa CS, các chất tự nhiên từ sụn cá hồi để định hướng dùng làm thực phẩm chức

năng. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu tối ưu hóa quá trình thủy phân sụn cá hồi bằng tổ hợp enzyme alcalase - papain.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

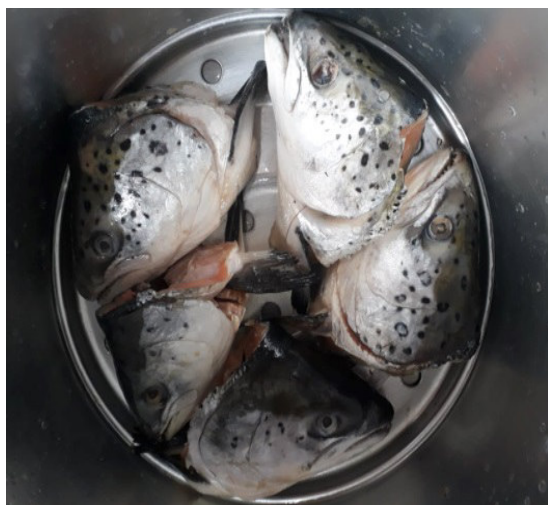
2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Sụn cá hồi

Cá hồi (*Salmon salar*) thường được các công ty thủy sản (Công ty TNHH Cholimex, Sài Gòn Food, Khu công nghiệp Vĩnh Lộc, huyện Bình Chánh, thành phố Hồ Chí Minh) nhập khẩu, chế biến để thu thịt cá, phần đầu cá được mua lại. Đầu cá tươi có khối lượng trung bình 0,3 - 0,5 kg/đầu. Sau thu mua, vận chuyển về phòng thí nghiệm, tiến hành xử lý loại bỏ thịt, mô liên kết, làm sạch, thu sụn, xay nhỏ, cấp đông và bảo quản đông ở - 20°C để dùng trong suốt quá trình nghiên cứu.

¹Trường Đại học Công Thương thành phố Hồ Chí Minh

*Email: dongdh@huit.edu.vn



Hình 1. Hình ảnh sụn cá hồi trước và sau khi xử lý

2.1.2. Enzyme alcalase

Enzyme alcalase 2.4L là chế phẩm protease thương mại do hãng Novozyme - Đan Mạch cung cấp. Alcalase thuộc nhóm enzyme serine endopeptidase có các đặc tính kỹ thuật như sau: pH thích hợp trong khoảng 6 - 8, nhiệt độ thích hợp 30 - 65°C, hoạt tính 2,4 AU/g được bảo quản ở 0 - 5°C.

2.1.3. Enzyme papain

Papain thương mại có hoạt tính $\geq 2,0$ mAnsonU/mg (cơ chất hemoglobine, pH 6, nhiệt độ 35,5°C) do Merck - Đức sản xuất. Papain là một enzyme chịu được nhiệt độ tương đối cao. Ở dạng nhựa khô, papain không bị biến tính trong 3 giờ ở 100°C, còn ở dạng dung dịch, papain bị mất hoạt tính sau 30 phút ở nhiệt độ 82,5°C. Papain có pH thích hợp 4,5 - 8,5, dễ bị biến tính ở pH < 4,5 và ở pH > 12.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Các phương pháp phân tích

* Xác định lượng hàm lượng nitơ tổng số: Hàm lượng nitơ tổng số (N_{ts}) được định lượng theo phương pháp Kjeldahl [6].

* Phương pháp định lượng CS: Định lượng CS bằng phương pháp so mẫu theo Farndale [7].

Nguyên lý: Dựa trên sự thay đổi trong quang phổ hấp thụ của DMMB (1,9 Dimethylmethylene) khi tác dụng với CS (glycosaminoglycan sulfate) ở bước sóng 525 nm. Dựa vào đường chuẩn của CSA

(gốc sulfate gắn ở vị trí C-4 (chondroitin-4-sulfate), CS4) với DMMB để xác định hàm lượng CS. Phương pháp này có độ nhạy cao, có thể định tính và định lượng hàm lượng CS ở mức μg .

* Hàm lượng protein thô: Hàm lượng protein thô (P) được xác định theo công thức: $P = N_{ts} \times 6,25$ [6, 8, 9, 10, 11, 12].

* Hiệu suất thu chondroitin: Hiệu suất thu CS là tỷ số tính theo phần trăm giữa hàm lượng CS có trong dịch thủy phân so với hàm lượng CS có trong nguyên liệu sụn cá hồi. Hiệu suất thu CS được tính như sau:

$$H_c = \frac{C_1}{C} \times 100\%$$

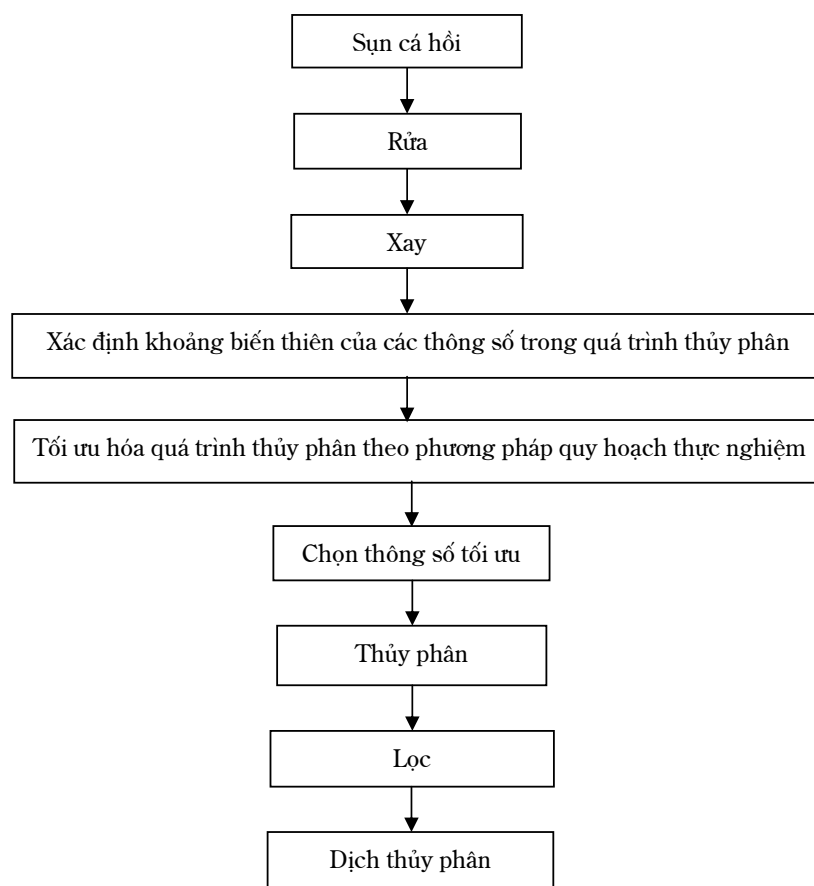
Trong đó: H_c là hiệu suất thu CS(%); C là hàm lượng CS có trong nguyên liệu sụn cá hồi; C_1 là hàm lượng CS có trong dịch thủy phân [12].

2.2.2. Xây dựng mô hình thực nghiệm

Tiến hành tối ưu hóa quá trình thủy phân theo phương pháp bề mặt đáp ứng Box-Behnken với mục tiêu hiệu suất thu CS cao nhất [2, 9, 10, 13, 14, 15, 16]. Các yếu tố được lựa chọn cho quá trình tối ưu hóa là: nồng độ enzyme (X_1), nhiệt độ thủy phân (X_2) và thời gian thủy phân (X_3) sao cho hàm mục tiêu (Y) là hiệu suất thu CS cao nhất. Để xác định được thông số tối ưu cho quá trình thủy phân thu dịch thủy phân chứa CS, đã tiến hành bố trí thí nghiệm theo sơ đồ ở hình 2. Từ sơ đồ này, tiến hành xác định khoảng biến thiên của tỷ lệ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân trong quá trình

thủy phân sụn cá hồi bằng tổ hợp enzyme alcalase - papain theo tỷ lệ 60 - 40. Sau khi chọn được khoảng biến thiên của tỷ lệ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân, đã tiến hành tối ưu hóa quá

trình thủy phân sụn cá hồi nhằm tạo thành dịch thủy phân có hàm lượng CS và hiệu suất thu chondroitin cao.



Hình 2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm tổng quát

Để xác định được thông số tối ưu, đã sử dụng phương pháp quy hoạch bậc hai tâm xoay cho 3 yếu tố và mỗi yếu tố tiến hành tại 5 mức. Quy hoạch thực nghiệm gồm 15 thí nghiệm. Tính toán hệ số hồi quy với hàm mục tiêu là hiệu suất thu CS cao nhất với các biến lần lượt là: X_1 = Nồng độ

enzyme (%), X_2 = Nhiệt độ thủy phân ($^{\circ}\text{C}$) và X_3 = Thời gian thủy phân (giờ). Thí nghiệm sử dụng RSM trong phần mềm JMP10 để bố trí và tối ưu hóa các nhân tố thí nghiệm. Mỗi nhân tố được khảo sát với 5 mức độ $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$. Kết quả thiết kế thí nghiệm trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Mã hóa biến và các mức độ khảo sát

Các yếu tố	Mức tiến hành				
	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
X_1 = Nồng độ enzyme (%)	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
X_2 = Nhiệt độ thủy phân ($^{\circ}\text{C}$)	45	50	55	60	65
X_3 = Thời gian thủy phân (giờ)	2	3	4	5	6

Ghi chú: $\alpha = 2$, giá trị cận trên (+1) và cận dưới (-1) của biến độc lập, $(\text{Biến ảo min} + \text{Biến ảo max})/2$ là giá trị trung bình của cận trên và cận dưới.

Phân tích số liệu: Thí nghiệm được thực hiện theo thiết kế như ở bảng 1. Phép phân tích phương sai được sử dụng để phân tích ảnh hưởng của các yếu tố trong thí nghiệm tới hàm mục tiêu. Sau đó, tiến hành loại bỏ những yếu tố ảnh hưởng không đáng kể tới hàm mục tiêu với độ khác biệt nhỏ nhất (LSD) ở mức ý nghĩa 95%. Mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của các biến độc lập đối với biến phụ thuộc có dạng hàm đa thức bậc hai ở dạng tổng quát như sau:

$$Y_k = B_0 + \sum_{j=1}^3 B_j X_j + \sum_{i,j=1}^3 B_{ij} X_i X_j + \sum_{j=1}^3 B_{jj} X_j^2$$

Trong đó: Y_k là biến phụ thuộc ($k = 1 - 3$); $X_{i,j}$ là nhân tố mã hóa của biến độc lập ảnh hưởng đến Y_k ; B_0 là hệ số hồi quy bậc 0; B_j là hệ số hồi quy bậc 1 mô tả ảnh hưởng của biến X_j đến Y_k ; B_{ij} là hệ số ảnh hưởng đồng thời của biến X_i và X_j đến Y_k ; B_{jj} là hệ số hồi quy bậc hai mô tả ảnh hưởng của biến X_j^2 đến Y_k .

Đánh giá mô hình:

Mô hình và phương trình hồi quy được kiểm tra mức độ phù hợp với thực nghiệm bằng kiểm định Fisher (với giá trị $P\text{value} < \alpha = 0,05$) và sự thiếu phù hợp (Lack of fit). Nếu giá trị $P\text{value}$ nhỏ hơn giá trị α và càng nhỏ thì mô hình càng phù hợp (giá trị α thường lấy 0,05 - tức là 5%). Hệ số Lack of fit phải lớn hơn giá trị α (lớn hơn 0,05) thì mô hình đó mới phù hợp, giá trị Lack of fit càng lớn thì mức độ phù hợp của mô hình càng chính xác. Ngoài ra còn có một số các thông số đánh giá khác như hệ số tương quan (Correlation coefficient) giữa các kết quả dự đoán của mô hình ($\hat{Y}$) với các kết quả thực nghiệm (Y), hệ số xác định (Coefficient of Determination) và độ lệch chuẩn tương đối CV% (Coefficient of Variation). Cuối cùng, thực hiện việc phân tích tại điểm tối ưu với các điều kiện nồng độ enzyme, nhiệt độ thủy phân, thời gian thủy phân trong mẫu tìm thấy và so sánh với kết quả dự đoán để kiểm tra sự chính xác của mô hình dự đoán.

2.3. Thiết bị và hóa chất

2.3.1. Thiết bị

Sử dụng các thiết bị hiện có tại Trung tâm Thí nghiệm Thực hành - Trường Đại học Công Thương thành phố Hồ Chí Minh: Máy so màu UV-VIS DR6000 - Hach (Mỹ), bể ổn nhiệt Memmert WNB14 - Đức, máy ly tâm lạnh tốc độ cao Hermle Z36HK - Đức, bể ổn nhiệt Memmert WNB22 (Đức), nồi thủy phân dung tích 30 lít (Việt Nam),...

2.3.2. Hóa chất

Các hóa chất sử dụng trong thí nghiệm đều là hoá chất tinh khiết do Merck - Đức cung cấp.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm đều tiến hành lặp lại 3 lần độc lập và số liệu là kết quả trung bình của các lần thí nghiệm. Kiểm tra sự khác biệt giữa các số liệu thống kê bằng phần mềm Box-Behnken 20 trên JMP 10.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian đến quá trình thủy phân sụn cá hồi

3.1.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme alcalase - papain đến hiệu suất thu dịch đậm

Tiến hành thí nghiệm khảo sát khoảng biến thiên của nồng độ enzyme thủy phân đến hiệu suất thu chondroitin sulfate, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số (Bảng 2).

Kết quả bảng 2 cho thấy, nồng độ enzyme alcalase - papain có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu suất thu CS và khi tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain trong khoảng 0,1 - 0,5%, thì hiệu suất thu CS cũng tăng theo chiều tăng của nồng độ enzyme và đạt cực đại $98,52 \pm 0,04\%$ khi nồng độ enzyme alcalase - papain là 0,4%. Khi tăng nồng độ enzyme alcalase - papain >0,4% thì hiệu suất thu CS tăng không đáng kể. Trong khi đó, hàm lượng nitơ tổng và hàm lượng CS cũng có xu thế tăng theo chiều tăng của nồng độ enzyme alcalase - papain trong khoảng 0,1 - 0,4% và khi tăng nồng độ enzyme alcalase - papain >0,4% thì mức độ tăng của hàm lượng nitơ tổng và hàm lượng CS có xu thế chậm dần.

Từ các phân tích ở trên cho thấy, nồng độ tổ hợp enzyme alcalase - papain thích hợp để hiệu

suất thu CS, hàm lượng CS, hàm lượng nitơ tổng - papain thích hợp cho quá trình thủy phân là 0,3% - số cao là 0,4% và khoảng nồng độ enzyme alcalase 0,6%.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme alcalase - papain đến hiệu suất thu

CS cao nhất, hàm lượng CS và nitơ tổng số

Nồng độ enzyme alcalase - papain (%)	Hàm lượng nitơ tổng (g/lít)	Hàm lượng CS (mg/ml)	Hiệu suất thu nhận CS(%)
0,1	5,82 ^b ± 0,11	22,12 ^c ± 0,12	98,15 ^a ± 0,05
0,2	5,97 ^c ± 0,14	22,31 ^b ± 0,13	98,30 ^c ± 0,03
0,3	6,08 ^b ± 0,17	22,40 ^c ± 0,15	98,47 ^b ± 0,01
0,4	6,11 ^a ± 0,15	22,79 ^b ± 0,18	98,52 ^a ± 0,04
0,5	6,12 ^a ± 0,12	22,82 ^b ± 0,17	98,53 ^b ± 0,03
0,6	6,12 ^a ± 0,08	22,82 ^b ± 0,11	98,53 ^b ± 0,02

3.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến hiệu suất thu CS, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất thu CS, hàm lượng CS và nitơ tổng số

Nhiệt độ thủy phân (°C)	Hàm lượng nitơ tổng (g/lít)	Hàm lượng CS (mg/ml)	Hiệu suất thu CS (%)
35	3,04 ^c ± 0,13	22,04 ^c ± 0,11	87,84 ^c ± 0,06
40	5,39 ^a ± 0,11	22,14 ^c ± 0,17	98,17 ^c ± 0,07
45	5,94 ^c ± 0,13	22,26 ^b ± 0,15	98,30 ^b ± 0,05
50	6,03 ^a ± 0,14	22,30 ^b ± 0,12	98,47 ^b ± 0,01
55	6,11 ^b ± 0,19	22,79 ^a ± 0,14	98,52 ^a ± 0,02
60	6,12 ^b ± 0,15	22,80 ^a ± 0,08	98,58 ^a ± 0,03
65	6,13 ^b ± 0,17	22,80 ^a ± 0,13	98,58 ^a ± 0,04

Kết quả phân tích ở bảng 3 cho thấy, nhiệt độ thủy phân cũng ảnh hưởng đến hiệu suất thu CS và hàm lượng CS của dịch thủy phân. Khi tăng nhiệt độ thủy phân trong khoảng 35 - 65°C, thì hiệu suất thu CS, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số của dịch thủy phân tăng theo chiều tăng nhiệt độ thủy phân và đạt mức cao nhất khi nhiệt độ thủy phân là 55°C. Cụ thể, khi nhiệt độ thủy phân là 55°C, hiệu suất thu CS, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số đạt mức gần nhất, tương ứng là 98,52 ± 0,02%; 22,79 ± 0,14 mg/ml và 6,11 ± 0,19 g/l. Nếu tiếp tục tăng nhiệt độ thủy phân >55°C thì hiệu suất thu CS, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số có xu hướng tăng không đáng kể hoặc không tăng và sự chênh lệch về hiệu suất

thu CS, hàm lượng CS, hàm lượng nitơ tổng số khi thủy phân giữa nhiệt độ 55, 60 và 65°C không có ý nghĩa thống kê.

Từ các phân tích ở trên cho thấy, nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain để có hiệu suất thu CS, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số trong dịch thủy phân cao là 55°C và khoảng nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá hồi là 45 - 65°C.

3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất thu CS, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số có trong dịch thủy phân được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất thu CS, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số

Thời gian thủy phân (giờ)	Hàm lượng nitơ tổng số (mg/lít)	Hàm lượng CS (mg/ml)	Hiệu suất thu CS (%)
1	5,78 ^c ± 0,16	22,23 ^a ± 0,14	98,15 ^a ± 0,03
2	5,91 ^c ± 0,15	22,41 ^a ± 0,11	98,36 ^a ± 0,05
3	6,02 ^b ± 0,14	22,44 ^b ± 0,13	98,48 ^b ± 0,04
4	6,11 ^b ± 0,12	22,79 ^c ± 0,16	98,52 ^c ± 0,01
5	6,14 ^a ± 0,19	22,81 ^c ± 0,18	98,53 ^b ± 0,07
6	6,15 ^a ± 0,21	22,81 ^b ± 0,19	98,54 ^b ± 0,06
7	6,15 ^a ± 0,22	22,51 ^b ± 0,12	98,54 ^b ± 0,04

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, thời gian thủy phân cũng có ảnh hưởng đến hiệu suất thu CS, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số của dịch thủy phân. Khi thời gian thủy phân tăng trong khoảng 1 - 7 giờ thì hiệu suất thu CS, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số của dịch thủy phân tăng theo chiều tăng thời gian thủy phân và đạt giá trị cao nhất khi thời gian thủy phân là 4 giờ. Do khi tăng thời gian thủy phân lên > 4 giờ thì hiệu suất thu CS, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số của dịch thủy phân có xu thế tăng không đáng kể và kết quả phân tích thống kê cho thấy sự khác biệt về hiệu suất thu CS, hàm lượng CS và hàm lượng

nitơ tổng số của dịch thủy phân khi thời gian thủy phân là 4, 5, 6 và 7 giờ không có ý nghĩa thống kê.

Từ các phân tích ở trên cho thấy, thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain để có hiệu suất thu CS, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số trong dịch thủy phân cao là 4 giờ và khoảng thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá hồi là 3 - 6 giờ.

3.2. Tối ưu hóa quá trình thủy phân tạo dịch đậm

Kết quả tối ưu hóa quá trình thủy phân với mục tiêu hiệu suất thu CS cao được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Bố trí thí nghiệm và kết quả quy hoạch trực tâm quay (RCCD) với hàm mục tiêu Y (hiệu suất thu CS) theo nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân

STT	Ma trận thí nghiệm	Biến mã hóa			Hiệu suất: Y (%)
		Nồng độ: X ₁ (%)	Nhiệt độ: X ₂ (°C)	Thời gian: X ₃ (giờ)	
1	0 0 0	0,4	55	4	98,13
2	0 + -	0,4	60	3	47,71
3	+ 0 -	0,5	55	3	82,62
4	+ - 0	0,5	50	4	42,24
5	++ 0	0,5	60	4	85,51
6	+ 0 +	0,5	55	5	98,66
7	-- 0	0,3	50	4	45,51
8	0 0 0	0,4	55	4	98,65
9	0 - +	0,4	50	5	42,34
10	0 - -	0,4	50	3	28,91

11	0 + +	0,4	60	5	89,85
12	0 0 0	0,4	55	4	98,78
13	- 0 +	0,3	55	5	86,79
14	- 0 -	0,3	55	3	42,11
15	- + 0	0,3	60	4	34,32

Bảng 6. Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) đến hàm mục tiêu

Source	DF	SS	MS	F-value	P-value	R2
Model	9	10504,872	1167,21	38,2691	36,5986	1,0000
Error	5	152,500	30,50	0,0522		
C, total	14	10657,372				
Lack of fit	3	152,26338	50,7545	53,2611	429,0318	
Pure error	2	0,23660	0,1183			
Total error	5	152,49998		0,0522		

DF: degrees of freedom, SS: sum of square, MS: mean square.

Kết quả tối ưu hóa cho thấy, hệ số tương quan R (coefficient of correlation) giữa kết quả thực nghiệm và kết quả của mô hình dự đoán về nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân thể hiện qua giá trị của hệ số tương quan R (Bảng 6). Hệ số tương quan R cao cho thấy có sự tương đồng giữa kết quả dự đoán và kết quả thực nghiệm. Cụ thể, với $R = 1,0$ (cao nhất hay tối đa) có nghĩa là 100% tức là hiệu suất thu CS hoàn toàn chịu ảnh hưởng của nồng độ enzyme (X_1), nhiệt độ (X_2),

thời gian thủy phân (X_3) và không có hay có 0% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được nguyên nhân gây ra (sai số ngẫu nhiên). Hình 3 còn cho thấy hiệu suất thực nghiệm quá trình thủy phân sụn cá hồi nằm gần như trùng hoàn toàn trên đường mô hình dự đoán, hiệu suất thu CS cao nhất đạt gần tới đỉnh 96 - 99%, điều này chứng tỏ phương trình hồi quy đã mô tả chính xác các số liệu thực nghiệm.

Bảng 7. Ước tính các hệ số tuyến tính, tương tác và bình phương của các phương trình hồi quy dự đoán mức độ ảnh hưởng của các nhân tố thủy phân đến hàm mục tiêu (Y%)

Nguồn	Bậc tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị mô hình thực F-Value	Sự thiếu phù hợp P-Value
Biến mã hoá		98,52	3,188521	30,16	<0,0001*
X_1	1,00	12,5375	1,952562	6,42	0,0014*
X_2	1,00	12,29875	1,952562	6,30	0,0016*
X_3	1,00	14,53625	1,952562	7,44	0,0007*
$X_1 * X_2$	1,00	13,615	2,76134	4,93	0,0048*
$X_1 * X_3$	1,00	-7,16	2,76134	-2,59	0,0524
$X_2 * X_3$	1,00	7,1775	2,76134	2,60	0,0468*
$X_1 * X_1$	1,01	-10,64125	2,874094	-3,70	0,0146*
$X_2 * X_2$	1,01	-35,98375	2,874094	-12,52	<0,0001*
$X_3 * X_3$	1,01	-10,33375	2,874094	-3,60	0,0179*

Kiểm định tính tương thích tổng quát của mô hình với thực nghiệm (F-test hay kiểm định Fisher) được thể hiện ở bảng 7. Kiểm định giá trị F cho sự thiếu phù hợp của mô hình (lack of fit) là kiểm định sự thiếu phù hợp của mô hình bằng cách so sánh sự mất mát của các giá trị quan sát (tổng phương sai của giá trị thực nghiệm so với giá trị dự đoán) với phương sai của các lần chạy điểm lặp tâm, kết quả thu được trong bảng 7 là $P < 0,001^* < \alpha = 0,05$ và giá trị Lack of fit = $0,1347 > \alpha = 0,05$ (Bảng 6) cho thấy, sự tồn tại của giả thiết đảo là “không có sự thiếu phù hợp?” hay sự sai khác giữa hai phương sai này là không đáng kể, từ đó kết luận mô hình phù hợp. Bên cạnh đó, hệ số biến thiên theo độ lệch chuẩn thấp (trung bình bình phương $X_1 = 0,33$; $X_2 = 0,33$ và $X_3 = 0,33$) chứng tỏ rằng các thí nghiệm được thực hiện chính xác và độ lặp lại cao.

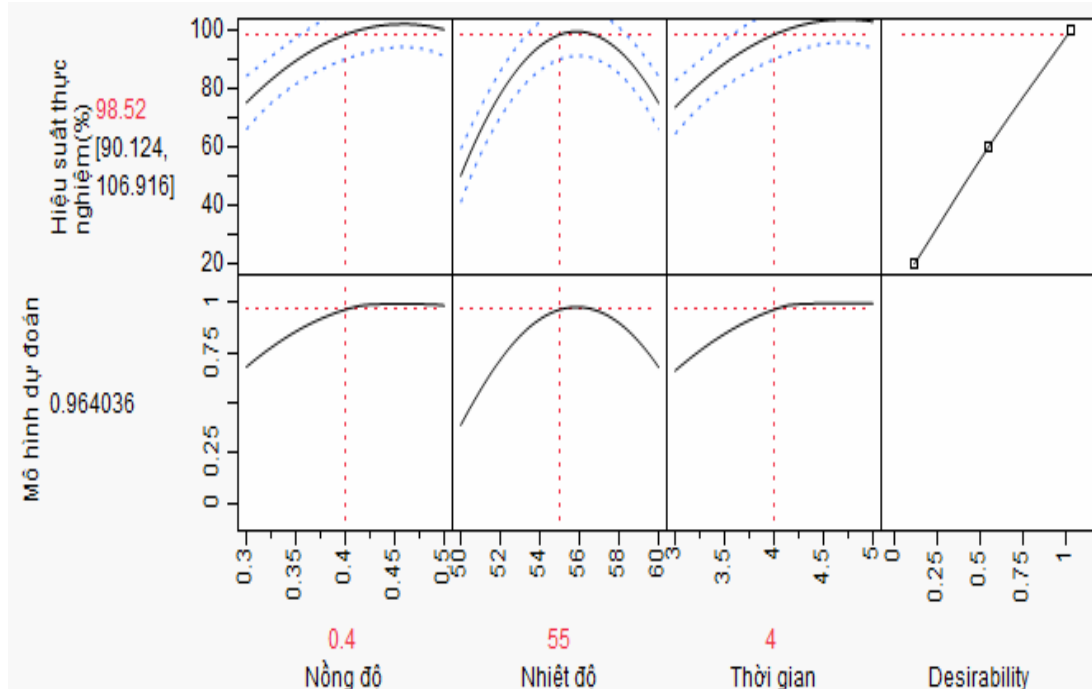
Giá trị P_{value} của nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân lần lượt là $P_{\text{value}}(X_1) < 0,001^*$, $P_{\text{value}}(X_2) < 0,001^*$ và $P_{\text{value}}(X_3) < 0,001^*$, nghĩa là chỉ nhỏ hơn 0,001% sự thay đổi của giá trị F là phần nhiều mà mô hình không tính toán được. Kết quả

này cho thấy độ tương thích tốt của phương trình hồi quy so với số liệu thực nghiệm, chứng tỏ độ tin cậy thống kê cao.

Các kết quả kiểm định cho thấy, sự đúng đắn của các mô hình xây dựng được. Từ đó, biểu thức toán học mô tả mối quan hệ giữa nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân với các biến mã hóa (điều kiện khảo sát) như sau:

$$Y = 98,52 + 12,5375 X_1 + 12,42375 X_2 + 14,66125 X_3 + 13,625 X_1 X_2 - 7,16 X_1 X_3 + 7,4275 X_2 X_3 - 10,76625 X_1 X_1 - 35,85875 X_2 X_2 - 10,20875 X_3 X_3 \quad (1)$$

Trong vùng khảo sát, phương trình hồi quy cho thấy hiệu suất thu CS(Y) chịu ảnh hưởng bậc một của yếu tố nghiên cứu X_1, X_2, X_3 ; bậc hai của cả 3 yếu tố nghiên cứu X_1, X_2, X_3 và chịu ảnh hưởng đồng thời của các cặp yếu tố $(X_1 X_2), (X_1 X_3), (X_2 X_3)$. Trong đó, ảnh hưởng mạnh nhất tới hàm lượng CS và hiệu suất thủy phân là cặp yếu tố $(X_2 X_2)$, và ít ảnh hưởng nhất là cặp yếu tố $(X_1 X_1)$ (Hình 3).



Hình 3. Mối tương quan giữa mô hình lý thuyết và thực nghiệm của các nhân tố thủy phân đến giá trị tối ưu của quá trình thủy sụn cá hồi

Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) ảnh hưởng của các biến - yếu tố thủy phân đến hàm mục tiêu - hiệu suất thu CS cho thấy tất cả các biến bậc một, bậc 2 và tương tác giữa các biến đều có ảnh hưởng đến hàm mục tiêu ($p < 0,0001 < \alpha = 0,05$). Các biến X_1 , X_2 , X_3 , X_1^2 , X_2^2 và X_3^2 có ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu ($p < 0,05$).

Kết quả phân tích phương sai trong bảng 6 và phương trình hồi quy cho thấy, hệ số của các biến bậc hai và tương tác giữa các biến có giá trị âm còn các biến bậc nhất có hệ số dương. Điều này cho thấy hàm mục tiêu đồng biến với X_1 , X_2 , X_3 , $X_1 \cdot X_2$, $X_2 \cdot X_3$ và nghịch biến với X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 và $X_1 \cdot X_3$. Nhưng độ lớn của hệ số các biến bậc hai lớn (cao nhất là 39,82 của X_2^2) nên ảnh hưởng nhiều nhất đến hàm mục tiêu. Còn hệ số của các tương tác $X_1 \cdot X_2$, $X_2 \cdot X_3$ và $X_1 \cdot X_3$ nhỏ (cao nhất chỉ là 12,40 $X_1 \cdot X_2$) nên ảnh hưởng là không lớn đến hàm mục tiêu (1).

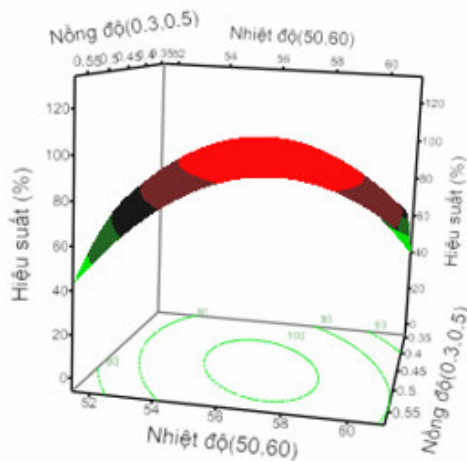
Hình 3 cho thấy, khi nồng độ enzyme tăng thì hiệu suất thu CS cũng tăng theo và tăng cao nhất tại nồng độ enzyme 0,4%. Nếu tiếp tục tăng nồng độ enzyme >0,4% thì hiệu suất đi theo đường nằm ngang, có nghĩa là hiệu suất không tăng thêm khi tăng nồng độ enzyme, do nồng độ enzyme đã cân bằng với nồng độ cơ chất, nên hiệu suất thu CS không tăng thêm. Tiếp theo, với nhiệt độ thủy phân: khi tăng nhiệt độ thủy phân thì hiệu suất thu CS cũng tăng theo và hiệu suất đạt cao nhất tại 55°C. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ >55°C thì hiệu suất không tăng, mà ngược lại còn giảm xuống. Kết quả này có thể lý giải là khi giữ phản ứng thủy phân ở nhiệt độ cao trong một thời gian dài enzyme sẽ không bền với nhiệt độ nên hiệu suất thu CS giảm. Tương tự với biến thời gian: khi tăng thời gian thủy phân thì hiệu suất thu CS cũng tăng và hiệu suất đạt cao nhất khi thời gian thủy phân là 4 giờ. Nếu thời gian thủy phân >4 giờ thì đường biểu diễn hiệu suất sẽ đi theo chiều nằm ngang. Kết quả này có nghĩa là cơ chất đã bị thủy phân, tức là lượng CS có trong sụn cá hồi đã hoàn toàn giải phóng ra dịch thủy phân nên hiệu suất thu CS không tăng.

Tiến hành giải bài toán tối ưu bằng cách chấp mục tiêu theo thuật toán “hàm mong đợi”. Kết quả tối ưu hóa thu được $X_1 = 0,4$ nghĩa là nồng độ hỗn enzyme alcalase - papain thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá hồi là 0,4%, $X_2 = 55$ nghĩa là nhiệt độ thủy phân thích hợp cho quá trình thủy phân là 55°C, $X_3 = 04$ tức thời gian thủy phân thích hợp là 4 giờ. Khi đó hàm mục tiêu (Y) - hiệu suất thu CS đạt 98,52% và hàm lượng chondroitin sulfate, hàm lượng nitơ tổng số của dịch thủy phân đạt tương ứng là 40,5 mg/mL và 7,46 g/lít dịch thủy phân.

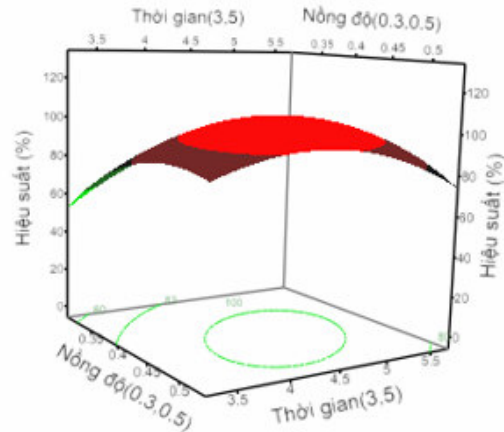
Như vậy, trong điều kiện tối ưu về nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân thì hiệu suất thu CS đạt 98,52% so với mục tiêu mong muốn từ mô hình là 96,40% (Hình 7).

Xu hướng ảnh hưởng của các thông số đến quá trình thủy phân được giải thích như sau: nồng độ enzyme ảnh hưởng tích cực tới hiệu suất thu CS, khi nồng độ enzyme thấp (<0,2%) thì hiệu suất thu CS chưa cao do thừa cơ chất và nồng độ enzyme chưa đủ, còn khi nồng độ enzyme cao (>0,4%) thì phản ứng thủy phân xảy ra hoàn toàn và bắt đầu dư thừa enzyme dẫn tới tình trạng lãng phí enzyme. Tương tự, nhiệt độ thủy phân cũng ảnh hưởng tích cực tới hiệu suất thu CS, cụ thể khi nhiệt độ thấp (<45°C) thì hiệu suất thu CS thấp, còn khi nhiệt độ cao (>55°C) không phải là nhiệt độ tối ưu cho hoạt động thủy phân sụn cá hồi. Cuối cùng, thời gian thủy phân cũng ảnh hưởng tích cực đến hiệu suất thu chondroitin sulfate. Nếu thời gian thủy phân ngắn (<4 giờ) thì enzyme protease chưa thủy phân hết sụn cá hồi nên hiệu suất thu CS chưa đạt mức cao nhất. Ngược lại, khi thời gian thủy phân dài (>4 giờ) thì enzyme đã thủy phân hết cơ chất (sụn cá hồi) nên hiệu suất thu CS không tăng thêm (hình 3).

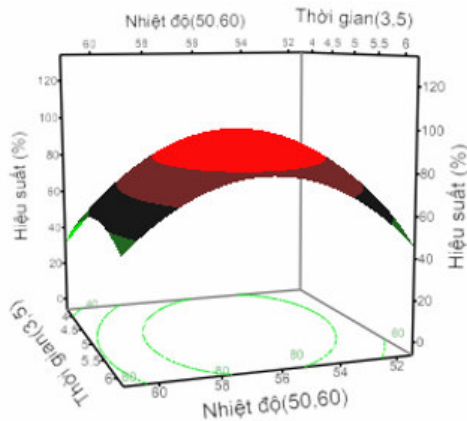
Lần lượt xét ảnh hưởng của từng yếu tố (khi các yếu tố khác giữ ở mức trung bình) đến hiệu suất thu CS (hình 4, 5 và 6) cho thấy, nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu suất thu CS.



Hình 4. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nồng độ enzyme (X_1) và nhiệt độ (X_2) đến hiệu suất thu CS



Hình 5. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nồng độ enzyme (X_1) và thời gian (X_3) đến hiệu suất thu CS



Hình 6. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nhiệt độ (X_2) và thời gian (X_3) đến hiệu suất thu CS

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Nhiệt độ*Nhiệt độ	-35.85875	2.944104	-12.18	<.0001*
Thời gian(3,5)	14.66125	2.000125	7.33	0.0007*
Nồng độ(0.3,0.5)	12.5375	2.000125	6.27	0.0015*
Nhiệt độ(50,60)	12.42375	2.000125	6.21	0.0016*
Nồng độ*Nhiệt độ	13.615	2.828604	4.81	0.0048*
Nồng độ*Nồng độ	-10.76625	2.944104	-3.66	0.0146*
Thời gian*Thời gian	-10.20875	2.944104	-3.47	0.0179*
Nhiệt độ*Thời gian	7.4275	2.828604	2.63	0.0468*
Nồng độ*Thời gian	-7.16	2.828604	-2.53	0.0524

Hình 7. Thứ tự ảnh hưởng của các biến khảo sát đến hiệu suất thu hồi CS xếp theo thứ tự giảm dần từ trên xuống

Kết quả phân tích được thể hiện ở hình 4, 5 và 6 cho thấy, cả 3 tác nhân X_1 , X_2 và X_3 đều có tương tác với nhau và ảnh hưởng đến hàm mục tiêu hiệu suất thu CS(Y). Cụ thể, kết quả phân tích ở hình 5 cho thấy, nồng độ enzyme (X_1) và nhiệt độ (X_2) có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu suất thu CS. Đỉnh thể hiện hiệu suất thu CS cao nhất trong khoảng 96-99% khi biến $X_1=0,4(\%)$ và $X_2=55^\circ\text{C}$. Tương tự tại hình số 5: Nồng độ enzyme (X_1) và thời gian thủy phân (X_3) cũng ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thu chondroitin sulfate. Thực tế, hiệu suất thu CS đạt cao nhất là $Y = 98,52\%$ khi $X_1 = 0,4\%$ và $X_3 = 4$ giờ. Kết quả này cũng đúng với hình số 6: $X_2 = 55^\circ\text{C}$ và $X_3 = 4$ giờ thì hiệu suất thu CS sẽ đạt cực đại với $Y = 98,52$.

Giải bài toán quan hệ tuyến tính trong mặt phẳng: Trong số các đường đồng mức cắt vector pháp tuyến, tìm đường đồng mức có giá trị nhỏ nhất cho thấy, nếu dịch chuyển song song các đường đồng mức theo hướng vector pháp tuyến thì giá trị mức sẽ tăng, nếu dịch chuyển theo hướng ngược lại thì giá trị mức sẽ giảm. Do đó, bài toán đặt ra có thể tiến hành như sau: Bắt đầu từ một đường đồng mức cắt vector pháp tuyến, ta dịch chuyển song song các đường đồng mức theo hướng ngược hướng với vector gốc cho đến khi nào việc dịch chuyển tiếp theo làm cho đường đồng mức không còn cắt vector pháp tuyến nữa thì dừng. Các điểm của vector pháp tuyến nằm trên đường đồng mức cuối cùng này sẽ là các lời giải cần tìm,

còn giá trị của nó chính là giá trị tối ưu của bài toán. Cụ thể, trong cả 3 hình 4, 5 và 6 cho thấy, bề mặt tương tác giữa các đường đồng mức một lần nữa khẳng định: Cả 3 biến là nồng độ enzyme (X_1), nhiệt độ (X_2) và thời gian thủy phân (X_3) đều có liên quan và ảnh hưởng trực tiếp lẫn nhau. Hàm mục tiêu, tức hiệu suất thu CS đạt cao nhất là $Y = 98,52\%$ khi các biến nồng độ enzyme (X_1) = 0,4%, nhiệt độ thủy phân (X_2) = 55°C và thời gian thủy phân (X_3) = 4 giờ.

3.3. Thí nghiệm kiểm chứng

Tiến hành quá trình thủy phân sụn cá hồi bằng các thông số tối ưu: Nồng độ enzyme alcalase - papain là 0,4%, nhiệt độ thủy phân là 55°C, thời gian thủy phân là 4 giờ. Thí nghiệm được tiến hành 3 lần cho kết quả hiệu suất thu CS đạt $98,52 \pm 1\%$. Dịch thủy phân có hàm lượng nitơ tổng và hàm lượng CS tương ứng là 6,11 g/lít và 22,57 mg/ml. Kết quả kiểm chứng một lần nữa khẳng định tính chính xác cao của các mô hình đã được xây dựng.

4. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu và xác định được khoảng thông số biên thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain: Khoảng nồng độ enzyme thích hợp là 0,3 - 0,6%, khoảng nhiệt độ thích hợp là 45 - 65°C và khoảng thời gian thích hợp là 3 - 6 giờ,

Đã tiến hành tối ưu hóa và thu được các thông số tối ưu cho quá trình thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain: Nồng độ enzyme là 0,4%, nhiệt độ thủy phân là 55°C và thời gian thủy phân là 4 giờ. Kiểm chứng tối ưu hóa với các thông số ở trên có được hiệu suất thu CS trong quá trình thủy phân sụn cá hồi đạt 98,52%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Cảnh (2016). *Quy hoạch thực nghiệm*. Nxb Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
2. Đinh Hữu Đông, Vũ Ngọc Bội, Nguyễn Thị Mỹ Trang, Nguyễn Anh Tuấn (2020). Tối ưu hóa quá trình sấy phun dịch thủy phân sụn cá mập (*carcharhinus dussumieri*). *Tạp chí Khoa học* -

Công nghệ Thủy sản. Trường Đại học Nha Trang, số 3.2020, trang 112 - 122 (ISSN 1859-2252).

3. Trần Cảnh Đình, Lê Thị Lan Oanh, Nguyễn La Anh, Võ Hoài Bắc (2010). Nghiên cứu ứng dụng sản xuất thử nghiệm chondroitin và glucosamin từ nguyên liệu thủy sản. Báo cáo tổng kết đề tài nghiên cứu khoa học thuộc chương trình CNSH - thủy sản, Viện nghiên cứu thủy sản, Hải Phòng.

4. Phạm Thị Khánh Vân, Vũ Thị Thái (2004). Phím nước mắt và tác dụng của chondroitin sulphat. *Tạp chí Thuốc và Sức khỏe*, số 273 (12).

5. Viện Kiểm nghiệm Vệ sinh an toàn thực phẩm Quốc gia (2018). *Phương pháp kiểm nghiệm chất lượng và an toàn thực phẩm*. Nxb Khoa học Kỹ thuật, tập 1.

6. AOAC (2014). Standard method performance requirements for the determination of total CSin dietary ingredient, and supplements. http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/SPDS/SMPR%25202014_009.pdf.

7. Farndale W. R., Buttle D. J. & Barrett A. J. (1986). Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochem, Biophys, Acta*, 883: pp. 173 - 177.

8. Arun S., Iva Filkova (2002). *Handbook of Industrial Drying*. Vol 1, Part II: Industrial Spray Drying Systems, Denmark, pp. 263 – 305.

9. Guan X., Yao H. (2008). Optimization of viscozyme L assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 106, pp. 345 - 351.

10. Giu. Q. L., Quang. Z. I. and Jun. F. S (2007). Optimization of extraction technology of CSfrom eggshell membrane. *Food Science*. China, Vol, 28, pp. 283 - 286.

11. Jan P. (2002). *Handbook of Industrial Drying*. Vol 1. Part III: Evaporation and Spray Drying in the Dairy Industry, Denmark, pp. 715 - 743.

12. J. Jayaraman (1981). *Laboratory manual in Biochemsitry*. Wiley Eastern Limited, New Delhi.

13. Kunamneni A. and Singh S. (2005). Response surface optimization of enzymatic

hydrolysis of maize starch for higher glucose production. *Biochemical Engineering Journal* 27, 2: pp. 179 - 190.

14. Mohammad R. I. S., *et al.*, (2016). Optimization of spray drying parameters for pink guava powder using RSM. *Food Science and Biotechnology*, 25. pp. 461 – 468 .

15. See S. F., Hoo L. L. and Bab J. (2011). Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase. *International Food Research Journal* 18(4), 1359 - 1365.

16. Zafer., *et al.* (2015). Optimization of spray drying process in cheese powder production”, *Food and Bioproducts processing*. Vol 93, pp.156 - 165.

USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR OPTIMIZING THE SALMON CARTILAGE (*Salmon Salar*) HYDROLYSIS PROCESS BY ALCALASE - PAPAIN ENZYME MIXTURE

Dinh Huu Dong¹

¹*Ho Chi Minh City University of Industry and Trade*

Summary

In this article, we present the results of optimization on salmon cartilage (*Salmon salar*) hydrolysis by a mixture of alcalase - papain enzyme. The our results show that the appropriate parameter range for salmon cartilage hydrolysis by alcalase - papain enzyme mixture: suitable enzyme concentration range is 0.1 – 0.5%, the suitable temperature range is 45 – 65°C and suitable time period is 3 - 6 hours. Optimization results have determined the optimal parameters for the salmon cartilage hydrolysis by the alcalase - papain enzyme mixture: enzyme concentration is 0.4%, hydrolysis temperature is 55°C and hydrolysis time is 4 hours. The results of salmon cartilage hydrolysis with the above parameters obtained hydrolyzate with CS collection efficiency of 98.52%.

Key words: *Optimization, alcalase - papain enzyme mixture, CS collection efficiency, salmon cartilage hydrolyzate.*

Người phản biện: TS. Đỗ Văn Nam

Ngày nhận bài: 9/10/2023

Ngày thông qua phản biện: 30/01/2024

Ngày duyệt đăng: 02/4/2024