TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN SỤN CÁ MẬP (*CARCHARHINUS DUSSUMIERI*) BẰNG HỖN HỢP ENZYME ALCALASE-PAPAIN THEO PHƯƠNG PHÁP MẶT ĐÁP ỨNG

Đinh Hữu Đông[1*], Vũ Ngọc Bội[2], Nguyễn Thị Mỹ Trang[2]

TÓM TẮT

Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu tối ưu hóa quá trình thủy phân sụn cá mập (*Carcharhinus dussumieri*) 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 các mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain: khoảng nồng độ enzyme thích hợp là 0,1% - 0,5%, khoảng nhiệt độ thích hợp là 40^{0}C - 60^{0}C và khoảng thời gian thích hợp là 16 - 24 giờ. Kết quả tối ưu hóa đã xác định được các thông số tối ưu cho quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain: nồng độ enzyme là 0,3%, nhiệt độ thủy phân là 50^{0}C và thời gian thủy phân là 20 giờ. Kết quả thủy phân sụn cá mập với các thông số ở trên thu được dịch thủy phân với hiệu suất thu chondroitin sulphate đạt 96,97%.

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

1. MỞ ĐẦU

Sụn cá mập được cho là nguồn nguyên liệu tự nhiên có chứa chondroitin sulphate với hàm lượng cao nhất [3-5]. Chondroitin sulphate 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. Ngoài ra, chondroitin sulphate 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 [3-5]. Chính vì thế, chondroitin sulphate được coi là thực phẩm chức năng để hỗ trợ điều trị các bệnh lý về xương khớp. Đã tiến hành nghiên cứu thủy phân sụn cá mập bằng phương pháp sử dụng enzyme protease và thu dịch thủy phân chứa chondroitin sulphate, các chất tự nhiên từ sụn cá mập để định hướng dùng làm thực phẩm chức năng. Trước đây, chúng tôi đã công bố các bài báo trình bày một số kết quả nghiên cứu lựa chọn enzyme protease trong thủy phân sụn cá mập [4, 5]. Trong bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu tối ưu hóa quá trình thủy phân sụn các mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Sụn cá mập

Cá mập (*Carcharhinus dussumieri* (Muller & Henle, 1839)) thường dính vào lưới đánh bắt thủy sản hoặc dính vào dây câu của các tầu câu cá ngừ. Cá mập được thu mua nguyên con tại cảng cá Vĩnh Lương - Nha Trang - Khánh Hòa. Cá tươi có khối lượng trung bình 40 – 60 kg/con. Cá mập được khai thác trong thời gian từ tháng 3 - 7 và tháng 9 - 12 hàng năm. Sau thu mua, thu toàn bộ vây cá, sụn cá và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Tại phòng thí nghiệm, tiến hành xử lý loại bỏ thịt, mô liên kết, làm sạch, cấp đông và bảo quản đông ở -20^{0}C để dùng trong suốt quá trình nghiên cứu.

Hình 1. Hình ảnh sụn cá mập (*Carcharhinus dussumieri*) trước và sau khi xử lý

[1] Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. HCM
[2] Trường Đại học Nha Trang
Email: dongdh@hufi.edu.vn

2.1.2. Enzym alcalase

Enzym 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^{0}C, hoạt tính 2,4AU/g được bảo quản ở 0 - 5^{0}C.

2.1.3. Enzym papain

Papain thương mại có hoạt tính ≥2,0 mAnsonU/mg (cơ chất hemoglobine, pH 6, nhiệt độ 35,5^{o}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^{o}C, còn ở dạng dung dịch, papain bị mất hoạt tính sau 30 phút ở 82,5^{o}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* (N_{ts}): được định lượng theo phương pháp Kjeldahl [1, 6, 8].

* *Hàm lượng protein thô* (P): được xác định theo công thức [1, 6, 8]: $P = N_{ts} \times 6,25$

* *Phương pháp định lượng chondroitin sulphate (CS):* bằng phương pháp so màu theo Farndale và cộng sự [7].

Nguyên lý: Dựa trên sự thay đổi trong quang phổ hấp thụ của DMMB (1,9 Dimethylmethylene) khi tác dụng với chondroitin sulphate (glycosaminoglycan sulphate) ở bước sóng 525 nm. Dựa vào đường chuẩn của chondroitin sulphate A (gốc sulphate gắn ở vị trí C-4 (chondroitin-4-sulphate), CS4) với DMMB để xác định hàm lượng chondroitin sulphate. Phương pháp này có độ nhạy cao, có thể định tính và định lượng hàm lượng CS ở mức µg.

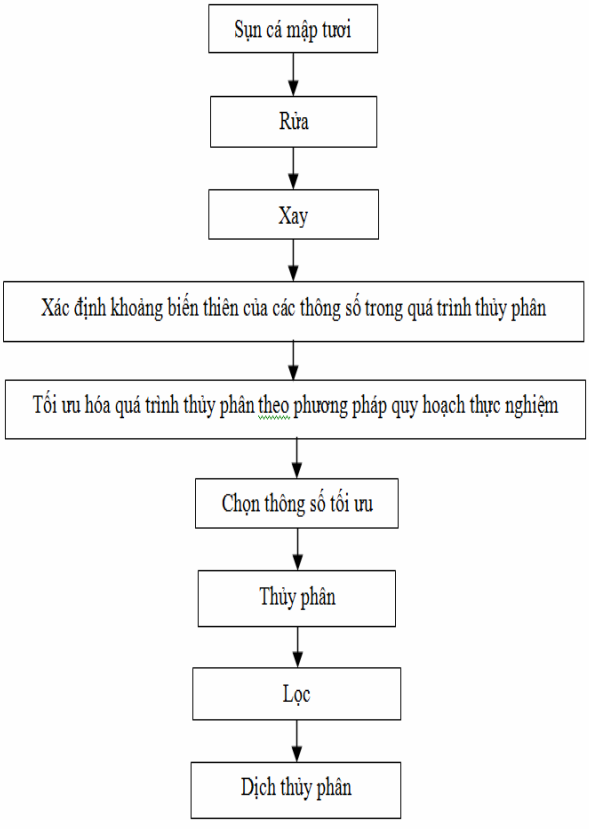
* *Hiệu suất thu chondroitin*: là tỷ số tính theo phần trăm giữa hàm lượng chondroitin sulphate có trong dịch thủy phân so với hàm lượng chondroitin sulphate có trong nguyên liệu sụn cá mập. Hiệu suất thu chondroitin sulphate được tính như sau:

$$H_C = \frac{C_1}{C} * 100\%$$

Trong đó H_c: hiệu suất thu chondroitin sulphate (%), C: hàm lượng chondroitin sulphate có trong nguyên liệu sụn cá mập, C_1: hàm lượng chondroitin sulphate có trong dịch thủy phân.

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 chondroitin sulphate cao nhất [2, 9]. 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 chondroitin sulphate cao nhất. Để xác định được thông số tối ưu cho quá trình thủy phân thu dịch thủy phân chứa chondroitin sulphate, đã tiến hành bố trí thí nghiệm theo sơ đồ trình bày 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 mập bằng hỗn 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, tiến hành tối ưu hóa quá trình thủy phân sụn cá mập nhằm tạo thành dịch thủy phân có hàm lượng chondroitin sulphate 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 chondroitin sulphate cao nhất với các biến lần lượt là: X_1 = Nồng độ enzyme (%), X_2 = Nhiệt độ thủy phân (^{0}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 (-α, -1, 0, +1, + α). 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				
	-α	-1	0	1	+α
X_1 = Nồng độ enzyme (%)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
X_2 = Nhiệt độ thủy phân (^{0}C)	40	45	50	55	60
X_3 = Thời gian thủy phân (giờ)	16	18	20	22	24

Ghi chú: α = 2, giá trị cận trên (+1) và cận dưới (-1) của biến độc lập, (Biến ảo min + 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: Biến phụ thuộc (k = 1 - 3); $X_{i,\, j}$: Nhân tố mã hóa của biến độc lập ảnh hưởng đến Y_k;

B_0: Hệ số hồi qui bậc 0; B_j: Hệ số hồi qui bậc 1 mô tả ảnh hưởng của biến Xj đến Y_k; B_{ij}: Hệ số ảnh hưởng đồng thời của biến X_i và X_j đến Y_k; B_{jj}: Hệ số hồi qui bậc hai mô tả ảnh hưởng của biến X_j^2 đến Y_k.

Đánh giá mô hình

Mô hình và phương trình hồi qui được kiểm tra mức độ phù hợp với thực nghiệm bằng kiểm định Fisher (với giá trị $P_{value} < \alpha = 0,05$) và sự thiếu phù hợp (Lack of fit). Nếu giá trị P_{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 (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 Nha Trang và Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm - TP. HCM: 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-Benhhen 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 mập

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

Tiến hành thí nghiệm khảo sát khoảng biến thiên của nồng độ enzyme thủy phân đến hiệu suất thu chondroitin sulphate, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số. Kết quả trình bày ở bảng 2.

Từ kết quả bảng 2 cho thấy nồng độ enzyme alcalase-papain có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu suất thu chondroitin sulphate và khi tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain trong khoảng 0,05% - 0,5%, thì hiệu suất thu chondroitin sulphate cũng tăng theo chiều tăng của nồng độ enzyme và đạt cực đại 96,97

Ơ 0,01% khi nồng độ enzyme alcalase-papain là 0,3%. Khi tăng nồng độ enzyme alcalase-papain > 0,3% thì hiệu suất thu chondroitin sulphate tăng không đáng kể. Trong khi đó, hàm lượng nitơ tổng và hàm lượng chondroitin sulphate (CS) cũng có xu thế tăng theo chiều tăng của nồng độ enzyme alcalase-papain trong khoảng 0,05% - 0,3% và khi tăng nồng độ enzyme alcalase-papain > 0,3% thì mức độ tăng của hàm lượng nitơ tổng và hàm lượng chondroitin sulphate (CS) có xu thế chậm dần.

Từ các phân tích ở trên cho thấy nồng độ enzyme alcalase-papain thích hợp để hiệu suất thu chondroitin sulphate, hàm lượng CS, hàm lượng nitơ tổng số cao là 0,3% và khoảng nồng độ enzyme alcalase-papain thích hợp cho quá trình thủy phân là 0,1% - 0,5%.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme alcalase-papain đến hiệu suất thu chondroitin sulphate cao nhất, hàm lượng CS và nitơ tổng số

Nồng độ enzyme alcalase-papain (%)	Hàm lượng nitơ tổng (g/lít)	Hàm lượng chondroitin sulphate (mg/mL)	Hiệu suất thu nhận CS (%)
0,05	$3,57^{a} \pm 0,14$	$7,09^{a} \pm 0,18$	$90,16^{a} \pm 0,04$
0,1	$7,21^{a} \pm 0,11$	$39,20^{a} \pm 0,12$	$93,58^{a} \pm 0,05$
0,2	$7,42^{b} \pm 0,14$	$39,81^{c} \pm 0,13$	$94,60^{c} \pm 0,03$
0,3	$7,46^{b} \pm 0,17$	$40,50^{b} \pm 0,15$	$96,97^{b} \pm 0,01$
0,4	$7,48^{c} \pm 0,15$	$40,51^{b} \pm 0,18$	$96,98^{a} \pm 0,04$
0,5	$7,49^{a} \pm 0,12$	$40,52^{c} \pm 0,17$	$96,98^{b} \pm 0,02$
0.6	$7,49^{a} \pm 0,08$	$40,52^{c} \pm 0,1$	$96,98^{b} \pm 0,02$

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 chondroitin sulphate, 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 chondroitin sulphate, hàm lượng CS và nitơ tổng số

Nhiệt độ thủy phân (^{0}C)	Hàm lượng nitơ tổng (g/lít)	Hàm lượng CS (mg/mL)	Hiệu suất thu chondroitin sulphate (%)
35	$3,04^{a} \pm 0,13$	$7,04^{a} \pm 0,11$	$92,34^{c} \pm 0,06$
40	$7,39^{a} \pm 0,11$	$40,16^{a} \pm 0,17$	$93,57^{c} \pm 0,07$
45	$7,41^{c} \pm 0,13$	$40,26^{b} \pm 0,15$	$94,60^{b} \pm 0,05$
50	$7,46^{c} \pm 0,14$	$40,50^{c} \pm 0,12$	$96,97^{b} \pm 0,01$
55	$7,46^{b} \pm 0,19$	$40,51^{a} \pm 0,14$	$96,98^{a} \pm 0,02$
60	$7,46^{a} \pm 0,15$	$40,51^{c} \pm 0,18$	$96,98^{c} \pm 0,03$
65	$40,51^{c} \pm 0,17$	$7,46^{a} \pm 0,18$	$95,94^{c} \pm 0,04$

Từ kết quả phân tích trình bày ở bảng 3 cho thấy nhiệt độ thủy phân cũng ảnh hưởng đến hiệu suất thu chondroitin sulphate và hàm lượng CS của dịch thủy phân. Khi tăng nhiệt độ thủy phân trong khoảng 35^{0}C - 50^{0}C, thì hiệu suất thu chondroitin sulphate, 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 50^{0}C. Cụ thể, khi nhiệt độ thủy phân là 50^{0}C, hiệu suất thu chondroitin sulphate, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số đạt mức gần nhất, tương ứng là 93,57 ± 0,07%, 40,16 ± 0,17 mg/mL và 7,46 ± 0,14 g/L. Do nếu tiếp tục tăng nhiệt độ thủy phân > 50^{0}C thì hiệu suất thu chondroitin sulphate, 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 chondroitin sulphate, hàm lượng CS, hàm lượng nitơ tổng số khi thủy phân ở nhiệt độ 50^{0}C, 55^{0}C, 60^{0}C và 65^{0}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 mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain để có hiệu suất thu chondroitin sulphate, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số trong dịch thủy phân cao là 50^{0}C và khoảng nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập là 40^{0}C - 60^{0}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 chondroitin sulphate, 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 chondroitin sulphate, hàm lượng CS và nitơ tổng số

Thời gian thủy phân (giờ)	Hàm lượng CS (mg/mL)	Hàm lượng nitơ tổng số (mg/lít)	Hiệu suất thu chondroitin sulphate (%)
14	$40,23^{a} \pm 0,14$	$7,08^{b} \pm 0,16$	$92,35^{a} \pm 0,03$
16	$40,41^{a} \pm 0,11$	$7,41^{b} \pm 0,15$	$93,56^{a} \pm 0,05$
18	$40,44^{b} \pm 0,13$	$7,42^{c} \pm 0,14$	$94,58^{b} \pm 0,04$
20	$40,50^{c} \pm 0,16$	$7,46^{c} \pm 0,12$	$96,97^{c} \pm 0,01$
22	$40,51^{c} \pm 0,18$	$7,47^{a} \pm 0,19$	$96,97^{b} \pm 0,07$
24	$40,51^{b} \pm 0,19$	$7,47^{a} \pm 0,21$	$96,97^{b} \pm 0,06$
26	$40,51^{b} \pm 0,12$	$7,47^{a} \pm 0,22$	$96,97^{b} \pm 0,04$

Kết quả phân tích trình bày ở bảng 4 cho thấy thời gian thủy phân cũng có ảnh hưởng đến hiệu suất thu chondroitin sulphate, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số của dịch thủy phân. Khi thời gian thủy phân tăng trong khoảng 14 giờ - 20 giờ thì hiệu suất thu chondroitin sulphate, 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 20 giờ. Do khi tăng thời gian thủy phân lên > 20 giờ thì hiệu suất thu chondroitin sulphate, 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 chondroitin sulphate, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số của dịch thủy phân khi thời gian thủy phân là 20 giờ, 22 giờ, 24 giờ và 26 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 mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain để có hiệu suất thu chondroitin sulphate, hàm lượng CS và hàm lượng nitơ tổng số trong dịch thủy phân cao là 20 giờ và khoảng thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập là 16 - 24 giờ.

3.2. Tối ưu hóa quá trình thủy phân tạo bột đạm

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

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

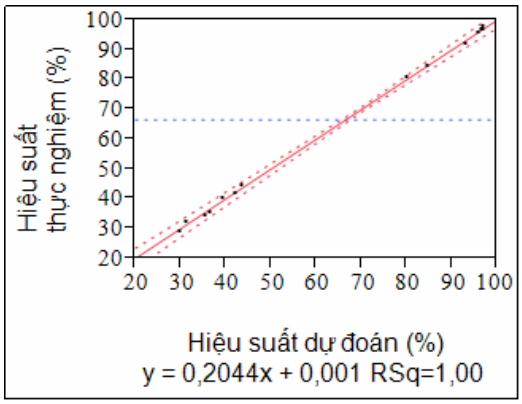
STT	Ma trận thí nghiệm	Biến mã hóa			Hiệu suất: Y (%)
		Nồng độ: X_1 (%)	Nhiệt độ: X_2 (°C)	Thời gian: X_3 (giờ)	
1	0−−	0,3	45	18	28,9
2	−+0	0,2	55	20	34,32
3	000	0,3	50	20	96,64
4	0++	0,3	55	22	80,85
5	0+−	0,3	55	18	44,71
6	+−0	0,4	45	20	40,24
7	+0+	0,4	50	22	96,66
8	−0−	0,2	50	18	42,11
9	000	0,3	50	20	96,64
10	−0+	0,2	50	22	84,79
11	000	0,4	55	20	92,13
12	000	0,3	50	20	97,64
13	+0−	0,4	50	18	95,62
14	−−0	0,2	45	20	32,03
15	0−+	0,3	45	22	35,34

Bảng 6. Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) và hệ số tuyến tính, tương tác và bình phương của các phương trình hồi quy để dự đoán mức độ ảnh hưởng của các nhân tố thủy phân đến hàm mục tiêu

Nguồn	Bậc tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị mô hình thực F-Value	Sự thiếu phù hợp P-Value
Intercept		96,97	0,55	176,99	<0,001*
X_1	1,00	17,18	0,33	51,19	<0,001*
X_2	1,00	15,06	0,33	44,89	<0,001*
X_3	1,00	10,91	0,33	32,52	<0,001*
X_1*X_2	1,01	13,65	0,47	27,77	<0,001*
X_1*X_3	1,01	-10,16	0,47	-21,41	<0,001*
X_2*X_3	1,01	7,43	0,47	15,65	<0,001*
X_1*X_1	1,00	-6,72	0,49	-13,62	<0,001*
X_2*X_2	1,00	-39,32	0,49	-79,62	<0,001*
X_3*X_3	1,00	-10,20	0,49	-20,66	<0,001*

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 (Hình 3). 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

chondroitin sulphate 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 mập nằm gần như trùng hoàn toàn trên đường mô hình dự đoán, hiệu suất thu chondroitin sulphate 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.



Hình 3. Mối tương quan giữa mô hình dự đoán và thực nghiệm của các yếu tố thủy phân tới hiệu suất thu chondroitin sulphate của dịch thủy phân sụn cá mập

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	3	6.5861000	2.19537	6.5861
Pure Error	2	0.6666667	0.33333	Prob > F
Total Error	5	7.2527667		0.1347
				Max RSq
				0.9999

Hình 4. Sự thiếu phù hợp của mô hình thông qua chỉ số (lack of fit >0,05)

Kiểm định tính tương thích tổng quát của mô hình với thực nghiệm (F–test hay kiểm định Fisher) thể hiện trong bảng 6. 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 6 là P < 0,001*<α =0,05 và giá trị Leck of fit = 0,1347 > α =0,05 (Hình 4) 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 $P_{value}(X_1) < 0,001$*, $P_{value}(X_2) < 0,001$* và $P_{value}(X_3) < 0,001$* nghĩa là chỉ có nhỏ hơn 0,001% sự thay đổi của giá trị F là phần nhiễu 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:

$$Y = 96,97 + 16,43\,X_1 + 14,44\,X_2 + 10,79\,X_3 + 12,40\,X_1{*}X_2 - 10,41X_1{*}X_3 + 7,43X_2{*}X_3 - 7,47\,X_1{*}X_1 - 39,82\,X_2{*}X_2 - 9,70\,X_3{*}X_3 \quad (1)$$

Trong vùng khảo sát, phương trình hồi quy cho thấy hiệu suất thu chondroitin sulphate (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 chondroitin sulphate 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 8).

Xu hướng ảnh hưởng của các thông số ảnh hưởng đến quá trình thủy phân được giải thích như sau: nồng độ enzyme ảnh hưởng tích cực tới hiệu suất thu chondroitin sulphate, khi nồng độ enzyme thấp (<0,2%) thì hiệu suất thu chondroitin sulphate 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 trình trạng lãng phí enzyme. Tương tự nhiệt độ thủy phân cũng ảnh hưởng tích cực tới hiệu suất thu chondroitin sulphate, cụ thể khi nhiệt độ thấp (<45^{0}C) thì hiệu suất thu chondroitin sulphate thấp, còn khi nhiệt độ cao (>55^{0}C) không phải là nhiệt độ tối ưu cho hoạt động thủy phân sụn cá mập. Cuối cùng thời gian thủy phân cũng ảnh hưởng tích cực đến hiệu suất thu chondroitin sulphate. Nếu thời gian thủy phân ngắn (<18 giờ) thì

enzyme protease chưa thủy phân hết sụn cá mập nên hiệu suất thu chondroitin sulphate chưa đạt mức cao nhất. Ngược lại, khi thời gian thủy phân dài (>22 giờ) thì enzyme đã thủy phân hết cơ chất (sụn cá mập) nên hiệu suất thu chondroitin sulphate không tăng thêm (Hình 9).

Lần lượt xét ảnh hưởng của từng yếu tố (khi các yếu tố khác giữ ở mức trung bình) đến hiệu suất thu chondroitin sulphate (Hình 5, 6 và 7) cho thấy nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu suất thu chondroitin sulphate.

Kết quả phân tích trình bày ở hình 5, 6 và 7 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 chondroitin sulphate (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 chondroitin sulphate. Đỉnh thể hiện hiệu suất thu chondroitin sulphate cao nhất trong khoảng 96 - 98% khi biến X_1=0,3(%) và X_2=50^0C. Tương tự tại hình số 6: nồng độ enzyme (X_1) và thời gian thủy phân (X_3) cũng ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thu chondroitin sulphate. Cụ thể, hiệu suất thu chondroitin sulphate đạt cao nhất là Y=96,97% khi X_1 = 0,3% và X_3= 20 giờ. Kết quả này cũng đúng với hình số 6: X_2=50^0C và X_3=20 giờ thì hiệu suất thu chondroitin sulphate sẽ đạt cực đại với Y=96,97%.

Giải bài toán quan hệ tuyến tính trong mặt phẳng: trong số các đường đồng mức cắt vetor 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 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 5, 6 và 7 cho thấy bề mặt tương tác giữa các đường đồng mức một lần nữa khẳng định: cả 3 biến: 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 chondroitin sulphate đạt cao nhất là Y=96,97% khi các biến nồng độ enzyme (X_1) = 0,3%, nhiệt độ thủy phân (X_2) = 50^0C và thời gian thủy phân (X_3) = 20 giờ.

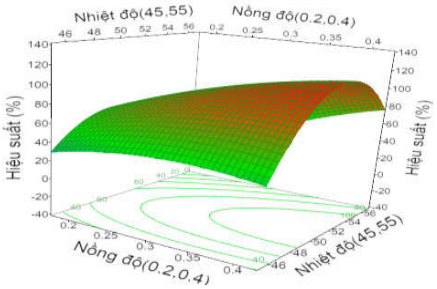
Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) ảnh hưởng của các biến - yếu tố thủy phân đến hàm mục tiêu - hiệu suất thu chondroitin sulphate cho thấy tất cả các biến bậc một, bậc 2 và tương tác giữa các biến đều có ảnh hưởng đến hàm mục tiêu ($p < 0,0001 < \alpha = 0,05$). Các biến X_1, X_2, X_3, X_1^2, X_2^2 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*X_2, X_2*X_3 và nghịch biến với X_1^2, X_2^2, X_3^2 và X_1*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*X_2, X_2*X_3 và X_1*X_3 nhỏ (cao nhất chỉ là 12,40 X_1*X_2) nên ảnh hưởng là không lớn đến hàm mục tiêu (1).

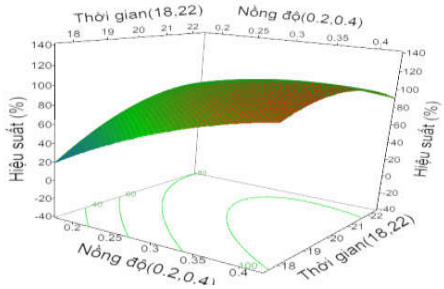
Kết quả đánh giá trình bày ở hình 9 cho thấy khi nồng độ enzyme tăng thì hiệu suất thu chondroitin sulphate cũng tăng theo và tăng cao nhất tại nồng độ enzyme 0,3%. Nếu tiếp tục tăng nồng độ enzyme >0,3% thì hiệu suất đi theo đường nằm ngang, có nghĩa là hiệu suất không tăng thêm khi tăng nồng độ enzyme, do nồng độ enzyme đã cân bằng với nồng độ cơ chất, nên hiệu suất thu chondroitin sulphate không tăng thêm. Tiếp theo, với nhiệt độ thủy phân: khi tăng nhiệt độ thủy phân thì hiệu suất thu chondroitin sulphate cũng tăng theo và hiệu suất đạt cao nhất tại 50^oC. Tuy nhiên khi tăng nhiệt độ > 50^oC 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 chondroitin sulphate giảm. Tương tự với biến thời gian: khi tăng thời gian thủy phân thì hiệu suất thu chondroitin sulphate cũng tăng và hiệu suất đạt cao nhất khi thời gian thủy phân là 20 giờ. Nếu thời gian thủy phân >20 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 hết tức lượng chondroitin sulphate có trong sụn cá mập đã hoàn toàn giải phóng ra dịch thủy phân nên hiệu suất thu chondroitin sulphate không tăng.

Tiến hành giải bài toán tối ưu bằng cách chập mục tiêu theo thuật toán "hàm mong đợi". Kết quả tối ưu hóa thu được X_1 = 0,3 tức nồng độ hỗn enzyme alcalase - papain thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập là 0,3%, X_2=50 tức nhiệt độ thủy phân thích hợp cho quá trình thủy phân là 50^{0}C, X_3 = 20 tức thời gian thủy phân thích hợp là 20 giờ. Khi đó hàm mục tiêu (Y) - hiệu suất thu chondroitin sulphate đạt 96,97% và hàm lượng chondroitin sulphate, 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.

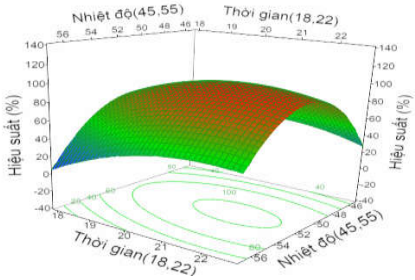
Như vậy, trong điều điều kiện tối ưu về nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân thì hiệu suất thu chondroitin sulphate đạt 96,97% so với mục tiêu mong muốn từ mô hình là 94,53% (Hình 8).



Hình 5. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nồng độ enzyme (X_1) và nhiệt độ (X_2) đến hiệu suất thu chondroitin sulphate



Hình 6. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nồng độ enzyme (X_1) và thời gian (X_3) đến hiệu suất thu chondroitin sulphate

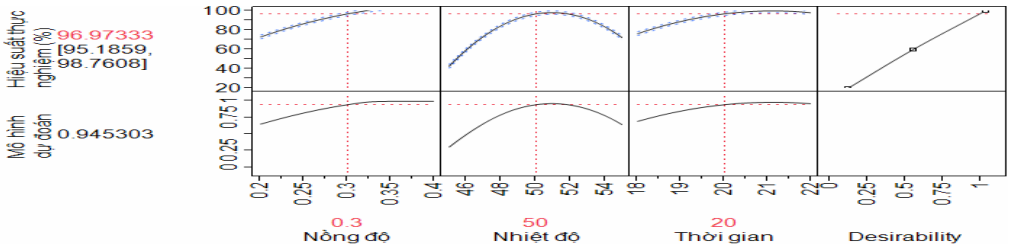


Hình 7. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nhiệt độ (X_2) và thời gian (X_3) đến hiệu suất thu chondroitin sulphate

Sorted Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob>|t|
Nhiệt độ*Nhiệt độ	-39.81917	0.626784	-63.53	<.0001*
Nồng độ(0.2,0.4)	16.425	0.425816	38.57	<.0001*
Nhiệt độ(45,55)	14.4375	0.425816	33.91	<.0001*
Thời gian(18,22)	10.7875	0.425816	25.33	<.0001*
Nồng độ*Nhiệt độ	12.4	0.602195	20.59	<.0001*
Nồng độ*Thời gian	-10.41	0.602195	-17.29	<.0001*
Thời gian*Thời gian	-9.704167	0.626784	-15.48	<.0001*
Nhiệt độ*Thời gian	7.425	0.602195	12.33	<.0001*
Nồng độ*Nồng độ	-7.474167	0.626784	-11.92	<.0001*

Hình 8. Thứ tự ảnh hưởng của các biến khảo sát đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulphate xếp theo thứ tự giảm dần từ trên xuống



Hình 9. Mối tương quan giữa mô hình lý thuyết và thực nghiệm của các nhân tố thủy phân đến quá trình thủy phân thu dịch thủy phân từ vi sụn cá mập

3.3. Thí nghiệm kiểm chứng

Tiến hành quá trình thủy phân sụn cá mập bằng các thông số tối ưu: nồng độ enzyme alcalase – papain là 0,3%, nhiệt độ thủy phân là 50^{0}C, thời gian thủy phân là 20 giờ. Thí nghiệm được tiến hành 3 lần cho kết quả hiệu suất thu chondroitin sulphate đạt 96,97 ± 1%. Dịch thủy phân có hàm lượng nitơ tổng và hàm chondroitin sulphate tương ứng là 7,46 g/lít và 40,5 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 VÀ KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu ở trên cho phép rút ra một số kết luận sau:

Đã nghiên cứu và xác định được khoảng thông số biên thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá

mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain: khoảng nồng độ enzyme thích hợp là 0,1% - 0,5%, khoảng nhiệt độ thích hợp là 40^0C - 60^0C và khoảng thời gian thích hợp là 16 - 24 giờ.

Đã tiến hành tối ưu hóa và thu được các thông số tối ưu cho quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain: nồng độ enzyme là 0,3%, nhiệt độ thủy phân là 50^0C và thời gian thủy phân là 20 giờ. Kiểm chứng tối ưu hóa với các thông số ở trên có được hiệu suất thu chondroitin sulphate trong quá trình thủy phân sụn cá mập đạt 96,97%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Ngọc Bội (2004). Nghiên cứu quá trình thủy phân protein cá bằng enzyme protease từ *B. Subtilis*. *Luận án tiến sĩ Sinh học chuyên ngành Hóa sinh*, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.

2. Nguyễn Cảnh (2016). *Quy hoạch thực nghiệm*. Nxb Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.

3. Đinh Hữu Đông, Vũ Ngọc Bội, Nguyễn Thị Mỹ Trang (2020). Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và loại enzyme đến quá trình thủy phân sụn cá mập (*Carcharhinus dussumieri*) bằng protease. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 7, kỳ 1.

4. Đinh Hữu Đông, Vũ Ngọc Bội, Nguyễn Thị Mỹ Trang (2020). Ảnh hưởng của nồng độ enzyme và thời gian đến quá trình thủy phân sụn cá mập (*Carcharhinus dussumieri*). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 12, kỳ 2.

5. Trần Cảnh Đình và cộng sự (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 Hải sản, Hải phòng.

6. 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.

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

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

9. 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.

USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR OPTIMIZING THE SHARK CARTILAGE (*Carcharhinus dussumieri*) HYDROLYSIS PROCESS BY ALCALASE- PAPAIN ENZYME MIXTURE

Dinh Huu Dong, Vu Ngoc Boi, Nguyen Thi My Trang

Summary

In this article, we present the results of optimization on shark cartilage (*Carcharhinus dussumieri*) hydrolysis by a mixture of alcalase-papain enzyme. The our results show that the appropriate parameter range for shark cartilage hydrolysis by alcalase - papain enzyme mixture: suitable enzyme concentration range is 0.1% - 0.5%, the suitable temperature range is 40^0C - 60^0C and suitable time period is 16 - 24 hours. Optimization results have determined the optimal parameters for the shark cartilage hydrolysis by the alcalase - papain enzyme mixture: enzyme concentration is 0.3%, hydrolysis temperature is 50^0C, and hydrolysis time is 20 hours. The results of shark cartilage hydrolysis with the above parameters obtained hydrolyzate with chondroitin sulphate collection efficiency of 96.97%.

Keywords: *Optimization, alcalase - papain enzyme mixture, chondroitin sulphate collection efficiency, shark cartilage hydrolysate.*

Người phản biện: TS. Trần Thị Mai

Ngày nhận bài: 23/10/2020

Ngày thông qua phản biện: 24/11/2020

Ngày duyệt đăng: 01/12/2020