

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG

PHẠM VIỆT NAM

**NGHIÊN CỨU THU NHẬN DỊCH PROTEIN THỦY PHÂN VÀ
HYDROXYAPATITE TỪ PHẾ LIỆU CÁ TRA, ĐỊNH HƯỚNG
ỨNG DỤNG TRONG THỨC ĂN NUÔI TÔM THẺ CHÂN TRẮNG**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

KHÁNH HÒA – 2021

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG**

PHẠM VIỆT NAM

**NGHIÊN CỨU THU NHẬN DỊCH PROTEIN THỦY PHÂN VÀ
HYDROXYAPATITE TỪ PHẾ LIỆU CÁ TRA, ĐỊNH HƯỚNG
ỨNG DỤNG TRONG THỨC ĂN NUÔI TÔM THẺ CHÂN TRẮNG**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

**NGÀNH ĐÀO TẠO:
MÃ SỐ:**

**CÔNG NGHỆ CHẾ BIẾN THỦY SẢN
9540105**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
PGS.TS. Trang Sĩ Trung
PGS.TS. Nguyễn Văn Hòa**

KHÁNH HÒA – 2021

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình do tôi thực hiện. Các số liệu, kết quả trong luận án là trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm về những lời cam đoan của mình.

Tác giả luận án



Phạm Viết Nam

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này tôi xin gửi lời tri ân đến Ban Giám hiệu Trường Đại học Nha Trang, Ban lãnh đạo Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trung tâm Thí nghiệm Thực hành, Phòng Đào tạo Sau đại học đã tạo điều kiện cho tôi trong quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến Ban Giám hiệu Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM, Ban Lãnh đạo Khoa Thủy sản đã tạo điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, thực hiện luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến PGS.TS. Trang Sĩ Trung và PGS.TS. Nguyễn Văn Hòa đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ, truyền đạt kiến thức, kinh nghiệm cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến GS. Willem F. Stevens đã luôn tận tình giúp đỡ, hướng dẫn, động viên khích lệ và dành nhiều thời gian Trao đổi về chuyên môn với tôi trong quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến TS. Trần Vũ Hích, TS. Đinh Văn Khương, TS. Hoàng Ngọc Cương, TS. Nguyễn Công Minh, TS. Nguyễn Văn Tặng, ThS. Phạm Thị Đan Phượng, các cán bộ kỹ thuật của Trung tâm Thí nghiệm Thực hành Trường Đại học Nha Trang, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM, Ban Lãnh đạo Công ty Cổ phần Nam Việt – An Giang, các em học viên cao học khóa 2015 – 2017, 2016 – 2018, các em sinh viên khóa K5, K6, K7, K8 - Khoa Thủy sản đã đồng hành giúp đỡ, động viên, khích lệ và chia sẻ cho tôi nhiều kinh nghiệm trong quá trình học tập, nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã luôn động viên, giúp đỡ, chia sẻ mọi khó khăn để luận án được hoàn thành.

Một lần nữa, xin chân thành cảm ơn!

Khánh Hoà, ngày 12 tháng 08 năm 2021

Tác giả luận án



Phạm Viết Nam

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	Hiệp hội các nhà hoá phân tích chính thống
ANOVA	Analysis of Variance	Phân tích phương sai
HA	Hydroxyapatite	Hydroxyapatite
FPH	Fish Protein Hydrolysate	Dịch protein thủy phân cá
DH	Degree Hydrolysis	Độ thủy phân
NR	Nitrogen Recovery	Hiệu suất thu hồi nitơ
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
GPC	Gel Permeation Chromatography	Sắc ký thẩm thấu gel
wt. %	Weight percentage	Phần trăm theo khối lượng
Nd	Not detected	Không phát hiện
JCPDS 09-0432		Ký hiệu mẫu HA chuẩn
NT		Nghiệm thức
FT-IR	Fourier Transform Infrared	Quang phổ hồng ngoại
SEM	Scanning Electron Microscope	Kính hiển vi điện tử quét
TEM	Transmission Electron Microscopy	Kính hiển vi điện tử truyền qua
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy	Phổ kế quang điện tử tia X
XRF	X-Ray Fluorescence	Huỳnh quang tia X
XRD	X-ray diffraction	Nhiễu xạ tia X
BET	Brunauer–Emmett–Teller	Brunauer–Emmett–Teller
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry	Hệ thống khối phổ plasma ghép cặp cảm ứng
PL	Postlarvae	Tôm hậu ấu trùng
AA	Amino Acid	Axit amin
DO	Dissoved Oxygen	Nồng độ ôxi hòa tan trong nước

TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Tên luận án: Nghiên cứu thu nhận dịch protein thủy phân và hydroxyapatite từ phế liệu cá Tra, định hướng ứng dụng trong thức ăn nuôi tôm thẻ chân trắng.

Ngành: Công nghệ chế biến thủy sản. **Mã số:** 9540105. **Khóa:** 2015 - 2019

Nghiên cứu sinh: Phạm Viết Nam

Người hướng dẫn: 1. PGS.TS. Trang Sĩ Trung
2. PGS.TS. Nguyễn Văn Hòa

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Nha Trang

Những đóng góp mới của luận án:

1. Luận án đã công bố số liệu về thành phần hóa học của nguồn phế liệu cá Tra (*Pangasius hypophthalmus*) tại nhà máy chế biến thủy sản Nam Việt thuộc tỉnh An Giang, làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo.

2. Luận án đã xây dựng được quy trình thu nhận các sản phẩm giá trị gia tăng gồm dịch protein thủy phân, hydroxyapatite, lipít thô từ phế liệu cá Tra. Khi sử dụng alcalase, sản phẩm dịch protein thủy phân thu được có độ thủy phân (DH) gần 35%, với hơn 70% khối lượng phân tử của dịch thủy phân < 1000 Da, có hàm lượng đạm tổng 11,7%, hàm lượng lipít tổng 10,8%. Khi sử dụng enzym alcalase và lipase, sản phẩm dịch thủy phân thu nhận có hàm lượng đạm tổng 33,2%, hàm lượng lipít tổng 1,93%, hàm lượng đạm axit amin 420,16 mg/g protein. Hydroxyapatite (HA) thu nhận từ xương cá bằng phương pháp xử lý nhiệt có kích thước 50 – 70 nm, tỷ lệ hàm lượng nguyên tố Ca/P là 1,83, diện tích bề mặt của hạt 2,87 m²/g, thể tích lỗ xốp 0,02 m³/g, kích thước lỗ xốp trung bình 1,2 nm và hàm lượng kim loại nặng (Pb, Hg, Cd) không phát hiện. Đây là cách tiếp cận mới nhằm sử dụng toàn bộ nguồn phế liệu cá Tra để sản xuất các sản phẩm có giá trị cao, đồng thời hướng đến quy trình sản xuất “không-chất-thải”.

3. Luận án đã bước đầu thử nghiệm bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy phân và hydroxyapatite vào thức ăn tôm giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi bổ sung 5% hỗn hợp vào thức ăn, tôm tăng trưởng 123,5% về khối lượng và 112% về chiều dài so với khi không bổ sung. Việc bổ sung hỗn hợp này không ảnh hưởng đến môi trường nước nuôi tôm. Đây là cơ sở để ứng dụng hỗn hợp dịch protein thủy phân và hydroxyapatite vào thức ăn tôm.

TM giáo viên hướng dẫn

Nghiên cứu sinh



PGS.TS. Trang Sĩ Trung

Phạm Viết Nam

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	iii
LỜI CẢM ƠN	iv
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	v
TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	vi
DANH MỤC HÌNH	xii
DANH MỤC BẢNG	xv
PHẦN MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	5
1.1. Cá Tra.....	5
1.1.1. Giới thiệu chung	5
1.1.2. Phân bố.....	5
1.1.3. Đặc điểm sinh học của cá Tra	6
1.1.4. Thành phần hóa học và dinh dưỡng cá Tra.....	6
1.1.5. Tình hình nuôi, chế biến và xuất khẩu cá Tra.....	7
1.2. Phế liệu cá Tra	7
1.2.1. Đặc điểm	7
1.2.2. Tận dụng phế liệu cá	8
1.3. Dịch protein thủy phân	10
1.3.1. Sản xuất dịch protein thủy phân	10
1.3.2. Các công bố nghiên cứu sản xuất dịch protein thủy phân	14
1.4. Quá trình thủy phân bằng enzyme	18
1.4.1. Enzyme protease	18
1.4.2. Enzyme alcalase.....	19
1.4.3. Cơ chế quá trình thủy phân protein.....	20
1.4.5. Enzyme lipase	20
1.5. Hydroxyapatite (HA - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)	21
1.5.1. Tính chất hydroxyapatite	21
1.5.2. Ứng dụng của hydroxyapatite.....	23
1.5.3. Phương pháp điều chế hydroxyapatite.....	24
1.5.4. Các nghiên cứu trong nước liên quan đến hydroxyapatite	32
1.6. Tổng quan thức ăn cho tôm hậu ấu trùng	33

1.6.1. Thức ăn cho tôm	33
1.6.2. Yêu cầu thức ăn tôm	34
1.6.3. Thành phần dinh dưỡng và bổ sung dinh dưỡng vào thức ăn tôm	36
1.6.3.1. Protein	36
1.6.3.2. Amino axit	36
1.6.3.3. Chất khoáng	37
Chương 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	39
2.1. Nguyên vật liệu	39
2.1.1. Phế liệu cá Tra	39
2.1.2. Enzyme	40
2.1.3. Tôm thẻ chân trắng	40
2.1.4. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất sử dụng trong quá trình nghiên cứu.....	41
2.1.4.1. Dụng cụ và thiết bị.....	41
2.1.4.2. Hóa chất sử dụng	43
2.2. Phương pháp nghiên cứu	44
2.2.1. Phương pháp tiếp cận nghiên cứu.....	44
2.2.2. Nghiên cứu xử lý tách lipid trong nguyên liệu	46
2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của các thông số đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra bằng enzyme alcalase.....	48
2.2.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra	48
2.2.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng enzyme alcalase.....	50
2.2.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân	51
2.2.3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian thủy phân.....	53
2.2.3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ muối.....	55
2.2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của các thông số đến quá trình thủy phân dịch protein hòa tan bằng enzyme lipase	57
2.2.4.1. Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme lipase.....	57
2.2.4.2. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng lipase	58
2.2.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của các thông số đến quá trình thu nhận HA từ xương cá Tra thô 60	
2.2.5.1. Khảo sát tiền xử lý nguyên liệu thu nhận xương cá Tra khô.....	60

2.2.5.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ nung	61
2.2.5.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nung.....	63
2.2.5.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ gia nhiệt nung	65
2.2.6. Nghiên cứu thử nghiệm bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy phân (FPH) và hydroxyapatite (HA) vào thức ăn tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi.	67
2.3. Phương pháp phân tích	71
2.4. Phương pháp xử lý số liệu	73
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	74
3.1. Nghiên cứu những tính chất của phế liệu cá Tra	74
3.2. Nghiên cứu tách lipít từ phế liệu cá Tra	75
3.3. Nghiên cứu những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân protein trong phế liệu cá Tra bằng enzyme alcalase	77
3.3.1. Ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu	78
3.3.2. Ảnh hưởng hàm lượng enzyme alcalase đến quá trình thủy phân	80
3.3.3. Ảnh hưởng nhiệt độ thủy phân đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra	82
3.3.4. Ảnh hưởng thời gian thủy phân đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra	83
3.3.5. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra	84
3.4. Nghiên cứu những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân dịch thủy phân lipít bằng enzyme lipase	86
3.4.1. Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme lipase.....	86
3.4.2. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng enzyme lipase	87
3.5. Đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm protein thủy phân và hydroxyapatite từ phế liệu cá Tra	88
3.6. Nghiên cứu qui trình sản xuất HA từ phế liệu cá Tra.....	93
3.6.1. Thành phần hóa học của xương cá Tra thô và sản phẩm HA	93
3.6.2. Kết quả khảo sát tiền xử lý nguyên liệu thu nhận xương cá dạng thô	94
3.6.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nung đến các đặc tính của HA	98
3.6.4. Ảnh hưởng của thời gian nung đến các đặc tính của HA	103
3.6.5. Ảnh hưởng của tốc độ nâng nhiệt nung đến HA thu nhận.....	106
3.6.6. Một số phân tích và so sánh với HA từ nguồn khác	109
3.7. Đề xuất quy trình sản xuất hydroxyapatite dạng nano từ xương cá Tra.....	117

3.8. Nghiên cứu hiệu quả việc thử nghiệm bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy phân và hydroxyapatite vào thức ăn tôm thẻ chân trắng 20 – 55 ngày tuổi.....	118
3.8.1. Ảnh hưởng của hỗn hợp bổ sung đến các chỉ tiêu hóa lý môi trường nước nuôi.....	118
3.8.2. Ảnh hưởng của hỗn hợp bổ sung đến các chỉ tiêu vi sinh vật môi trường nước nuôi tôm	120
3.8.2.1. Tổng số vi khuẩn	120
3.8.2.2. Tổng số vi khuẩn vibrio.....	121
3.8.3. Ảnh hưởng của hỗn hợp bổ sung đến tốc độ tăng trưởng của tôm	122
3.8.3.1. Sự tăng trưởng về khối lượng của tôm thẻ chân trắng (g).....	122
3.8.3.2. Sự tăng trưởng về chiều dài tôm thẻ chân trắng (mm).....	123
3.8.3.3. Ảnh hưởng của hỗn hợp FPH và HA bổ sung vào thức ăn tôm đến tỷ lệ sống và năng suất của tôm 55 ngày tuổi.....	125
3.8.3.4. Đánh giá chất lượng tôm nuôi 55 ngày tuổi	126
3.9. Đề xuất qui trình nuôi tôm thẻ chân trắng 20 – 55 ngày tuổi có bổ sung hỗn hợp dịch FPH và HA từ phế liệu cá Tra.	128
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	129
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ	130
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	131
PHỤ LỤC	- 1 -
PHỤ LỤC 1 - PHỤ LỤC CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH.....	- 2 -
PHỤ LỤC 2 - PHỤ LỤC CÁC SỐ LIỆU	- 10 -
PHỤ LỤC 3 - PHỤ LỤC KẾT QUẢ PHÂN TÍCH.....	-50-

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cá Tra (<i>Pangasius hypophthalmus</i>).	5
Hình 1.2. Sơ đồ phát triển các sản phẩm giá trị gia tăng từ phế liệu cá	11
Hình 1.3. Các giai đoạn xúc tác thủy phân bằng enzyme	20
Hình 1.4. Tinh thể HA ở dạng hạt, sợi, que, tấm.	21
Hình 1.5. Ô mạng cơ sở của tinh thể HA.	22
Hình 2.1. Phế liệu cá Tra sau phi-lê.	39
Hình 2.2. Tôm thẻ chân trắng 20 ngày tuổi.	41
Hình 2.3. Sơ đồ phương pháp tiếp cận các vấn đề nghiên cứu của Luận án.	44
Hình 2.4. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của phương pháp xử lý	46
tách lipít phế liệu cá Tra.	46
Hình 2.5. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu đến quá	49
trình thủy phân phế liệu cá Tra.	49
Hình 2.6. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của hàm lượng alcalase đến quá	50
trình thủy phân phế liệu cá Tra.	50
Hình 2.7. Sơ đồ thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân	52
Hình 2.8. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của thời gian đến quá trình	54
thủy phân phế liệu cá Tra.	54
Hình 2.9. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nồng độ muối đến	56
quá trình thủy phân phế liệu cá Tra.	56
Hình 2.10. Sơ đồ thí nghiệm xác định ảnh hưởng của hàm lượng enzyme lipase	57
Hình 2.11. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng	59
lipase.	59
Hình 2.12. Sơ đồ bố trí thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ nung đến quá	62
trình thu nhận HA từ xương cá Tra khô.	62
Hình 2.13. Sơ đồ bố trí thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nung đến HA	64
từ xương cá Tra.	64
Hình 2.14. Sơ đồ bố trí thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ gia nhiệt HA từ	66
xương cá Tra.	66

Hình 2.15. Sơ đồ bố trí thí nghiệm ảnh hưởng của hàm lượng hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung vào thức ăn tôm.	68
Hình 2.16. Hệ thống bể thí nghiệm nuôi thử nghiệm tôm.....	71
Hình 3.1. Ảnh hưởng của phương pháp xử lý nguyên liệu đến DH và NR của dịch protein thủy phân.	76
Hình 3.2. Ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu đến DH và NR của dịch FPH.....	79
Hình 3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng alcalase đến DH và NR của dịch FPH.....	81
Hình 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến DH và NR của dịch FPH.....	82
Hình 3.5. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến DH và NR của dịch FPH	83
Hình 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến DH và NR của dịch FPH.	84
Hình 3.7. Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme lipase đến hàm lượng lipít và NR.	86
Hình 3.8. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng lipít và NR	88
Hình 3.9. Sơ đồ quy trình sản xuất dịch protein thủy phân bằng enzyme alcalase và lipase thương mại từ phế liệu cá Tra.	89
Hình 3.10. Đồ thị biểu diễn phân bố khối lượng phân tử của dịch thủy phân.	90
Hình 3.11. Hình ảnh dịch FPH cô đặc từ phế liệu cá Tra thủy phân bằng enzyme alcalase và lipase.	92
Hình 3.12. Hình ảnh xương cá Tra thu được theo (a) phương pháp đun sôi và (b) phương pháp thủy phân bằng alcalase.....	95
Hình 3.13. Ảnh SEM của HA thu được từ xương cá Tra nung ở (a) 600°C, (b) 700°C, (c) 800°C, (d) 900°C và (e) 1000°C.....	99
Hình 3.14. Ảnh TEM của HA thu được từ xương cá Tra nung ở (a) 600°C, (b) 700°C, (c) 800°C, (d) 900°C và (e) 1000°C.....	100
Hình 3.15. Phổ XRD của (a) xương cá Tra, HA (b) 600°C, (c) 700°C, (d) 800°C, ...	101
Hình 3.16. Phổ FTIR (a) xương cá Tra, HA (b) 700°C và (c) 900°C trong 2 giờ.....	103
Hình 3.17. HA thu nhận từ xương cá Tra ở mẫu 1 (1 giờ), mẫu 2 (2 giờ), mẫu 3 (3 giờ), mẫu 4 (4 giờ), mẫu 5 (5 giờ).....	104
Hình 3.18. Ảnh SEM của HA thu được từ xương cá Tra nung ở (a) 1 giờ, (b) 2 giờ, (c) 3 giờ, (d) 4 giờ và (e) 5 giờ.....	105
Hình 3.19. Phổ XRD của HA thu được ở các thời gian nung (a) 1 giờ, (b) 2 giờ, (c) 3 giờ, (d) 4 giờ và (e) 5 giờ.....	106

Hình 3.20. HA cá Tra thu nhận ở các tốc độ gia nhiệt nung, mẫu 1 (3°C/phút), mẫu 2 (5°C/phút), mẫu 3 (7°C/phút) và mẫu 4 (10°C/phút).....	107
Hình 3.21. Ảnh SEM của HA thu được từ xương cá Tra nung ở tốc độ gia nhiệt.....	108
Hình 3.22. Phổ XRD của (a) xương cá thô và HA thu được ở các tốc độ gia nhiệt ..	108
Hình 3.23. Ảnh SEM của HA thu được ở 700°C từ xương (a) cá Tra, (b) cá rô phi, (c) cá Chêm và (d) cá Ngừ.....	110
Hình 3.24. Ảnh TEM của HA thu được ở 700°C từ xương (a) cá Tra, (b) cá rô phi, (c) cá Chêm và (d) cá Ngừ.....	110
Hình 3.25. Ảnh (a,b) TEM, (c) HRTEM và (d) mẫu SAED của HA thu được từ xương cá Tra ở 700°C với các độ phóng đại khác nhau.....	111
Hình 3.26. Phổ XRD của xương (a) cá Tra, (b) cá rô phi, (c) cá Chêm, (d) cá Ngừ và HA chuẩn JCPDS-09-0432.....	111
Hình 3.27. (a) Phổ XPS tổng của HA và phổ XPS phân giải cao của (b) Ca 2p, (c) P 2p và (d) O 1s.....	114
Hình 3.28. Đồ thị hấp và giải hấp của HA thu được từ xương (a) cá Tra, (b) cá rô phi, (c) cá Chêm, (d) cá Ngừ.....	116
Hình 3.29. Sơ đồ quy trình thu nhận hydroxyapatite từ phế liệu cá Tra.....	117
Hình 3.28. Đồ thị tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng theo khối lượng tôm của 5 nghiệm thức nuôi tôm.....	123
Hình 3.29. Đồ thị tăng trưởng tôm thẻ chân trắng theo chiều dài 5 nghiệm thức.....	124
Hình 3.30. Tôm thẻ chân trắng 27 ngày tuổi của 5 nghiệm thức (a) NT1, (b) NT2, (c) NT3, (d) NT4 và (e) NT5.....	125
Hình 3.31. Tôm thẻ chân trắng ở các giai đoạn (a) 20 ngày tuổi, (b) 27 ngày tuổi, (c) 34 ngày tuổi, (d) 41 ngày tuổi và (e) 55 ngày tuổi.....	125
Hình 3.32. Ảnh SEM với độ phóng đại khác nhau của vỏ tôm thẻ chân trắng post 55 (a,b) nghiệm thức 1, (c,d) nghiệm thức 4.....	127
Hình 3.33. Phổ XRD vỏ tôm 55 ngày tuổi (a) nghiệm thức 1, (b) nghiệm thức 4.....	127
Hình 3.34. Quy trình nuôi tôm thẻ chân trắng 20 – 55 ngày tuổi có bổ sung hỗn hợp dịch FPH và HA từ phế liệu cá Tra.....	128

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Thành phần dinh dưỡng của cá Tra	6
Bảng 1.2. Thành phần phần trăm khối lượng cá Tra	7
Bảng 1.3. Thành phần hóa học của phế liệu một số loài cá (wt%)	8
Bảng 1.4. Các phương pháp hóa học tổng hợp HA	26
Bảng 1.5. HA thu nhận từ phế liệu cá và ứng dụng	31
Bảng 1.6. Sản lượng bột cá nhập khẩu của Việt Nam từ 2008-2016	34
Bảng 1.7. Chỉ tiêu lý, hóa của thức ăn tôm	35
Bảng 1.8. Thành phần axit amin trong thức ăn tôm có hàm lượng protein 35%	37
Bảng 2.1. Dụng cụ và thiết bị sử dụng trong quá trình nghiên cứu	41
Bảng 2.2. Một số vật tư hóa chất sử dụng trong quá trình nghiên cứu	43
Bảng 3.1. Thành phần khối lượng và hóa học của phế liệu cá Tra	74
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của các phương pháp tách lipit phế liệu cá Tra	75
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu đến DH và NR của dịch FPH	78
Bảng 3.4. Thông số chất lượng của dịch FPH từ phế liệu cá Tra	91
Bảng 3.5. Thành phần axit amin của dịch FPH từ phế liệu cá Tra	91
Bảng 3.6. Thành phần axit béo của dầu cá thô thu nhận từ phế liệu cá Tra thủy phân	93
Bảng 3.7. Thành phần hóa học của xương cá Tra thô	96
Bảng 3.8. Thành phần hóa học của sản phẩm HA	96
Bảng 3.9. Thành phần hóa học của phế liệu từ các loại cá khác nhau	97
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất và trạng thái của HA xương cá Tra	98
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của thời gian nung đến tính chất sản phẩm HA	104
Bảng 3.12. Ảnh hưởng của tốc độ gia nhiệt nung đến tính chất sản phẩm HA	107
Bảng 3.13. Thành phần nguyên tố của HA xương cá	112
Bảng 3.14. Kết quả thành phần nguyên tố của HA từ xương cá thô	115
Bảng 3.15. Thành phần ôxit kim loại của HA từ xương cá thô	115
Bảng 3.16. Diện tích bề mặt của HA từ xương cá Tra và một số loại cá khác	116
Bảng 3.17. Các chỉ tiêu môi trường của các nghiệm thức nuôi tôm	119
Bảng 3.18. Mật độ tổng vi khuẩn trong môi trường nước ở các nghiệm thức (CFU/mL)	
Đơn vị tính: 10^3 CFU/mL	120

Bảng 3.19. Mật độ tổng vi khuẩn vibrio trong môi trường nước các nghiệm thức (CFU/mL)	
Đơn vị tính: 10^3 CFU/mL	121
Bảng 3.20. Khối lượng và chiều dài tôm ở các giai đoạn nuôi thử nghiệm	126
Bảng 3.21. Tỷ lệ sống và năng suất của tôm 55 ngày tuổi ở các nghiệm thức	125

PHẦN MỞ ĐẦU

Cá Tra (*Pangasius hypophthalmus*) là một trong hai sản phẩm thủy sản xuất khẩu chủ lực của Việt Nam. Tổng diện tích nuôi cá Tra của Việt Nam tăng nhanh từ năm 2015 là 5.500 ha lên 7.127 ha năm 2019 tương ứng với sản lượng cá Tra thu hoạch đạt 1 triệu tấn tăng lên 1,52 triệu tấn. Tổng giá trị xuất khẩu tăng từ 1,57 tỷ USD năm 2015 lên đạt 2 tỷ USD năm 2019, đóng góp 23,26% vào giá trị xuất khẩu của ngành Thủy sản [14]. Hầu hết các sản phẩm cá Tra xuất khẩu dưới dạng cá Tra phi-lê đông lạnh. Tuy nhiên, khối lượng cá Tra phi-lê chỉ chiếm khoảng 40%, do đó khoảng 60% là phế liệu cá gồm đầu, vây, khung xương, nội tạng, da, thịt vụn [86,93,103,138]. Đây là nguồn phế liệu khổng lồ, rất có tiềm năng để sản xuất các giá phẩm giá trị gia tăng nhưng nếu không có cách giải quyết phù hợp thì sẽ gây lãng phí tài nguyên và ô nhiễm môi trường.

Ở nước ta hiện nay, phế liệu cá Tra lớn thải ra từ các dây chuyền chế biến cá Tra phi-lê đông lạnh tại các nhà máy chế biến cá Tra phi-lê đông lạnh tại một số tỉnh thuộc Đồng bằng sông Cửu Long, như: Nam Việt, Vĩnh Hoàn, Hùng Cá.. chủ yếu vẫn được dùng để sản xuất bột cá với công nghệ đơn giản như hấp, sấy và nghiền. Sản phẩm này thường dùng làm thức ăn chăn nuôi có giá trị kinh tế và chất lượng thấp.

Trong khi đó, phế liệu cá có chứa nhiều hợp chất có giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao như protein, khoáng, lipít,... [35,39,58,74,86]. Các hợp chất này có thể được dùng để sản xuất ra các sản phẩm thức ăn có giá trị kinh tế cao dùng trong chăn nuôi, thậm chí có thể sử dụng làm thực phẩm cho con người [86,103,138]. Do đó, việc nghiên cứu thu nhận các hợp chất có giá trị gia tăng từ phế liệu cá Tra là rất cần thiết.

Các tài liệu đã công bố cho thấy các hợp chất sinh học (dịch thủy phân protein, lipít, axit amin, khoáng...) có thể được thu nhận từ phế liệu cá chủ yếu bằng hai cách chính đó là phương pháp dùng các tác nhân hóa học [35,49,58,77,99,154] và phương pháp sử dụng tác nhân sinh học [74,128,136,144].

Mặc dù đã có nhiều công trình nghiên cứu thu nhận các hợp chất có hoạt tính sinh học từ phế liệu cá bằng phương pháp khác nhau. Tuy vậy, các công trình này thường chỉ sử dụng một phần trong phế liệu cá để thu nhận các sản phẩm giá trị gia tăng. Cụ thể, một số tác giả tập trung thu nhận dịch thủy phân protein và lipít từ phần hũu cơ của phế liệu cá mà bỏ qua phần khoáng chất (chủ yếu hydroxyapatite, HA) từ

phần xương cá [68,77,119,157]. Ngược lại, một số tác giả chỉ thu nhận HA từ xương cá [48,79,140,155], bỏ qua phần protein và lipít có trong phế liệu cá. Việc sử dụng một phần phế liệu cá vừa gây lãng phí tài nguyên, vừa có khả năng gây ô nhiễm môi trường hoặc phát sinh chi phí xử lý chất thải.

Từ các nhận định trên, tác giả đề xuất “***Nghiên cứu thu nhận dịch protein thủy phân và hydroxyapatite từ phế liệu cá Tra, định hướng ứng dụng trong thức ăn nuôi tôm thẻ chân trắng***”. Đề tài định hướng thu nhận đồng thời các sản phẩm giá trị gia tăng như dịch thủy phân protein, hydroxyapatite, lipít từ phế liệu cá Tra và thử nghiệm bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy phân và HA vào thức ăn tôm thẻ chân trắng. Kết quả của đề tài sẽ góp phần nâng cao giá trị kinh tế của sản phẩm cá Tra Việt Nam, giảm thiểu nguy cơ ô nhiễm môi trường, đồng thời cung cấp thêm nguồn dinh dưỡng cho thức ăn tôm.

Mục tiêu nghiên cứu tổng quát:

Xây dựng được quy trình thu nhận đồng thời dịch protein thủy phân, hydroxyapatite và lipít thô từ phế liệu cá Tra sau phi-lê bằng enzyme alcalase và lipase. Ứng dụng thử nghiệm bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy phân và hydroxyapatite vào thức ăn tôm giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi.

Mục tiêu nghiên cứu cụ thể:

Để đạt được mục tiêu nghiên cứu tổng quát trên đề tài xác định các mục tiêu cụ thể như sau:

1. Nghiên cứu xây dựng được quy trình sản xuất dịch protein thủy phân từ phế liệu cá Tra bằng phương pháp sinh học. Sản phẩm dịch protein thủy phân có hàm lượng protein và hàm lượng lipít đạt TCVN-10325: 2014 để ứng dụng bổ sung vào thức ăn tôm 20 – 55 ngày tuổi.
2. Nghiên cứu xây dựng được quy trình thu nhận hydroxyapatite (HA) từ xương cá Tra bằng phương pháp nhiệt. Sản phẩm HA có kích thước nano, có độ xốp và độ tinh khiết và phù hợp làm nguồn khoáng bổ sung vào thức ăn tôm 20 – 55 ngày tuổi.
3. Xác định được hàm lượng thích hợp của hỗn hợp dịch protein thủy phân và HA bổ sung vào thức ăn tôm 20 – 55 ngày tuổi trong điều kiện thử nghiệm để thúc đẩy nhanh quá trình tăng trưởng của tôm.

Nội dung nghiên cứu

Để đạt được 3 mục tiêu nghiên cứu trên, luận án tập trung nghiên cứu 3 nội dung:

1. Nghiên cứu xác định các thông số thích hợp cho quá trình thủy phân phế liệu cá Tra đạt độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitơ cao nhất theo 2 giai đoạn, gồm: Giai đoạn 1: nguyên liệu phế liệu cá Tra, hàm lượng enzyme alcalase, nhiệt độ, thời gian thủy phân và nồng độ muối bổ sung. Giai đoạn 2: hàm lượng enzyme lipase và thời gian thủy phân.

2. Nghiên cứu xác định các thông số thích hợp cho quá trình thu nhận hydroxyapatite có kích thước nano từ xương cá Tra gồm: phương pháp tiền xử lý nguyên liệu, nhiệt độ, thời gian nung và tốc độ gia nhiệt nung.

3. Thử nghiệm xác định hàm lượng hỗn hợp dịch protein thủy phân và hydroxyapatite thích hợp bổ sung vào thức ăn tôm thẻ chân trắng 20 – 55 ngày tuổi để đánh giá khả năng tăng trưởng của tôm, tác động của môi trường nuôi tôm so với chỉ sử dụng thức ăn tôm thương mại.

Phạm vi nghiên cứu:

Luận án nghiên cứu thu nhận dịch protein thủy phân, hydroxyapatite và lipit thô từ phế liệu cá Tra bằng enzyme alcalase và lipase. Ứng dụng thử nghiệm bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy phân và hydroxyapatite vào thức ăn nuôi tôm giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của Luận án:

- Ý nghĩa khoa học:

Kết quả nghiên cứu của Luận án cung cấp thông tin về thành phần hóa học của nguồn phế liệu cá Tra (*Pangasius hypophthalmus*) với các kích cỡ cá nguyên liệu khác nhau. Từ đó, lựa chọn quy trình phù hợp để xử lý phế liệu hiệu quả. Ngoài ra, Luận án trình bày quy trình thu nhận đồng thời các sản phẩm giá trị gia tăng gồm dịch protein thủy phân, hydroxyapatite, lipit thô hướng đến quy trình sản xuất “không-chất-thải”. Kết quả bước đầu về bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy phân và hydroxyapatite vào thức ăn tôm giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi để làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo. Đây là tài liệu tham khảo cho sinh viên, giảng viên và các cán bộ nghiên cứu khoa học về hướng nghiên cứu liên quan.

- Ý nghĩa thực tiễn:

Việc tận dụng phế liệu cá Tra sau quá trình chế biến để thu nhận đồng thời các sản phẩm giá trị gia tăng gồm dịch protein thủy phân, hydroxyapatite, lipit thô hướng đến quy trình sản xuất “không-chất-thải” và tận dụng bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy

phân và hydroxyapatite vào thức ăn tôm giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi sẽ góp phần nâng cao giá trị kinh tế của sản phẩm cá Tra Việt Nam, mang lại lợi ích to lớn cho các doanh nghiệp chế biến thủy sản, đem lại hiệu quả kinh tế cao, đồng thời làm giảm thiểu nguy cơ ô nhiễm môi trường do nguồn phế phẩm gây ra. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu gợi mở cho sản xuất và sử dụng hỗn hợp dịch thủy phân và hydroxyapatite từ phế liệu cá Tra bổ sung vào thức ăn nuôi tôm.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Cá Tra

1.1.1. Giới thiệu chung

- Tên tiếng Anh: Shutchi Catfish
- Tên khoa học: *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878)
- Tên thương mại: Tra catfish
- Bộ cá nheo: *Siluriformes*
- Họ cá Tra: *Pangasiidae*
- Giống cá Tra đầu: *Pangasianodon*
- Loài cá Tra: *Pangasianodon hypophthalmus*
- Cá Tra là một trong số 11 loài thuộc họ cá Tra (*Pangasiidae*) đã được xác định ở sông Cửu Long.



Hình 1.1. Cá Tra (*Pangasius hypophthalmus*).

1.1.2. Phân bố

- Cá Tra phân bố chủ yếu ở lưu vực sông Mê Kông, đặc biệt ở 4 nước Lào, Campuchia, Thái Lan và Việt Nam.
- Ở Việt Nam, cá Tra không sinh sản trong ao nuôi và ngoài tự nhiên. Cá Tra sinh sản ở vùng Campuchia, cá Tra bột theo dòng nước sông Mê Kông về Việt Nam. Hiện nay, Việt Nam đã sinh sản nhân tạo thành công giống cá Tra và đã cung cấp được nhu cầu về giống cho nghề nuôi cá Tra thương phẩm.
- Cá trưởng thành chỉ thấy trong ao nuôi, ít gặp trong tự nhiên, do cá có tập tính di cư ngược dòng sông Mê Kông để sinh sống và tìm nơi sinh sản tự nhiên. Khảo sát

chu kỳ di cư của cá Tra ở địa phận Campuchia cho thấy cá ngược dòng từ tháng 10 đến tháng 5 và di cư về hạ lưu từ tháng 5 đến tháng 9 hàng năm.

1.1.3. Đặc điểm sinh học của cá Tra

Cá Tra là cá da trơn, cá có thân dài, dẹp ngang, lưng xám đen, bụng hơi bạc, miệng rộng, đầu nhỏ vừa phải, mắt tương đối to, có 2 râu dài; vây lưng cao, có một gai cứng có răng cưa; vây ngực có ngành, bụng có 8 tia phân nhánh, trong khi các loài khác có 6 tia [6]. Cá Tra có thể sống được trong điều kiện ao tù nước đọng, nhiều chất hữu cơ, oxy hòa tan thấp, mật độ nuôi cao bởi vì cá Tra có cơ quan hô hấp phụ và còn có thể hô hấp bằng bóng khí và da. Cá Tra có thể sống được ở vùng nước có nồng độ muối 7 - 10‰ và nước phèn có pH ≥ 5 ; cá dễ chết ở nhiệt độ thấp $\leq 15^{\circ}\text{C}$ nhưng chịu nóng lên đến 39°C .

1.1.4. Thành phần hóa học và dinh dưỡng cá Tra

Thành phần hóa học và dinh dưỡng của cá Tra được trình bày ở Bảng 1.1. Thành phần hóa học của cá Tra chủ yếu gồm: nước, protein, lipít, muối vô cơ, vitamin và phụ thuộc vào giống, loài, giới tính... Ngoài ra, thành phần hóa học còn phụ thuộc vào các yếu tố như: thức ăn, môi trường sống, kích cỡ cá và các đặc tính di truyền cũng ảnh hưởng đến thành phần hóa học của cá nguyên liệu, đặc biệt là nguyên liệu cá nuôi [2].

Bảng 1.1. Thành phần dinh dưỡng của cá Tra [2]

Thành phần	Giá trị
Năng lượng cung cấp/100g	124,52 cal
Năng lượng cung cấp từ chất béo	30,84 cal
Tổng lượng chất béo	3,42 g
Chất béo bão hòa	1,64 g
Chất béo chưa bão hòa (có DHA, EPA)	1,78 g
Cholesterol	25,2 mg
Na	70,6 mg
Protein	23,42g

Bảng 1.1 cho thấy rằng hàm lượng protein trong cá Tra vào khoảng 23,42% tương đối cao. Trong thịt cá Tra còn chứa nhiều DHA, hàm lượng cholesterol rất thấp (0,025%) nên thịt cá Tra rất tốt cho não bộ, tốt cho sức khỏe người tiêu dùng.

Thành phần khối lượng của cá Tra phụ thuộc vào loài, giống, tuổi tác, giới tính, thức ăn và khu vực sinh sống.

Bảng 1.2. Thành phần phần trăm khối lượng cá Tra [2]

Bộ phận	Hàm lượng (%)
Thịt cá	33 – 38
Xương, đầu vây	27 – 42
Mỡ	15 – 24
Da	5 – 7

Tỉ lệ thành phần khối lượng cá Tra còn thay đổi theo trọng lượng cá, cá càng lớn thì tỉ lệ thịt càng nhiều hơn so với các thành phần khác [2].

1.1.5. Tình hình nuôi, chế biến và xuất khẩu cá Tra

Ở Việt Nam, Cá Tra được nuôi chủ yếu ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long như An Giang, Đồng Tháp, Cần Thơ, Bến Tre.

Tổng diện tích nuôi cá Tra của Việt Nam tăng nhanh từ năm 2015 là 5.500 ha lên 7.127 ha năm 2019 tương ứng với sản lượng cá Tra thu hoạch đạt 1 triệu tấn tăng lên 1,52 triệu tấn. Tổng giá trị xuất khẩu tăng từ 1,57 tỷ USD năm 2015 lên đạt 2 tỷ USD năm 2019, đóng góp 23,26% vào giá trị xuất khẩu của ngành Thủy sản [15]. Tại vùng đồng bằng sông Cửu Long, các tỉnh có diện tích nuôi lớn đạt sản lượng cá Tra tăng mạnh là Đồng Tháp với 466,3 nghìn tấn, tăng 6,0%, An Giang 261,6 nghìn tấn (+5,9%), Cần Thơ đạt 174,2 nghìn tấn (+6,4%).

1.2. Phế liệu cá Tra

1.2.1. Đặc điểm

Cá Tra là một trong hai sản phẩm chế biến xuất khẩu chủ lực của ngành chế biến thủy sản Việt Nam sau sản phẩm tôm. Ngành công nghiệp chế biến cá Tra phi-lê đông lạnh tạo ra một lượng lớn đầu, xương, mỡ, nội tạng và da cá Tra. Phế liệu của cá Tra sau khi phi lê, bỏ da chiếm khoảng 60% so với nguyên liệu cá. Phế liệu cá có chứa hàm lượng lipid cao khoảng 14,6 – 17,5%. Theo ước tính, nếu sản lượng cá Tra nguyên liệu đạt một triệu tấn/năm thì các doanh nghiệp phải loại bỏ hơn 600.000 tấn phế liệu. Do vậy, việc tận dụng thu nhận các sản phẩm có giá trị cao hơn góp phần nâng cao hiệu quả kinh tế của công nghiệp chế biến cá Tra phi-lê đông lạnh nhằm tránh lãng phí tài nguyên và góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

Phế liệu cá Tra trong các nhà máy chế biến bao gồm: đầu, xương, vây, nội tạng, máu, mỡ, thịt vụn cá... phụ thuộc mùa vụ của nguồn nguyên liệu và mang đặc trưng theo từng loại hình công nghệ chế biến khác nhau. Khối lượng và chủng loại

của nguyên liệu còn lại phụ thuộc vào nhiều yếu tố: công suất của nhà máy, loại nguyên liệu được sử dụng, chất lượng của nguyên liệu, trình độ công nghệ chế biến, yêu cầu của sản phẩm cuối cùng, tay nghề công nhân.

Bảng 1.3. Thành phần hóa học của phế liệu một số loài cá (wt%)

Phế liệu	Nước (%)	Protein (%)	Lipít (%)	Tro (%)	Tham khảo
Đầu cá ngừ	59,0	14,8	13,5	11,8	
Nội tạng cá ngừ	77,4	16,0	3,7	1,9	[74]
Đuôi cá ngừ	58,2	17,4	3,3	20,5	
Đầu cá mè	74,9	13,7	5,8	6,4	[61]
Nội tạng cá mè	77,7	15,8	4,9	1,9	[62]
Xương cá thu	71,6	14,1	10,4	3,4	
Vây, đuôi, da, ruột cá thu	65,6	12,1	20,8	1,3	[157]
Đầu cá hồi	66,0	11,3	16,7	6,0	
Xương cá hồi	64,3	14,1	15,2	6,4	[135]
Da cá hồi	52,7	20,0	26,3	1,0	

1.2.2. Tận dụng phế liệu cá

Phế liệu cá chứa nhiều thành phần có giá trị như protein, lipít, khoáng, enzyme, các chất có hoạt tính sinh học. Ngày nay, công nghệ phát triển đã mở ra nhiều hướng tận dụng nguồn phế liệu cá. Từ phế liệu cá có thể sản xuất ra nhiều sản phẩm có giá trị như bột cá, dầu cá, collagen, gelatin, sản phẩm protein thủy phân, bột canxi, chế phẩm enzyme, dầu diesel sinh học và HA. Việc tận dụng phế liệu cá để chế biến chúng thành những sản phẩm có giá trị không những góp phần hạn chế sự ô nhiễm môi trường do phế liệu gây ra mà còn nâng cao giá trị sử dụng của phế liệu, tăng hiệu quả kinh tế cho các doanh nghiệp chế biến thủy sản và đem lại lợi ích kinh tế lớn cho đất nước [21]. Các sản phẩm thu nhận từ phế liệu cá:

Dịch đạm thủy phân

Dịch đạm thủy phân là sản phẩm của quá trình thủy phân. Khi cô đặc sẽ thu được dịch đạm cô đặc. Thành phần chủ yếu của dịch đạm thủy phân là các axit amin, các peptit. Ngoài ra, trong dịch đạm thủy phân còn chứa một lượng nhỏ khoáng và lipít. Thủy phân protein bằng enzyme là một trong những phương pháp hiệu quả để thu hồi protein, các peptit có hoạt tính sinh học có giá trị từ phế liệu thủy sản. Việc thực hiện quá trình thủy phân protein phế liệu thủy sản không những thu được sản

phẩm protein thủy phân mà còn có thể thu được bột khoáng và lipít. Các phế liệu thủy sản sau đây đã được sử dụng để tạo sản phẩm protein thủy phân như xương cá hồi [109], đầu cá hồi [143], xương cá tuyết [149], đầu và nội tạng cá trích [148], phế liệu cá tầm [126], nội tạng cá ngừ vây vàng [120], đầu cá ngừ vây vàng [127]... Các enzyme thường được sử dụng để thủy phân protein phế liệu thủy sản là Protamex, Alcalase, Flavourzyme, Neutrase... [72,102,126,143].

Khi thủy phân protein thu được dịch thủy phân có màu vàng nhạt. Thành phần chủ yếu của dịch protein thủy phân là các axit amin và các peptit với chiều dài mạch khác nhau. Ngoài ra trong dịch thủy phân protein còn chứa khoáng và một lượng nhỏ lipít. Dịch thủy phân protein được sấy chân không thăng hoa hoặc sấy phun để thu bột protein thủy phân. Bột protein thủy phân này có màu trắng ngà, vàng nhạt hay nâu tùy thuộc vào nguyên liệu ban đầu và chế độ thủy phân. Sản phẩm protein thủy phân có hàm lượng protein cao với các axit amin không thay thế rất cần thiết cho cơ thể. Trong quá trình thủy phân đầu cá ngừ vây vàng bằng enzyme Alcalase và Protamex, độ thủy phân, sự thu hồi nitơ và hàm lượng protein trong các sản phẩm thủy phân tăng theo thời gian thủy phân. Các sản phẩm thủy phân này có hàm lượng axit amin không thay thế cao [120]. Độ thủy phân của sản phẩm protein thủy phân từ đầu, nội tạng và đuôi cá ngừ vây vàng lần lượt là 32,3%, 16,8% và 22,2% và hiệu suất thu hồi nitơ trong các sản phẩm thủy phân này là 73,6%, 82,7%, 85,8% [74].

Bột đậm cá

Bột đậm cá thủy phân cũng là một trong những dạng của quá trình thủy phân. Dịch đậm thủy phân được đem đi cô đặc và sấy khô thì thu được bột đậm thủy phân (bột đậm hòa tan). Thực chất của quá trình sản xuất bột đậm bằng phương pháp sử dụng protease là quá trình thủy phân protein để tạo các peptit và các axit amin dưới tác động của hệ protease nội tại và enzyme bổ sung từ ngoài vào. Bột đậm cá thủy phân có hàm lượng protein cao khoảng 70%, lipít khoảng 0,5% và tỷ lệ nitơ dễ hấp thụ cao, rất có giá trị dinh dưỡng. Có thể sử dụng dưới dạng nguyên chất hoặc phối trộn với các thực phẩm khác. Bột đậm thủy phân có màu trắng ngà, vàng nhạt hay vàng nâu tùy thuộc vào nguyên liệu ban đầu. Mùi thơm đặc trưng, khi cho vào nước dễ tan, có khả năng tạo gel, dẻo dính. Bột đậm thủy phân thường được sản xuất từ các loài cá kém giá trị kinh tế hoặc từ các phế liệu cá.

Bột khoáng

Xương cá chứa một lượng canxi và photpho đáng kể và được xem như một nguồn tiềm năng để sản xuất bột canxi. Để sản xuất bột khoáng (bột canxi) có thể sử dụng phương pháp thủy phân bằng hóa chất hoặc phương pháp thủy phân bằng enzyme. Sử dụng hóa chất để thủy phân là phương pháp cổ điển được sử dụng từ lâu. Các hóa chất sử dụng trong quá trình thủy phân có thể là các axit (HCl , H_2SO_4) hoặc kiềm (NaOH). Một số thành phần hóa sinh của từng bộ phận của cá Tra (đầu, xương, vây, đuôi) đã được xác định để chọn ra loại nguyên liệu giàu canxi thích hợp cho quá trình chiết tách. Trong các bộ phận phế liệu, xương cá có hàm lượng tro khá cao (20,11%) với thành phần canxi chiếm tỉ lệ cao nhất (4,49%) so với các bộ phận khác. Do đó, xương cá Tra được lựa chọn làm nguyên liệu để sản xuất bột canxi.

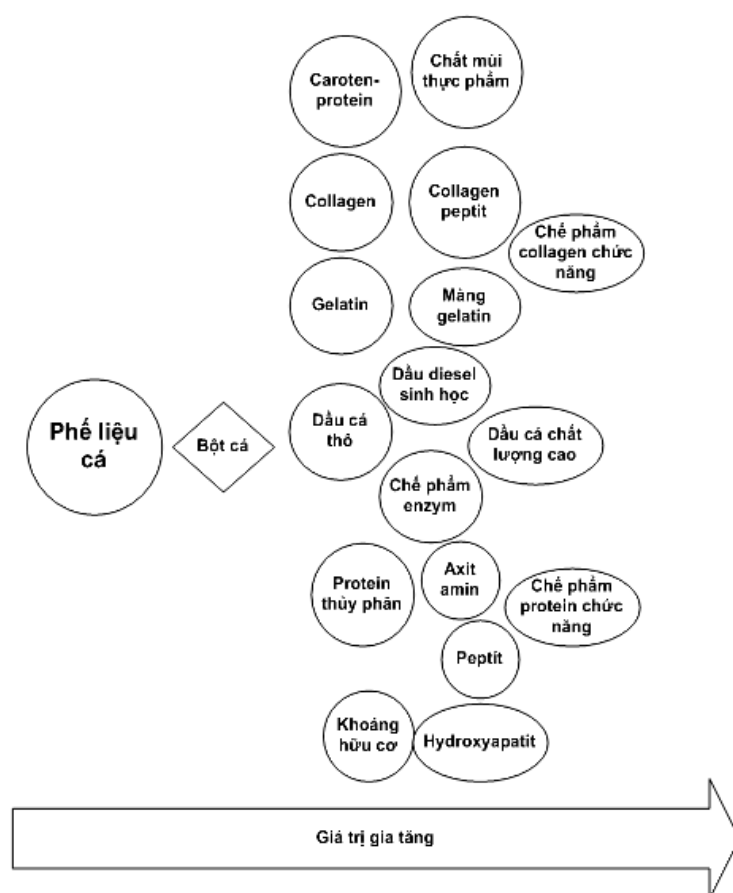
Dầu cá: là lớp trên cùng thu được sau khi ly tâm hỗn hợp có được từ sự thủy phân. Hàm lượng thì phụ thuộc vào nguyên liệu ban đầu. Ngoài ra, trong dầu cá có chứa hàm lượng DHA, EPA... rất tốt cho sức khỏe con người.

1.3. Dịch protein thủy phân

1.3.1. Sản xuất dịch protein thủy phân

Phế liệu cá chứa nhiều thành phần có giá trị như protein, lipid, khoáng, enzyme, các chất có hoạt tính sinh học. Ngày nay, công nghệ phát triển đã mở ra nhiều hướng tận dụng nguồn phế liệu thủy sản.

Từ phế liệu cá có thể sản xuất ra nhiều sản phẩm có giá trị như bột cá, dầu cá, collagen, gelatin, sản phẩm protein thủy phân, bột canxi, chế phẩm enzyme, dầu diesel sinh học và HA. Việc tận dụng phế liệu thủy sản để chế biến chúng thành những sản phẩm có giá trị không những góp phần hạn chế sự ô nhiễm môi trường do phế liệu gây ra mà còn nâng cao giá trị sử dụng của phế liệu, tăng hiệu quả kinh tế cho các doanh nghiệp chế biến thủy sản và đem lại lợi ích kinh tế lớn cho đất nước. Hình 1.2 trình bày cách tiếp cận thu nhận các sản phẩm giá trị gia tăng từ phế liệu cá Tra. Trong đó, dịch protein thủy phân có thể thu hồi từ phế liệu cá Tra theo nhiều phương pháp khác nhau như phương pháp hóa học, phương pháp thủy phân tự nhiên, phương pháp thủy phân bằng enzyme thương mại.



Hình 1.2. Sơ đồ phát triển các sản phẩm giá trị gia tăng từ phế liệu cá [21]

1.3.1.1. Thu hồi dịch protein thủy phân bằng phương pháp hóa học

Để thu hồi dịch protein thủy phân từ phế liệu cá đã có nhiều tác giả sử dụng các tác nhân thủy phân như: axit, kiềm mạnh hoặc các muối của nó như: HCl, NaOH, $\text{Na}_6(\text{PO}_3)_6$ hoặc cũng có thể sử dụng các axit hữu cơ để thủy phân như: axit formic, axit lactic. Sản phẩm thu hồi được ứng dụng chủ yếu làm thức ăn chăn nuôi hoặc sử dụng làm phân bón. Nguyên liệu và tác nhân sử dụng cho thủy phân bằng các tác nhân hóa học gồm: thủy phân phế liệu cá tuyết và cá monkfish sử dụng HCl và natri hexametaphosphate [$\text{Na}_6(\text{PO}_3)_6$] HCl (pH 2–2,6) [39], cơ thịt cá trích sử dụng axit hoặc kiềm [154]; phụ phẩm cá mòi khô đông lạnh thủy phân bằng NaOH (pH=7–11) [123]. Điều kiện thủy phân và sản phẩm thu nhận được tùy theo từng loại phế liệu và tác nhân thủy phân khác nhau như: sản phẩm thủy phân dùng để sản xuất bột cá chăn nuôi có hàm lượng protein cao bằng quá trình chiết rút hóa học tối ưu và kết tủa để thu hồi protein. Độ hòa tan của protein cá monkfish thấp hơn so với protein cá tuyết [39]. Thu hồi protein 89% protein từ cơ thịt cá ban đầu, kết quả cũng cho thấy tổng hàm lượng lipit thay đổi từ 0,13g/g protein cơ thịt cá đến 0,04 g/g protein cơ thịt cá trong cả 2 quá trình chiết rút bằng axit và kiềm, hàm lượng

phốt pho lipít là từ 0,037–0,02 g/g protein. Các protein được chiết rút bằng axit và kiềm tạo ra các loại gel có độ độ dài và màu như nhau. Độ bền gel protein được chiết rút bằng axit là bằng hoặc thấp hơn trong gel protein được sản xuất bằng kiềm. Khi sử dụng nguyên liệu thô đông lạnh thì độ dai và độ bền gel giảm đi [154]. Đa số protein cơ thịt cá ban đầu được thu hồi với 47,5% protein và 12% gelatin. Các tính chất chức năng của gelatin thu hồi từ đầu và da cá được so sánh. Khối lượng phân tử, độ nhớt, độ bền gel của gelatin ở đầu và da cá là như nhau. Để chiết rút gelatin từ phần đầu cá cần điều kiện nhiệt độ cao hơn và độ axit mạnh hơn nên dẫn đến gelatine bị thủy phân nhiều hơn làm cho tính chất keo gelatin kém hơn, nhưng độ nhớt của gelatin thấp không đáng kể so với gelatin chiết rút từ da. Gelatines thu được có khối lượng phân tử nhỏ có đặc tính chống oxy hóa rất hữu ích cho các thực phẩm chức năng [35]. Hàm lượng protein thu được là 83,51 mg/ml khi chiết xuất protein từ phụ phẩm cá mòi khô đông lạnh được xác định là ở pH 10,56 trong 48,61 phút, với tốc độ khuấy là 104,77 vòng/phút và tỷ lệ NaOH/tỷ lệ mẫu là 1,54 [123].

Ưu nhược điểm của phương pháp này, các axit mạnh (HCl) hoặc kiềm mạnh (NaOH) được sử dụng làm tác nhân thủy phân trong điều kiện nhiệt độ cao. Đây là phương pháp dễ thực hiện, hiệu suất thu hồi cao, thời gian phản ứng nhanh, chi phí sản xuất thấp. Tuy nhiên, thủy phân bằng axit làm cắt đứt protein thành các peptit nhỏ hơn và phá hủy một số axit amin như cystein, cystine, methionin và tryptophane; thủy phân bằng kiềm, một số axit amin như serine và threonine bị phá hủy trong quá trình này. Ngoài ra, thủy phân trong môi trường kiềm gây ra sự chuyển đổi từ L-axit amin thành D-axit amin mà con người không hấp thụ được, điều này làm giảm giá trị dinh dưỡng của sản phẩm. Mặt khác, quá trình thủy phân bằng axit hoặc kiềm đòi hỏi thiết bị chịu được ở điều kiện khắc nghiệt (nhiệt độ cao), không an toàn cho người. Hơn nữa, quá trình sản xuất thải ra một lượng lớn chất thải hóa học nên tăng chi phí xử lý và có thể gây ô nhiễm môi trường. Do vậy, tùy theo điều kiện và mục đích, có thể lựa chọn phương pháp thủy phân phế liệu cá bằng các tác nhân hóa học cho phù hợp.

1.3.1.2. Thu hồi dịch protein thủy phân bằng phương pháp tận dụng enzyme nội tại trong nguyên liệu

Sử dụng enzyme nội tại để thủy phân thịt cá thu hồi dịch protein thủy phân là một phương pháp thực hiện từ lâu đời. Quá trình sản xuất nước mắm truyền thống là

một phương pháp tận dụng enzyme nội tại để thủy phân protein thịt cá thành sản phẩm cuối cùng là các axit amin trong sản phẩm nước mắm là phương pháp rất phổ biến hiện nay (phương pháp lên men). Trong nội tạng cá chứa một lượng lớn các vi sinh vật có lợi, tiến hành tạo kiện thuận về nhiệt độ, pH môi trường, các yếu tố khác để vi sinh vật trong hệ đường ruột của cá phát triển, tăng trưởng sinh khối. Vi sinh vật sẽ tiết ra hệ enzyme protease tiến hành thủy phân cắt mạch protein thịt cá tạo ra sản phẩm dịch thủy phân protein. Thủy phân theo phương pháp tận dụng enzyme nội tại trong nguyên liệu, các tác giả sử dụng các loại nguyên liệu như: nội tạng cá tuyết (*Gadus Morhua L.*) [33]), cá thu (*Scomber austriasicus*) [161]. Thực hiện thủy phân với enzyme nội tại ở pH cơ chất tự nhiên hoặc kết hợp enzyme nội tại với một trong bảy chế phẩm protease thương mại khác nhau (alcalase 2.4L, neutrase 0.8L, protamex TM, papain, promelain, actinidin và hỗn hợp protease thực vật [35] và enzyme nội tại rồi thủy phân nhanh bằng enzyme protease thương mại. Sản phẩm thủy phân thu hồi tùy thuộc vào nguyên liệu và điều kiện thủy phân khác nhau. Khi sử dụng enzyme alcalase và papain thủy phân cho năng suất cao nhất của chất khô hòa tan, alcalase thủy phân có hàm lượng chất khô đạt gần 95%. Trong khi đó, nếu sử dụng enzyme nội tại, không bổ sung enzyme thương mại thì quá trình thủy phân chỉ đạt được năng suất chất khô hòa tan lên tới 75%. Do đó, năng suất thủy phân tăng thêm có được bằng cách thêm các enzyme protease thương mại nhưng sẽ bị hạn chế và có thể không phải lúc nào cũng có lợi, về mặt kinh tế [33]. Khi thủy phân cá thu bằng protease thương mại sẽ thu nhận dịch thủy phân có hàm lượng các axit amin như, anserine, carnosine và các peptit khác cao hơn nhiều so với tự phân giải [161]. Dịch thủy phân cá thu có các hoạt tính chống oxy hóa khác nhau bao gồm ức chế quá trình tự oxy hóa axit linoleic, khử gốc tự do DPPH và oxy hóa tổng rất đáng kể. Kết quả cho thấy rằng peptit có trọng lượng phân tử khoảng 1400 Da có hoạt tính chống oxy hóa trong ống nghiệm mạnh hơn so với các peptit 900 và 200 Da.

Ưu nhược điểm của quá trình thủy phân này, thực hiện đơn giản, dễ thực hiện, chi phí sản xuất thấp nhưng có nhược điểm là tốc độ thủy phân chậm, thời gian thủy phân kéo dài nên năng suất thủy phân thấp, sản phẩm thu được không đồng đều, khó đạt được mục đích công nghệ mong muốn. Do vậy, tùy theo điều kiện và mục đích, có thể lựa chọn phương pháp thủy phân phế liệu cá bằng enzyme nội tại cho phù hợp.

1.3.1.3. Thu hồi dịch protein thủy phân bằng phương pháp bổ sung enzyme từ bên ngoài.

Thủy phân bằng enzyme có ưu điểm là chỉ đòi hỏi một lượng nhỏ enzyme trong điều kiện phản ứng ôn hòa, pH 6 - 8 và nhiệt độ phản ứng 40°C - 60°C. Các axit amin không bị phá hủy, sản phẩm thủy phân vẫn giữ được giá trị dinh dưỡng và đặc tính sinh học và không cần xử lý hóa học để loại bỏ tác nhân thủy phân sau khi thủy phân. Enzyme dễ dàng bị bất hoạt bằng cách gia nhiệt lên đến nhiệt độ làm biến tính enzyme. Quá trình thủy phân được kiểm soát dễ dàng, không cần sử dụng thiết bị chịu axit, chịu kiềm, chịu nhiệt độ cao, không gây độc hại đối với người và thân thiện với môi trường. Tuy nhiên, giá thành của các enzyme hiện nay còn cao và hiệu suất thủy phân còn thấp hơn so với thủy phân bằng phương pháp hóa học, do đó làm hạn chế ứng dụng của quá trình này vào trong sản xuất ở qui mô lớn.

1.3.1.4. Thu hồi protein bằng phương pháp vật lý

Để thu nhận được các protein nguyên thể tức là protein có tất cả tính chất tự nhiên đặc trưng của nó, thường sử dụng quá trình trích ly. Các tác nhân thường sử dụng trong quá trình trích ly và thu nhận protein là sự thay đổi nhiệt độ, pH và sử dụng các dung môi hóa học. Ngoài ra, các tác động khác như sóng siêu âm... Sóng siêu âm là những dãy sóng có tần số lớn hơn 20 kHz, có thể dao động cơ học trong pha rắn, lỏng và khí. Cơ chế của sóng siêu âm là giúp làm tăng khả năng trích ly. Các phương pháp trích ly và tinh sạch protein đều dựa trên những tính chất hóa lý của protein như độ tích điện, kích thước phân tử, độ hòa tan... của protein cần thu nhận.

1.3.2. Các công bố nghiên cứu sản xuất dịch protein thủy phân

Đã có nhiều công trình nghiên cứu để sản xuất dịch protein thủy phân. Các tác giả đã sử dụng các tác nhân hóa học: sử dụng HCl và natri hexametaphosphate [$\text{Na}_6(\text{PO}_3)_6$] HCl (pH 2–2,6) [39]; axit hoặc kiềm [154]; NaOH (pH=7–11) [123]. Tận dụng enzyme nội tại trong nguyên liệu để thủy phân: nội tạng cá tuyết (*Gadus Morhua* L.) [33]), cá thu (*Scomber austriasicus*) [161]; thực hiện thủy phân với enzyme nội tại ở pH cơ chất tự nhiên hoặc kết hợp enzyme nội tại với một trong bảy chế phẩm protease thương mại khác nhau (alcalase 2.4L, neutrase 0.8L, protamex TM, papain, promelain, actinidin và hỗn hợp protease thực vật [35] và enzyme nội tại rồi thủy phân nhanh bằng enzyme protease thương mại. Sử dụng enzyme alcalase 2.4® L [2,127]; enzyme protamex [74]; sử dụng kết hợp 2 loại enzyme alcalase 2.4® L và flavourzyme [9,58];

sử dụng hỗn hợp protamex và flavourzyme ở pH tự nhiên với tỷ lệ nước/nguyên liệu là 1/1, tỷ lệ protamex – flavourzyme 1:1, tỷ lệ hỗn hợp enzyme–cơ chất là 0,3%, nhiệt độ 55°C, thời gian 6 giờ [20]; sử dụng hỗn hợp enzyme trypsin 2% ở pH 8,5, nhiệt độ 40°C trong 2 giờ, tiếp theo được thủy phân bằng alcalase 2% ở pH 8,0, nhiệt độ 55°C trong 2 giờ để thủy phân phế liệu cá hồi [1]; sử dụng 2 loại enzyme alcalase 2.4® L và esperase [81]; sử dụng 2 loại enzyme: alcalase 2.4® L và papain [84]); sử dụng 03 loại emzym khác nhau alcalase, flavourzyme và protamex [68]. Với các điều kiện thủy phân khác nhau: sử dụng đầu cá ngừ vây vàng [9], phế liệu cá ngừ vây vàng (nội tạng cá) cho thủy phân ở nhiệt độ 90,25°C, thời gian 60,4 phút và hoạt tính enzyme 70,22 AU/kg protein [127]; nguyên liệu da cá hồi được thủy phân ở nhiệt độ 55,3°C, pH 8,39 và tỷ lệ enzyme/cơ chất 2,5% (v:w) [144]; phế liệu cá bóp được thủy phân với thời gian 12h, 0,1% enzyme, nhiệt độ 45°C, pH tự nhiên (6,3 – 6,5) [68]; phế liệu cá Tra được thủy phân ở nhiệt độ 60°C, pH= 5, thời gian 180 phút, lượng nước bổ sung 40%, trong đó có 10% nước nóng; protein thủy phân tiếp tục được cô đặc ở áp suất 0,33 atm, nhiệt độ 80°C trong 137 phút [117]; phế liệu cá rô phi với điều kiện thủy phân tối ưu theo RSM với nhiệt độ 50,76°C, thời gian 80 phút và tỷ lệ enzyme/cơ chất 1,2% [119]; phế liệu cá nhám mèa đốm (nội tạng cá) với điều kiện thủy phân tối ưu theo RSM: nhiệt độ 90,25°C, thời gian 60,4 phút và nồng độ enzyme 70,22 AU/kg protein [157]; sử dụng 2 loại khung xương cá hồi cắt khúc và xay nhỏ thủy phân với: tỷ lệ enzyme/mẫu 3% (w/w protein), thời gian 180 phút thu nhận sản lượng dịch thủy phân 24,05 – 26,39% [84].

Sản phẩm thủy phân thu hồi tùy thuộc vào nguyên liệu sử dụng và enzyme thủy phân khác nhau. Thu nhận dịch thủy phân protein có các đặc tính chống oxy hóa và sinh hóa. Kết quả cho thấy khối lượng phân tử của dịch thủy phân bằng cả alcalase và flavourzyme đều thấp hơn 5000 Da. Khi thủy phân bằng alcalase trong < 1,5 giờ sẽ thu được hơn 60% dịch TP có MW < 1000 Da. Dịch thủy phân có hoạt tính chống ôxi hóa tốt như: khử các gốc tự do và hạn chế sự oxy hóa. Hoạt tính chống oxy hóa của dịch thủy phân phụ thuộc vào độ thủy phân (DH), thời gian thủy phân và trọng lượng phân tử. Dịch thủy phân có phân bố khối lượng phân tử thấp hơn có khả năng khử sắt Fe²⁺ mạnh hơn ở mức nồng độ dịch 5,0 mg/mL. Khi thủy phân bằng alcalase, hoạt tính khử các gốc tự do DPPH và hạn chế sự oxy hóa đạt mức tối đa trong 1,5 - 2,0 giờ thủy phân tương ứng; hoạt tính chống oxy hóa của chúng bằng với hoạt tính chống oxi hóa của α -tocopherol trong hệ nhũ tương và carnosine trong hệ thống oxi hóa 2-

deoxyribose. Kết quả cũng cho thấy, dịch thủy phân thu được có độ hòa tan trên 75% trong phạm vi pH rộng. Khi thời gian thủy phân hơn 3 giờ sẽ làm dịch thủy phân chuyển sang sẫm màu hoặc màu vàng, có độ thủy phân (DH) hơn 53%, hàm lượng protein cao 72,34% và hàm lượng lipit thấp 1,43%. Tác giả cũng đã xác định thành phần axit amin trong dịch thủy phân [58].

Dịch thủy phân thu nhận từ nội tạng cá ngừ vây vàng có tiềm năng cao cho các ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản và thức ăn chăn nuôi. Nó cũng là một nguồn nitơ hiệu quả (như peptone) cho môi trường nuôi cấy vi sinh vật [127].

Thu nhận được sản phẩm dịch protein thủy phân có DH cao nhất 77,03%. Dịch thủy phân protein đông khô có hàm lượng protein cao (89,53%) và nhiều axit amin không thay thế. Protein thủy phân từ da cá hồi có tiềm năng như một nguồn peptit và axit amin cung cấp [144].

Thu nhận 2 phần: Phần dịch hòa tan và không tan. Kết quả cho thấy: độ thủy phân của dịch thủy phân thu được từ phần đầu, nội tạng và đuôi lần lượt là 32,3; 16,8 và 22,2% và hiệu suất thu hồi nitơ trong các phần hòa tan là 73,6% cho đầu, 82,7% cho nội tạng và 85,8% cho đuôi, phần lớn lipit có trong phần không tan. Kết quả cũng cho thấy phần hòa tan giàu peptit có khối lượng phân tử trung bình đến nhỏ và ít lipit; phần khác chứa protein không hòa tan và nhiều lipit. Thu nhận được sản phẩm thu nhận gelatin mạch ngắn hơn hoặc collagen có DH cao nhất 10,91%. Dịch thủy phân gelatin đông khô được xác định các chỉ tiêu: thành phần hóa học, độ nhớt và khối lượng phân tử. Dịch thủy phân gelatin sản xuất có chứa hàm lượng protein cao (85,26%); do đó, nó có thể phục vụ như một nguồn protein tiềm năng cho nhu cầu của con người [117].

Thu hồi 06 loại peptit có hoạt tính chống oxi được ứng dụng trong thực phẩm. Kết quả cho thấy sản phẩm protein thủy phân (peptit) thu được có độ thủy phân (DH) là 27,94% trong 760 phút đối với thịt và 33,14% trong 580 phút đối với phụ phẩm cá bóp. Kết quả cũng cho thấy rằng, hàm lượng tyrosine rất đa dạng và phụ thuộc vào cơ chất và loại enzyme sử dụng. Hàm lượng tyrosine trong dịch thủy phân protein thu được đạt cao nhất từ quá trình thủy phân phụ phẩm cá bóp bằng alcalase là 8,46% và bằng protamex là 6,46%; trong khi đó từ thịt cá 6,47% bằng protamex [74].

Sản phẩm dịch thủy phân có chứa 79,20–82,01% protein, 6,03–6,34% lipit, 9,81–11,09% tro và 4,02–5,80% ẩm. Phân tích thành phần axit amin của dịch thủy

phân cho thấy hàm lượng các AA chủ yếu như: glutamic acid/glutamine 113,45–117,56 mg/g mẫu, glycine 77,86 – 86,18 mg/g mẫu, aspartic acid/asparagine 76,04–78,67 mg/g mẫu, lysine 61,97– 65,99 mg/g mẫu và leucine 54,30 – 57,31 mg/g mẫu. Tác giả cũng xác định sự phân bố kích thước phân tử của dịch thủy phân bằng phương pháp sắc ký lọc gel để đánh giá khả năng chống oxy hóa của dịch và kết quả cho thấy phụ thuộc vào mẫu và enzyme sử dụng thủy phân. Alcalase cho năng suất thủy phân cao hơn nhưng dịch thủy phân của nó đắng hơn papain. Xử lý mẫu dạng cắt khúc thích hơn mẫu dạng xay nhỏ do dễ thực hiện. Ngoài ra, lượng xương còn lại từ mẫu cắt khúc sau khi thủy phân có thể được xử lý dễ dàng như một nguyên liệu ban đầu để sản xuất canxi sinh học. Dịch thủy phân protein từ khung xương cá hồi có thể được sử dụng như một chất bổ sung dinh dưỡng cho thực phẩm.

Các sản phẩm thu được từ quá trình thủy phân (tính trên 1kg nguyên liệu): bột thủy phân protein: 74g, lipít: 180g, bột protein không tan: 29g, bột khoáng: 112g. Thành phần hóa học của dịch thủy phân: N_{ts} 9,53 g/l, N_{aa} 4,62 gN/l, N_{NH_3} 0,97 g/l, tỉ lệ N_{aa}/N_{ts} là 48,50%. Bột thủy phân protein: độ ẩm 7,08%, protein 62,78%, lipít 3,20% , tro 3,15g, N_{ts} 10,04%, N_{aa} 4,08%; kết quả đã chỉ ra rằng hiệu suất thu hồi nitơ và lipít lần lượt là 70,3% và 65,4%. Sản phẩm thủy phân protein từ đầu cá ngừ vây vàng có hàm lượng protein 80%, lipít 1,3% và tro 7,9%. Sản phẩm thủy phân protein có hàm lượng axit amin không thay thế cao (33,67%). Dầu cá thu được từ sự thủy phân đầu cá ngừ giàu axit béo omega 3 (18,99%), đặc biệt axit docosahexaenoic (DHA) và eicosapentaenoic (EPA). Hàm lượng axit béo omega 6 là 4,37%. Các axit béo có hàm lượng cao trong dầu đầu cá ngừ là palmitic (29,75%), oleic (16,76%) và docosahexaenoic (14,56%) [9].

Sản phẩm có độ thủy phân, hiệu suất thu hồi nitơ và tổng nitơ bazơ bay hơi trong dịch thủy phân thu được lần lượt đạt là 60,50%, 83% và 0,98 g/l. Sản phẩm thu được chứa hàm lượng nitơ a xít amin 13,27 g/l, histamine 0,62 mg/100 g, có tiềm năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực [20].

Sản phẩm peptit mạch ngắn có khối lượng phân tử 30kDa và 10kDa có hoạt tính sinh học là những protein có mạch ngắn. Những peptit này ngoài giá trị dinh dưỡng chúng còn có một số ảnh hưởng đặc biệt đến chức năng sinh lý của cơ thể, giúp tăng cường và nâng cao sức khỏe của con người như khả năng chống ô xi hóa, kháng vi sinh vật, khả năng điều hòa miễn dịch. Kết quả thu được dịch thủy phân thu được có

hàm lượng a xít amin đạt 29,48 mg/ml và có hoạt tính chống ôxi hóa đo qua khả năng bắt gốc tự do DPPH là 70,34% [1].

Dịch thủy phân cô đặc có độ thủy phân 64,20 %, hàm lượng protein: 9,52(g), nitơ acid amin: 5,6 (gN/L), nitơ ammoniac: 0,71 (gN/L) và hiệu suất thu hồi protein: 88,72 % [2].

Tóm lại, các công trình nghiên cứu đã công bố ở trên cho thấy:

- Một số nghiên cứu thu nhận dịch thủy phân protein bằng cách sử dụng phương pháp hóa học [39,58,77,99,154]. Một số nghiên cứu thu nhận dịch thủy phân protein sử dụng vi sinh vật hoặc enzym để thu nhận các chất dinh dưỡng và các hoạt chất sinh học [73,119,126,128,136,144]. Sử dụng enzyme thủy phân là một trong những phương pháp rất hiệu quả để thu hồi dịch thủy phân từ phụ phẩm cá và sản xuất bột đậm thủy phân có hàm lượng đạm axit amin cao [39,136].

- Hầu hết các phương pháp đã nêu ở trên chỉ tập trung để thu nhận dịch thủy phân protein [55,84,138] và bỏ qua việc thu nhận phần rắn còn lại trong phế liệu cá, chủ yếu là hydroxyapatite. Đây là nguồn khoáng sinh học có rất nhiều ứng dụng trong thực tế.

Như vậy, các nghiên cứu trên đều chưa hoàn thiện là làm mất đi một vài hoạt chất sinh học, lãng phí tài nguyên và gây ô nhiễm môi trường; chưa nghiên cứu thu nhận đồng thời các sản phẩm dịch protein thủy phân, khoáng chất có trong phế liệu cá, đặc biệt là phế liệu cá Tra; chưa nghiên cứu ứng dụng của dịch thủy phân và phát triển thành quy mô công nghiệp. Do vậy, việc nghiên cứu một công nghệ đầy đủ và có hệ thống theo hướng thân thiện với môi trường cũng như tính đến hiệu quả kinh tế là điều rất cần thiết để hướng đến có thể sản xuất dịch thủy phân có độ thủy phân và hàm lượng đạm axit amin cao ứng dụng cho các ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và y dược.

1.4. Quá trình thủy phân bằng enzyme

1.4.1. Enzyme protease

Enzyme protease thủy phân liên kết peptit (-CO-NH-) giữa các axit amin trong phân tử protein. Enzyme là protein có khả năng xúc tác đặc biệt cho phản ứng hóa học xảy ra ở bên trong và bên ngoài cơ thể sinh vật, có đầy đủ tính chất của một protein.

Enzyme được sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm và trong nghiên cứu thực phẩm chủ yếu là thủy phân, gồm carbohydrate, protease. Trong đó enzyme

protease là hệ enzyme được sử dụng phổ biến. Các chế phẩm enzyme thủy phân là nhóm rất quan trọng nhất và được sử dụng hiệu quả trong công nghiệp thực phẩm. Protease được phân loại theo tính đặc hiệu của việc cắt đứt các liên kết peptit và động học phản ứng. Protease được đặc trưng hơn nữa bởi cơ chế thủy phân của chúng dạng endoproteinase hoặc exopeptidase. Các endoprotease thủy phân các liên kết peptit trong các phân tử protein, để tạo ra các peptit tương đối lớn. Các exopeptidase thủy phân các liên kết peptit cuối tạo thành sản phẩm cuối cùng là các axit amin. Trong thủy phân protein thực phẩm, endoprotease luôn luôn được sử dụng, nhưng đôi khi endoprotease là kết hợp với exopeptidase cho thủy phân.

1.4.2. Enzyme alcalase

Alcalase là enzyme endoprotease, một loại enzyme kiềm được sản xuất từ *acillus licheniformis* và được phát triển bởi Novo Nordisk (Bagsvaerd, Đan Mạch). Alcalase là enzyme thương mại thuộc nhóm serine protease subtilisin A. Hoạt tính của Alcalase 2,4L là 2,4 AU/g, bị ức chế ở pH thấp hoặc nhiệt độ cao, điều kiện hoạt động tốt nhất của Alcalase là pH = 6,5 - 8,5; nhiệt độ 45 – 65°C. Alcalase là một trong những loại enzyme cho hiệu quả thủy phân protein cao, đã được nghiên cứu là một trong những enzyme tốt nhất được sử dụng để sản xuất dịch thủy phân protein từ cá có đầy đủ các chức năng và tính chất. Các chất thủy phân được xử lý bằng alcalase cũng có hàm lượng lipit thấp và tính chất chức năng tuyệt vời. Vì vậy, Alcalase còn là enzyme được ưa chuộng nhất và được sử dụng rộng rãi. Các enzyme có nguồn gốc từ vi khuẩn phù hợp hơn vì chúng có nhiều hoạt động xúc tác có sẵn cũng như độ ổn định về pH và nhiệt độ. Các nghiên cứu trước đây cho thấy alcalase là enzyme hiệu quả nhất trong số các enzyme proteolytic nghiên cứu protein thủy phân và có khả năng thủy phân cao nhất. Sự phục hồi protein cao nhất và hàm lượng lipit thấp nhất đã được báo cáo trong quá trình thủy phân với alcalase so với papain và neuTrase, sản phẩm thủy phân từ alcalase ít đắng hơn so với papain, đồng thời nó cũng là sự lựa chọn tốt nhất cho thủy phân protein dựa trên chi phí enzyme trên mỗi đơn vị hoạt động [20].

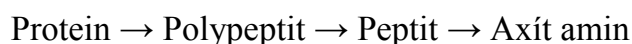
Enzyme này cũng dựa trên đặc trưng của nó cho khả năng không hút nước của các amino axit vào giai đoạn cuối, dẫn đến sản phẩm thủy phân không có vị đắng đồng thời sản phẩm có sự cân bằng về các axit amin thiết yếu [8].

Thủy phân từ alcalase và papain cũng thể hiện các tính chất chức năng tốt hơn và giá trị dinh dưỡng cao hơn, alcalase có hoạt tính cao hơn dẫn đến quá trình thủy

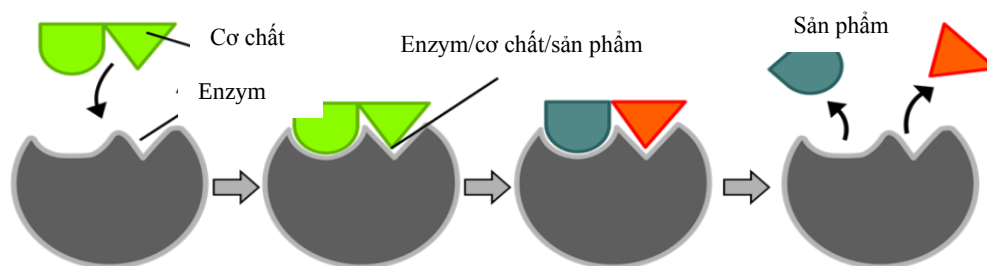
phân hiệu quả hơn. Hơn nữa, khi nghiên cứu quá trình thủy phân đầu cá hồi tươi bằng các enzyme Alcalase, Neutrase và Protamex. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng Alcalase là enzyme hiệu quả cao nhất so với Neutrase và Protamex.

1.4.3. Cơ chế quá trình thủy phân protein

Là một quá trình hóa học trong đó một phân tử protein bị phân cắt trong môi trường nước. Một phần của phân tử sau khi cắt sẽ tương tác với cation H^+ từ phân tử nước, phần khác sẽ liên kết với anion OH^- còn lại. Quá trình biến đổi protein trong nguyên liệu thành axit amin bằng tác nhân enzyme, theo thứ tự sau:



Nhờ tác nhân thủy phân, protein phân giải thành các mạch phân tử ngắn hơn và mạch ngắn dần cuối cùng thành axit amin. Enzyme có xúc tác và thủy phân cơ chất qua các giai đoạn.



Hình 1.3. Các giai đoạn xúc tác thủy phân bằng enzyme

Giai đoạn 1: enzyme kết hợp với cơ chất bằng liên kết yếu tạo thành phức hợp enzyme–cơ chất (ES) không bền, phản ứng diễn ra nhanh nhưng đòi hỏi năng lượng thấp các liên kết chủ yếu tạo thành giữa enzyme và cơ chất trong phức hợp ES là tương tác tĩnh điện, liên kết hydro, liên kết vanderwaals.

Giai đoạn 2: Là giai đoạn xảy ra với sự biến đổi của cơ chất dưới sự tác dụng của một số nhóm chức trong trung tâm hoạt động của enzyme và làm cho cơ chất từ dạng không hoạt động trở thành hoạt động, một số liên kết trong cơ chất bị kéo căng và mật độ electron trong cơ chất bị thay đổi.

Giai đoạn 3: giai đoạn tạo thành sản phẩm và giải phóng ra enzyme. Đây là giai đoạn cuối của quá trình phản ứng từ cơ chất hoạt động sẽ hình thành sản phẩm và giải phóng enzyme dưới dạng tự do ban đầu.

1.4.5. Enzyme lipase

Lipase là các enzyme đóng vai trò xúc tác sinh học cho phản ứng thủy phân triglyceride tạo thành các tri-glyceride, di-glyceride, monoglyceride, glycerol và các

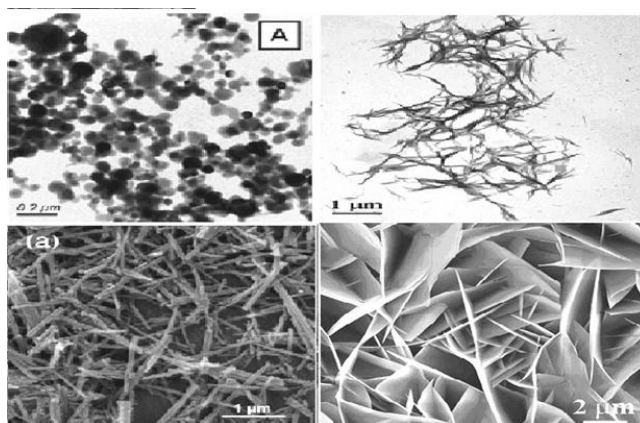
axit béo tự do. Đây là enzyme được ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp như: thực phẩm, hoá học, mỹ phẩm,... nhờ khả năng xúc tác thủy phân triglyceride hoạt động trên bề mặt phân cách pha dầu nước. Lipase có ở hầu hết mọi cơ thể sống, tế bào và có vai trò quan trọng trong quá trình Trao đổi chất, hấp thu và vận chuyển lipid.

Lipase có thể thu nhận từ nguồn vi khuẩn, nấm và tụy heo. Nhiệt độ tối thích của lipase là rất rộng, thường từ 30 – 60°C, tùy thuộc vào nguồn thu nhận lipase. Những vi sinh vật sống trong những môi trường khắc nghiệt tạo ra lipase có nhiệt độ tối thích cao trên 70°C (như lipase từ *Bacillus thermocatenulatus*) hoặc những lipase có hoạt tính cao ở nhiệt độ thấp (lipase từ vi khuẩn vùng cực). Lipase dùng làm chất xúc tác sinh học đều hoạt động ở pH trung tính hay kiềm, trong nhiều trường hợp có pH tối ưu là 9,0 (lipase từ *Pseudomonas* và *Bacillus*).

Khả năng ứng dụng của lipase dùng làm xúc tác sinh học đều dựa vào tính chọn lọc và đặc hiệu rất tinh tế của nó. Hầu hết lipase thông dụng có tính đặc hiệu vị trí nhóm hydroxyl 1, 3 (sn-1,3; tương ứng các alcohol bậc 1) trong mạch glycerol, mặc khác cũng có lipase có tính đặc hiệu cho vị trí sn-2 cho phép việc thủy phân hoàn toàn triglyceride thành axit béo và glycerol.

1.5. Hydroxyapatite (HA - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)

1.5.1. Tính chất hydroxyapatite



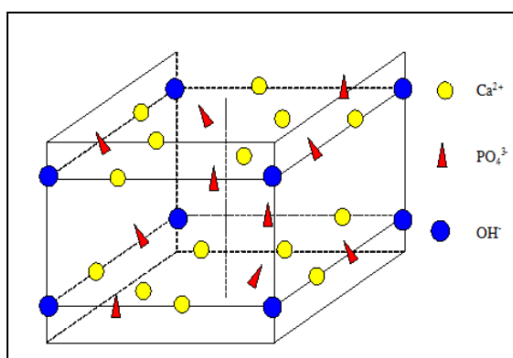
Hình 1.4. Tinh thể HA ở dạng hạt, sợi, que, tấm [155].

Canxi hydroxyapatite còn được gọi là hydroxyapatite (HA), công thức phân tử là $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ hoặc $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. HA là thành phần chính trong cơ thể người và động vật, trong xương khoảng 65 – 70% khối lượng và trong răng khoảng 99% [41,69,79]. HA có các tính chất quan trọng như: tạo liên kết trực tiếp với xương non dẫn đến sự hình thành xương nhanh mà không bị cơ thể đào thải; có hoạt tính và khả năng tương thích sinh học

cao với tế bào và mô, do vậy, hiện nay HA đang được nghiên cứu rộng rãi. Hơn nữa, HA là dạng canxi photphat nên dễ hấp thu nhất đối với cơ thể con người ở tỷ lệ phân tử Ca/P 1,67 đúng như tỷ lệ trong xương và răng người.

HA có có màu trắng, trắng ngà, vàng nhạt hoặc xanh lơ, tùy theo điều kiện hình thành, kích thước hạt và cấu trúc phân tử. HA nóng chảy ở nhiệt độ 1760°C; sôi ở 2850°C; độ tan trong nước: 0,7 g/l; khối lượng phân tử: 1004,60 g/mol; khối lượng riêng: 3,156 g/cm³; độ cứng theo thang Mohs bằng 5.

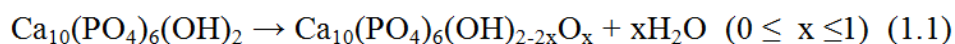
Tùy thuộc vào phương pháp điều chế mà tinh thể HA có thể ở dạng là hình cầu, hình sợi, hình que, hoặc hình tấm (Hình 1.4).



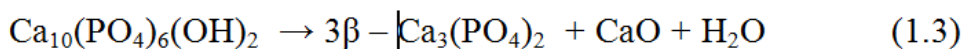
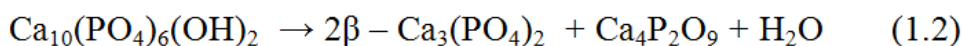
Hình 1.5. Ô mạng cơ sở của tinh thể HA [116].

Tinh thể HA gồm các ion Ca^{2+} , PO_4^{3-} và OH^- có cấu trúc ô mạng cơ sở của được sắp xếp như ở Hình 1.5. Hệ tinh thể lục phương của ô mạng HA, thuộc nhóm không gian $\text{P6}_3/\text{m}$ với các hằng số mạng $a = 0,9423 \text{ nm}$ và $c = 0,6875 \text{ nm}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ và $\gamma = 120^\circ$ [122]. Dạng cấu trúc này của HA thường là dạng HA tổng hợp và HA có trong thành phần xương và ngà răng [76,113].

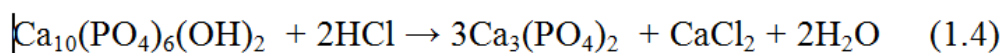
HA bị phân hủy chậm trong khoảng nhiệt độ 800 - 1200°C vì HA tương đối bền với nhiệt. HA bị phân hủy tạo thành oxy-hydroxyapatite theo phản ứng [130].



Khi nhiệt độ lớn hơn 1200°C, HA sẽ bị phân hủy thành $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ($\beta\text{-TCP}$) và $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ hoặc CaO [24,42,100].



HA không phản ứng với kiềm nhưng phản ứng với axit tạo thành các muối canxi và nước:



1.5.2. Ứng dụng của hydroxyapatite

Nghiên cứu tổng hợp HA đã được các nhà khoa học vật liệu quan tâm và thực hiện trong nhiều thập kỷ qua do HA có tính tương thích sinh học tuyệt vời với tế bào động vật [108,133], tương tác tốt với các polyme sinh học [52,89] và có khả năng tương thích với xương tốt [81,125]. HA có thể thúc đẩy sự phát triển của xương mới nhưng không gây ra viêm hay dị ứng, không gây độc tính cục bộ hoặc toàn thân [97,114,125]. Vật liệu gồm chứa HA khi cấy ghép vào cơ thể người, sẽ có một lớp mô mới hình thành trên bề mặt và liên kết vào xương của các mô cấy, tạo ra định hình vượt trội mô cấy đến các mô xung quanh [69,132]. Ngoài ra, HA có thể được sử dụng như một hợp chất mô hình để nghiên cứu quá trình khoáng hóa sinh học trong cơ thể con người [85,90].

Cho đến nay, có nhiều tác giả đang nghiên cứu sử dụng HA làm vật liệu cho các ứng dụng y sinh học khác nhau như: vật liệu nha khoa và lớp phủ hoạt tính sinh học lên miếng cấy ghép xương bằng kim loại [41,43], tác nhân điều trị bệnh loãng xương [56,64], tác nhân truyền dẫn thuốc [81,83], kỹ thuật mô [95], thay thế cho xương và các khuyết tật của răng [66,104], răng giả [150], cấy ghép xương [162]. Ngoài ra, HA còn được nghiên cứu ứng dụng trong các lĩnh vực khác như: vật liệu xử lý nước ô nhiễm kim loại nặng, thuốc nhuộm [70].

Mặt khác, HA kích thước nanomet đã được nghiên cứu là vật liệu có tính tương thích, hoạt tính sinh học và tái hấp thu sinh học cao hơn nhiều so với vật liệu HA kích thước micro [59,160]. Hạt nano HA khi ở kích thước nhỏ, có diện tích bề mặt cao và dễ dàng thẩm thấu nên có khả năng tương tác và hoạt tính sinh học tăng lên. Hơn nữa, khi sử dụng HA kích thước hạt ở mức nanomet cho phản ứng khử khoáng ở men răng và xương có thể bị ức chế nên ngăn ngừa bệnh sâu răng và loãng xương [159]. Vật liệu HA có kích thước nano cũng được sử dụng để thay thế và sửa chữa những khuyết tật của xương do bệnh lý hoặc tai nạn [38,139]. Các chế phẩm khác nhau chứa nano HA đã và đang được nghiên cứu và ứng dụng trong đời sống. HA ở dạng bột (thu nhận từ nguồn tự nhiên hoặc tổng hợp nhân tạo) cùng với một số khoáng chất khác đã được dùng trong bào chế thuốc chống loãng xương và thực phẩm chức năng bổ sung canxi, xử lý các khuyết tật của xương do chấn thương, bổ sung canxi trong nước giải khát. Ở dạng màng, một lớp HA mỏng, siêu mịn có thể tạo nên lớp men răng, các chi tiết nối xương và lớp phủ bề mặt cho xương nhân tạo. HA dạng khối xốp được ứng dụng để

sửa chữa các khuyết tật của xương và răng. Gần đây, còn phát hiện dạng HA xốp tự nhiên dựa trên khung xốp sẵn có của mai mực, san hô, vỏ trứng, đá vôi, da cá và xương cá có khả năng tương thích tốt với cơ thể con người khi được cấy ghép. Ngoài ra, HA cũng có khả năng vận chuyển và phân tán một số loại thuốc như insulin, vitamin, bảo vệ được dược phẩm tránh khỏi tương tác với tác nhân khác trên đường vận chuyển trong cơ thể, góp phần nâng cao hiệu quả sử dụng thuốc.

1.5.3. Phương pháp điều chế hydroxyapatite

Đã có rất nhiều phương pháp tổng hợp điều chế HA được phát triển. Nhìn chung, có thể phân loại thành 2 nhóm phương pháp:

- Phương pháp tổng hợp bằng hóa học từ các muối vô cơ có chứa ion Ca^{2+} và PO_4^{3-} , gồm: kết tủa, sol-gel, nhũ tương, siêu âm, thủy nhiệt; quá trình nhiệt độ cao gồm phân hủy và thiêu kết.

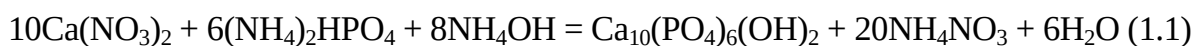
- Phương pháp thu nhận từ các nguồn tự nhiên.

1.5.3.1. Tổng hợp bằng phương pháp hóa học

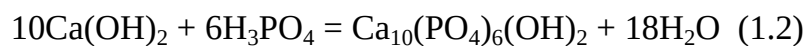
Bảng 1.6 trình bày các phương pháp hóa học được sử dụng để tổng hợp HA từ các muối vô cơ có chứa ion Ca^{2+} và PO_4^{3-} . Tùy theo phương pháp và điều kiện phản ứng khác nhau mà sản phẩm thu được có hình dạng, kích thước và tính đồng đều khác nhau. Trong đó, phương pháp kết tủa và sol-gel được đánh giá là đơn giản, hiệu quả, dễ kiểm soát tính chất của sản phẩm hơn cả.

Tuỳ thuộc vào mục đích ứng dụng, có thể lựa chọn phương pháp điều chế phù hợp. Để tổng hợp HA dạng bột, các phương pháp ướt thường được sử dụng, bởi ưu điểm của nó là có thể điều chỉnh được kích thước của hạt theo mong muốn. Trong đó, phương pháp kết tủa hóa học được sử dụng nhiều nhất, chiếm đến 25% trong tổng số các nghiên cứu từ năm 1999 đến 2011 [133]. Có nhiều quy trình khác nhau để kết tủa HA từ các ion Ca^{2+} và PO_4^{3-} , có thể phân ra thành hai cách chính:

Thứ nhất là kết tủa từ các muối chứa ion Ca^{2+} và PO_4^{3-} dễ tan trong nước, các muối hay được dùng là $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$... Phản ứng diễn ra theo phương trình (1.1) được coi là phương pháp cơ bản để tổng hợp HA [155]:



Thứ hai là kết tủa từ các hợp chất chứa Ca^{2+} ít tan hoặc không tan trong nước. Phản ứng xảy ra giữa $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaO , CaCO_3 ... với axit H_3PO_4 tạo thành HA trong môi trường kiềm [142]. Ví dụ:



Ưu nhược điểm của phương pháp

Các phương pháp tổng hợp HA bằng phương pháp hóa học có thể dễ dàng tạo ra sản phẩm HA có kích thước, hình dạng mong muốn và đặc biệt tỷ lệ Ca/P là 1,67 đúng với như trong xương người. Tuy nhiên phương pháp này rất phức tạp, mất thời gian, giá thành cao [42,46,86] và sản phẩm HA tạo ra có hoạt tính thấp [131,160].

Bảng 1.4. Các phương pháp hóa học tổng hợp HA

Phương pháp	Nguồn nguyên vật liệu tổng HA	Điều kiện tổng hợp	Đặc tính HA thu nhận	Tham chiếu
Kết tủa	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O 0,2 M; (NH ₄) ₂ HPO ₄ 0,12 M	- Tỷ lệ 1/1 khuấy ở nhiệt độ phòng, pH 10 - Sấy khô ở 120°C trong 8 giờ - Nung ở nhiệt độ 1000°C, trong 5 giờ	HA tổng hợp tương tự như sản phẩm HA đã được thương mại hóa của hãng Aldrich-Sigma. HA có hình thái cấu trúc xốp	[24]
	Ca(OH) ₂ 0,5M và H ₃ PO ₄ 0,3M	- pH được kiểm soát trong suốt phản ứng, Lượng axit thêm vào Ca(OH) ₂ với các tốc độ khác nhau - Nhiệt độ < 60°C - Dung dịch HA có nồng độ 2,5%, sấy phun để thu bột HA	Kích thước và đặc tính diện tích bề mặt của hạt nano HA rất nhạy với nhiệt độ phản ứng và cả tỷ lệ bổ sung chất phản ứng. Đây là tham số chính để xác định độ tinh khiết của tinh thể nano HA tổng hợp và cũng cho sự ổn định của huyền phù	[43]
Sol-gel	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O và triethyl phosphate Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O và C ₆ H ₅ PCl ₂	- Sấy ở 120°C và nung ở nhiệt độ 900°C, trong 5 giờ - Sấy ở 100°C và nung ở nhiệt độ 900-1100°C, trong 5 giờ	HA có tỷ lệ Ca/P 1,67 HA tạo thành các lớp dày, xốp	[37]
Điện hóa	Calcium acetate 0,4 M, acetic axit 0.78 M và Na ₃ PO ₄ 0,24 M, NaOH 0,8 M	500 cm ³ nước cất đun nóng đến 70°C và 50 cm ³ của 2 dung dịch được thêm vào. pH 9,1	Màng phim HA thu được sấy khô 100°C Tỷ lệ Ca/P là 1,63 ± 0,09	[116]
Thủy nhiệt	CaHPO ₄ .2H ₂ O/NaOH/Nước cất và ((CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N ⁺ (CH ₃) ₃ Br ⁻))	Điều kiện thủy nhiệt	HA cấu trúc nano hình thái đồng nhất, kích thước đồng đều, phân tán nano và phân bố kích thước tập trung	[105]

Phun sấy ở nhiệt độ cao	Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O và (NH ₄) ₂ HPO ₄ có nồng độ được cố định ở 0,2 M Nồng độ polyetylen glycol (PEG 400) từ 0,1 đến 0,6 M	Đầu phun lửa có năm ống đồng tâm. Tốc độ dòng của nhiên liệu, chất oxy hóa và khí mang mỗi lần 2,5, 35 và 30 lít/phút. Bột HA được nung ở nhiệt độ từ 400 - 1000°C trong 3 giờ.	Kích thước hạt HA nung ở 600 và 1000°C là 32 và 213 nm. Tỷ lệ Ca/P là 1,69	[49]
Sóng siêu âm	A 0.1 – 0.2 mol/dm ³ CaCl ₂ A 0.1 mol/dm ³ Na ₃ PO ₄	Dung dịch A được siêu. Tỷ lệ Ca/P cho vào 1.0, 1.50, 1.67 và 2.00, thời gian phản ứng 3 – 20 phút. Mẫu được lọc và sấy khô ở 70°C.	Tỷ lệ Ca/P được điều chỉnh từ 1 – 2, diện tích bề mặt hạt HA đạt 130 m ² /g.	[95]
Chiếu xạ vi sóng	50 ml hỗn hợp Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O 0,1M và EDTA 0,1 M trộn với 50 ml Na ₂ HPO ₄ 0,06M. Điều chỉnh pH dung dịch 9-13, khuấy hỗn hợp 10 phút.	Sử dụng lò vi sóng có công suất 700 W với một hệ thống hồi lưu và phản ứng trong 30 phút. Kết tủa được ly tâm, rửa và sấy khô trong chân không ở 70°C trong 2 giờ.	HA thu nhận có kích thước đều nhất với đường kính hạt trung bình khoảng 40 nm và chiều dài đạt khoảng 400 nm.	[110]

1.5.3.2. Tách chiết từ nguồn tự nhiên

Gần đây đã có nhiều nghiên cứu thu nhận HA từ các nguồn tự nhiên đặc biệt là từ xương cá đã được công bố. Các loại xương cá khác nhau đã được sử dụng làm nguồn để thu nhận HA như cá sông tại Brazil như *Seudoplatystomacorruscans*, *Paulicealutkeni* và *Pseudoplatystomafasciatum* [50], cá kiếm (*Xiphias*) và cá ngừ (*Thunnusthunnus*) [39], cá ngừ (*Thunnusobesus*) [76], cá rô phi [64,65].

Trong hầu hết các nghiên cứu này, phế liệu cá sau khi đưa về phòng thí nghiệm được đun sôi hoặc sử dụng enzyme thủy phân để loại bỏ tạp chất, phần thịt thừa, lipít sau đó đem sấy khô sẽ thu được xương cá thô [44,50,52,131,139]. Để gia tăng quá trình loại bỏ protein ở giai đoạn này, các tác giả còn sử dụng một số tác nhân như dung dịch NaOH 2M [150]. Tuy nhiên, các nghiên cứu này đều không đề xuất biện pháp thu nhận các sản phẩm protein và lipít ở công đoạn này. Điều đó vừa gây lãng phí tài nguyên, vừa tạo ra nguy cơ gây ô nhiễm môi trường hoặc sẽ tăng chi phí xử lý nước thải. Trong công đoạn tiếp theo, phương pháp chính được sử dụng đó là nung xương cá thô ở nhiệt độ cao khoảng 600 - 1200°C để thu nhận HA.

Các nghiên cứu cho thấy sản phẩm HA thu được có kích thước nanomet với độ xốp cao trong điều kiện nung thích hợp là 700 – 800°C, thời gian khoảng 2 – 4 giờ. Nếu nung ở nhiệt độ trên 950°C sẽ xảy ra quá trình phân hủy HA thành dạng β -Tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -TCP) [36,86]. Đặc biệt, các nghiên cứu cũng chỉ ra trong sản phẩm HA thu được đều có chứa một lượng vết các kim loại. Thành phần và hàm lượng của các kim loại này tùy thuộc theo nguồn nguyên liệu khác nhau. Một số nghiên cứu đã thử nghiệm và đánh giá độ tương thích sinh học khi thử nghiệm trong dịch giả thể người [40,41,139]. Sự phát triển của tế bào cho thấy khả năng ứng dụng cao của HA trong kỹ thuật chỉnh hình xương.

Mặc dù các nghiên cứu thu nhận và đánh giá tính chất của HA từ các loại xương cá khác nhau được tiến hành ở khá nhiều phòng thí nghiệm tại các nước tiên tiến trên thế giới nhưng vẫn chưa được áp dụng rộng rãi trong thực tế sản xuất. HA dùng trong công nghiệp và các ứng dụng hiện nay chủ yếu vẫn được sản xuất bằng phương pháp hóa học (dựa trên phản ứng của muối chứa Ca^{2+} và muối chứa PO_4^{3-}). Phương pháp tổng hợp hóa học thường tiềm ẩn nguy cơ tồn tại chất chưa phản ứng và dung môi, do đó hạn chế hiệu quả ứng dụng, đặc biệt trong y, dược và thực phẩm. Vì vậy, việc hoàn thiện quy trình công nghệ thu nhận HA từ các nguồn tự nhiên theo

hướng thân thiện với môi trường và hướng đến ứng dụng trong sản xuất thực tiễn vẫn là bài toán đặt ra cho các nhà khoa học trên thế giới.

❖ **Ưu nhược điểm của phương pháp**

Phương pháp thu nhận HA từ các nguồn là phế liệu cá rất phong phú, đa dạng, rẻ tiền. Sản phẩm HA thu nhận an toàn nên có thể ứng dụng cung cấp nguồn khoáng bổ sung vào thực phẩm cho con người. Tuy nhiên sản phẩm HA có tỷ lệ hàm lượng nguyên tố Ca/P khoảng 1,80 cao hơn so với trong xương người.

❖ **Các yếu tố ảnh hưởng khi thu nhận HA từ nguồn tự nhiên**

- **Nguyên liệu:**

Chất lượng nguyên liệu có ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng và hiệu suất thu hồi sản phẩm HA. Thành phần hóa học của nguyên liệu, trong đó thành phần tro khoáng trong nguyên liệu quyết định đến quá trình thu nhận HA. Ngoài ra các thành phần hữu cơ như protein, chất màu cũng ảnh hưởng đến quá thu nhận HA.

Nguồn nguyên liệu sử dụng để thu nhận HA là các phế liệu của quá trình chế biến, chủ yếu là xương cá: cá chẽm, cá điêu hồng [7], cá kiểm (*Xiphias*) [42], cá ngừ (*Thunnusthunnus*) [79], cá rô phi [64,65] và xương các loại động vật như xương bò [11].

- **Nhiệt độ:**

Nhiệt độ nung có ảnh hưởng lớn đến quá trình nung đốt cháy, loại bỏ các chất hữu cơ để thu nhận hydroxyapatite. Nhiệt độ thấp sẽ không loại bỏ được hoàn toàn các hợp chất hữu cơ. Tuy nhiên, nhiệt độ quá cao sẽ dẫn đến phân hủy HA. Nhiệt độ nung từ 600 – 1200°C [86,129] tùy theo từng loại nguyên liệu sử dụng khác nhau.

- **Tốc độ gia nhiệt:**

Tốc độ gia nhiệt có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả quá trình nung đốt cháy, loại bỏ các chất hữu cơ để thu nhận hydroxyapatite. Tốc độ gia nhiệt nhỏ, nhiệt độ nung tăng chậm sẽ làm kéo dài thời gian nung, chưa loại bỏ được hoàn toàn các hợp chất hữu cơ nằm sâu bên trong khối xương, ngoài ra còn làm tăng chi phí năng lượng. Tuy nhiên, tốc độ nâng nhiệt quá lớn sẽ dẫn đến loại bỏ, đốt cháy được phần phi HA trên bề mặt mà chưa loại bỏ được các hợp chất hữu cơ sâu bên trong xương cá, ngoài ra tốc độ gia nhiệt lớn còn làm đốt cháy luôn cả phần HA bên ngoài, không an toàn cho thiết bị và con người.

- Thời gian gia nhiệt:

Thời gian nung có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả quá trình nung đốt cháy, loại bỏ các chất hữu cơ để thu nhận hydroxyapatite. Thời gian ngắn thì chưa loại bỏ được hoàn toàn các hợp chất hữu cơ nằm sâu bên trong khối xương. Tuy nhiên, thời gian nung quá dài sẽ dẫn đến phân hủy HA và tăng chi phí năng lượng khi sản xuất. Thời gian gia nhiệt nung tùy theo từng loại nguyên liệu sử dụng khác nhau, có thể từ 1 – 12 giờ [42,50].

Bảng 1.5. HA thu nhận từ phế liệu cá và ứng dụng

Nguyên liệu	Điều kiện thu nhận	Đặc tính HA	Ứng dụng	Tham khảo
Xương cá chêm (<i>Lates calcarifer</i>), cá diêu hồng (<i>Oreochromis</i> sp.) và cá rô phi (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Xử lý phế liệu cá với enzyme Alcalase ở 70°C trong 10 giờ và nung xương thô ở 700°C trong 60 phút	HA có độ kết tinh và độ xốp cao với kích thước hạt trong khoảng 30 – 50 nm	Sản phẩm HA có thể ứng dụng trong thực phẩm và y dược.	[7]
Xương cá cờ kiếm và cá ngừ	Nung xương cá ở 600 - 950°C trong 12 giờ	Sản phẩm HA có dạng hình thanh với kích thước nanomet. HA dạng-B khi nung ở 600°C và có dạng β -Tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -TCP) khi nung ở 950°C. Tỷ lệ Ca/P 1,87		[42]
Xương của một số cá nước ngọt ở Sông Braxin (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> , <i>Paulicea lutkeni</i>) và <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>)	Ban đầu, xương cá được nung ở 900°C trong khoảng 4 - 12 giờ. Sau đó, nghiền bằng máy nghiền bi 2 – 4 giờ.	HA thu được có kích 22-80 nm.		[50]
Vây và xương cá rô phi	Nung xương cá ở 800°C trong 3 giờ.	HA tỷ lệ Ca/P 1,6	Nguồn sản xuất canxi và photpho ứng dụng trong y tế.	[65]
Xương cá ngừ	Tổng hợp HA từ xương cá ngừ nung và HA thương mại bằng phương pháp thủy nhiệt với dung dịch urê 0,1 -1,0 M ở 160°C trong 3 giờ	HA có hình dạng que (khi sử dụng ure với nồng độ 0,1 M) và dạng bột biển (khi sử dụng ure với nồng độ 1,0 M).	Sản phẩm HA được thử nghiệm làm chất hấp phụ Sr^{2+} có trong dung dịch nồng độ 0 – 50 mM tại nhiệt độ 25°C trong thời gian 72 giờ.	[79]
Phế liệu cá biển Nhật	Xương cá được nung ở nhiệt độ gần 1300°C	HA thu được có dạng tinh thể, cấu trúc lỗ xốp		[129]
Vây cá nước ngọt (<i>Probarbus jullieni</i>)	Vây cá được xử lý trong dung dịch kiềm ở nhiệt độ phòng	HA có kích cỡ từ 15 – 100 nm, Tỷ lệ Ca/P 2,01	Ứng dụng trong kỹ thuật mô xương.	[131]

1.5.4. Các nghiên cứu trong nước liên quan đến hydroxyapatite

Ở Việt Nam, việc nghiên cứu, sử dụng vật liệu HA cho mục đích y sinh học chưa được quan tâm nhiều. Mới chỉ có một số rất ít các nghiên cứu về thu nhận HA từ các nguồn tự nhiên được công bố. Trong đó, Phòng Hoá Vô cơ (Viện Hoá học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam) đã thực hiện một số đề tài nghiên cứu tổng hợp HA bột, HA xộp từ các hợp chất hóa học và tách từ động vật [3,4,10,11,14]. Trong khi, Việt Nam là một trong những nước sản xuất và xuất khẩu cá cũng như các sản phẩm về cá đứng hàng đầu thế giới. Điều đó cũng có nghĩa là một lượng lớn da và xương cá chưa được dùng để chế tạo HA và các sản phẩm có giá trị gia tăng từ nó. Nghiên cứu tách HA từ xương bò và khảo sát một số đặc tính của HA thu nhận đã được công bố [11]. Nhóm tác giả đã sử dụng 3 cách khác nhau để tiền xử lý xương bò phế liệu bằng phương pháp nhiệt gồm: nấu chín ở điều kiện bình thường; nấu chín trong điều kiện có chất phụ gia; nấu chín trong nồi áp suất. Kết quả cho thấy nhiệt độ có ảnh hưởng đến kích thước hạt và độ tinh thể của sản phẩm HA, đặc biệt là nung mẫu ở nhiệt độ cao 700°C. Chất phụ gia có ảnh hưởng đến độ đơn pha của sản phẩm, giúp cho quá trình tách HA diễn ra nhanh, giảm thời gian ninh mẫu xuống 2 lần so với ninh mẫu ở điều kiện áp suất thường, không có phụ gia. Bên cạnh sản phẩm HA còn lẫn một số ít tạp chất khác như CaHPO_4 , CaCO_3 . Ngoài ra, áp suất là yếu tố có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình tạo sản phẩm, giúp rút ngắn được thời gian nấu chín mẫu, quá trình tinh thể hóa diễn ra nhanh HA thu được là đơn pha, độ tinh thể cao. Nghiên cứu đã xác định được điều kiện thuận lợi cho quá trình tách bột HA từ xương động vật quy mô phòng thí nghiệm như sau: Mẫu xương bò lấy từ thân xương, nấu chín đến nhừ ở điều kiện trong nồi áp suất, không có phụ gia, đem nung ở 700°C trong 2 giờ. Sản phẩm HA thu được có kích thước hạt trung bình dưới 500 nm, giản đồ XRD cho thấy sản phẩm là đơn pha HA với độ tinh thể 97,4%.

Gần đây, trong các nghiên cứu tại phòng thí nghiệm [7,14], Hòa và cộng sự đã bước đầu xây dựng quy trình thu nhận HA và dịch thủy phân protein từ phế liệu cá chẻm, cá điêu hồng và cá rô phi. Kết quả về đánh giá thành phần phế liệu cá cho thấy, hàm lượng protein đối với tất cả các loại phế liệu cá khảo sát trong khoảng 30 – 35 wt.%. Hàm lượng khoáng chiếm khoảng 10 – 15 wt.%. Hàm lượng lipid có sự khác nhau khá lớn giữa cá chẻm (10,4 wt.%), cá điêu hồng (8,9 wt.%) so với cá rô phi (2,4wt.%). Từ kết quả phân tích ban đầu ở trên cho thấy, nếu lượng protein và lipid

không được thu nhận mà thải trực tiếp ra môi trường thì không những lãng phí mà còn gây ô nhiễm môi trường rất trầm trọng. Nghiên cứu đã đề xuất 2 phương pháp tiền xử lý để tách riêng phần hữu cơ và vô cơ (xương cá thô) từ phế liệu cá gồm phương pháp đun sôi bằng nước và phương pháp thủy phân protein sử dụng enzyme. Kết quả cho thấy, phương pháp xử lý bằng enzyme alcalase cho thấy hiệu quả tách cao hơn khoảng 2 - 5% so với phương pháp đun sôi. Nhiệt độ nung xương cá thô có ảnh hưởng lớn đến hình dạng và kích thước của sản phẩm HA. Cụ thể, HA có hình que và có sự kết dính khi nung tại 500°C. Tại nhiệt độ 600 – 700°C, HA thu được có hình tròn, kích thước nhỏ (<100 nm), khá đồng đều. Khi nung ở trên 800°C, HA thu được có kích thước lớn hơn (>100 nm) và có xu hướng dính với nhau. Sản phẩm HA thu được có độ tinh khiết cao, độ xốp lớn nên thích hợp cho các ứng dụng làm giá thể, chất mang, chất hấp thụ trong y dược và xử lý ô nhiễm môi trường. Từ đó, nhóm tác giả đề xuất: Quy trình chính để thu hồi HA từ phế liệu cá bằng phương pháp tiền xử lý với enzyme alcalase và nung ở 700°C trong 2 giờ cho hiệu suất thu hồi cao, HA thu được có độ tinh khiết cao, hiệu quả về mặt môi trường và tính khả thi, thuận lợi khi triển khai ở quy mô lớn.

Nhìn chung, các quy trình này chỉ mới chỉ là các nghiên cứu bước đầu và tập trung ở một số ít loại xương cá hiện có tại Việt Nam, chưa thể phát triển thành quy mô công nghiệp. Do vậy, việc nghiên cứu một công nghệ đầy đủ và có hệ thống theo hướng thân thiện với môi trường cũng như tính đến hiệu quả kinh tế là điều rất cần thiết để hướng đến có thể sản xuất HA tinh khiết sử dụng cho các ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và y dược.

1.6. Tổng quan thức ăn cho tôm hậu ấu trùng

1.6.1. Thức ăn cho tôm

Thức ăn viên cho tôm được nhập khẩu vào VN từ năm 1993 và được sử dụng rộng rãi từ năm 1996, đến nay nhu cầu sử dụng hàng năm vào khoảng 200.000 - 250.000 tấn. Hầu hết thức ăn viên đều được sản xuất trong nước như: Tomboy, CP, Grobest... còn lại một lượng nhỏ là nhập khẩu chiếm 4 - 5%. Đến nay đã thống kê có khoảng 23 nhà máy sản xuất thức ăn viên công nghiệp; trong đó đa số là các nhà máy có vốn đầu tư của nước ngoài chiếm thị phần lớn; công suất của các nhà máy có thể đạt 20.000 - 30.000 tấn/năm, cũng có nhà máy có công suất đến 60.000 tấn/năm và các nhà máy này đều có cả dây chuyền sản xuất thức ăn cho tôm. Đối với các nhà máy có

vốn đầu tư trong nước, công suất chỉ khoảng 10.000 - 15.000 tấn/năm. Tổng công suất của các nhà máy khoảng 300.000 - 400.000 tấn năm, vượt nhu cầu thức ăn hàng năm.

Tuy nhiên hàng năm Việt Nam vẫn phải nhập khẩu một số lượng lớn bột cá để sản xuất thức ăn cho nuôi trồng thủy sản, trong đó nhu cầu thức ăn cho tôm rất lớn. Theo số liệu thống kê, lượng bột cá nhập khẩu của Việt Nam trong tháng 9/2019 đạt 8,5 nghìn tấn, trị giá 11 triệu USD, giảm 47% về lượng và giảm 47,3% về trị giá so với tháng trước, giảm 57,8% về lượng và 62,2% về trị giá so với cùng kỳ năm 2018. Tính chung 9 tháng đầu năm 2019, lượng nhập khẩu bột cá đạt 122,1 nghìn tấn, trị giá 157,9 triệu USD, tăng 4,3% về lượng nhưng giảm 8,2% về trị giá so với cùng kỳ năm 2018.

Bảng 1.6. Sản lượng bột cá nhập khẩu của Việt Nam từ 2008-2016 [87]

Đơn vị tính: 1000 tấn

Năm	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Việt Nam	46	56	70	195	245	275	310	285	88

1.6.2. Yêu cầu thức ăn tôm [22]

Tôm thẻ chân trắng là loại ăn tạp nhưng chúng rất thích thức ăn có nguồn gốc từ động vật. Hiện nay có ba loại thức ăn chính dành cho tôm thẻ chân trắng:

- Thức ăn công nghiệp được cung cấp bởi các nhà máy sản xuất thức ăn cho tôm.
- Thức ăn tự nhiên bao gồm: các động thực vật phù du, các mùn bã hữu cơ ...
- Thức ăn tự chế được sản xuất từ nguồn nguyên liệu sẵn có như ốc, cá tạp, các phế phụ phẩm trong nông nghiệp

Tôm thẻ chân trắng khi mới thả ăn hoàn toàn bằng thức ăn công nghiệp, đảm bảo lượng dinh dưỡng, môi trường nước ao nuôi. Ngoài ra, cần bổ sung khoáng, men tiêu hóa, vitamin C, E, dầu mực.

Thức ăn công nghiệp cho tôm thẻ chân trắng là thức ăn dạng chìm, gồm 6 loại sử dụng cho các giai đoạn phát triển của tôm thẻ chân trắng tương ứng như sau:

- Loại 0,1 - 1 g/con sử dụng thức ăn cỡ nhỏ hơn 0,6 mm; Loại số 1.
- Loại 1 - 3 g/con, cỡ thức ăn tối đa 0,8 mm; Loại số 2.
- Loại 3 - 8 g/con, thức ăn nhỏ hơn 1,2 mm; Loại số 3.
- Loại 8 - 12 g/con, kích cỡ tối đa 1,8 mm; Loại số 4.
- Loại 12 - 20 g/con, kích cỡ thức ăn tối đa 2,2 mm; Loại số 5.
- Loại > 20 g/con, kích cỡ thức ăn tối đa 2,5 mm. Loại số 6.

Bảng 1.7. Chỉ tiêu lý, hóa của thức ăn tôm [22]

Chỉ tiêu	Loại thức ăn					
	Số 1	Số 2	Số 3	Số 4	Số 5	Số 6
1. Kích cỡ						
Đường kính viên (hoặc mảnh), mm, không lớn hơn	0,6	0,8	1,2	1,8	2,2	2,5
- Tỷ lệ chiều dài so với đường kính viên, lần, trong khoảng	1,5 - 2					
2. Độ ẩm, %, không lớn hơn	11	11	11	11	11	11
3. Hàm lượng protein thô, %, không nhỏ hơn	38	36	34	34	33	32
4. Hàm lượng lipít thô, %, trong khoảng	5 - 7	5 - 7	5 - 7	4 - 6	4 - 6	4 - 6
5. Hàm lượng xơ thô, %, không lớn hơn	3	4	4	4	4	4
6. Tỷ lệ vụn nát, %, không lớn hơn	1	1	1	1	1	1
7. Độ bền trong nước (thời gian quan sát kể từ khi cho thức ăn vào nước), giờ, trong khoảng	1 - 2					
8. Hàm lượng lyzin, %, không nhỏ hơn	1,8	1,8	1,7	1,6	1,5	1,5
9. Hàm lượng methionin, %, không nhỏ hơn	0,8	0,8	0,7	0,7	0,6	0,6
10. Hàm lượng tro tổng số, %, không lớn hơn	14	14	15	15	16	16
11. Cát sạn (tro không hòa tan trong HCl 10%), %, không lớn hơn	1,0	1,2	1,3	1,5	1,5	1,7
12. Hàm lượng canxi, %, không lớn hơn	2,3					
13. Tỷ lệ canxi/ phospho, lần, trong khoảng	1,0 - 1,5					
14. Hàm lượng natri clorua, % , không lớn hơn	2,0					

Chất lượng thức ăn tôm được đánh giá qua các chỉ tiêu:

- Chất lượng cảm quan: có màu từ vàng nâu đến nâu; mùi đặc trưng của nguyên liệu phối chế, không có mùi mốc và mùi lạ khác. Thức ăn không bị vón cục và có độ đồng đều cao. Tỷ lệ chiều dài so với đường kính viên khoảng 1,5 - 2 lần. Thức ăn viên có hình trụ, bề mặt mịn, kích thước đáp ứng được đối với kích cỡ miệng tôm. Với thức ăn dạng mảnh, yêu cầu các hạt đều nhau, bề mặt mịn, kích cỡ vừa với cỡ miệng. Ngoài ra, thức ăn đạt chất lượng có tỷ lệ vụn, nát nhỏ hơn 1%.

1.6.3. Thành phần dinh dưỡng và bổ sung dinh dưỡng vào thức ăn tôm

Trong thức ăn tôm, các thành phần dinh dưỡng bao gồm: protein, lipid, khoáng, carbohydrat, vitamin. Cung cấp đầy đủ dinh sẽ giúp cho tôm tăng trưởng nhanh, hiệu quả nuôi tôm cao. Tuy nhiên trong phạm vi của luận án, chỉ trình bày 03 thành phần quan trọng trong thức ăn bổ sung cho tôm thẻ chân trắng là protein, axit amin và khoáng.

1.6.3.1. Protein

Tôm sử dụng protein là nguồn năng lượng chính, nguồn protein bắt buộc phải có trong thức ăn tôm là bột cá [51] và cần ít nhất 1,8–3,8 g protein/kg tôm/ngày để duy trì hoạt động sống. Các sản phẩm bột cá, bột tôm, bột mực có hàm lượng protein cao và chứa đầy đủ các axit amin cần thiết, chứa nhiều axit béo không no thiết yếu và phù hợp với hệ tiêu hóa của tôm nuôi.

Nhu cầu protein của tôm thẻ chân trắng khoảng 30 - 35% trong giai đoạn tôm giống đến cỡ tiền trưởng thành [101]. Tôm lớn nhanh nếu được cung cấp 24g protein/kg tôm/ngày ở giai đoạn còn nhỏ [101]. Thực nghiệm nuôi tôm ở mật độ 60 con/m² tại Indonesia cho thấy, hàm lượng protein trong thức ăn từ 30–32% có thể duy trì tốt tốc độ tăng trưởng của tôm. Thức ăn có hàm lượng protein cao hơn sẽ phù hợp cho tôm được nuôi trong tháng đầu tiên.

1.6.3.2. Amino axit

Protein trong khẩu phần ăn của tôm là nguồn cung cấp axit amin, đóng vai trò như các khối xây dựng đối với protein của thịt tôm. Có 20 loại axit amin khác nhau, nhưng chỉ 10 trong số này được coi là cần thiết và mỗi axit amin phải có một lượng tối thiểu trong chế độ ăn của tôm. Phần còn lại có thể được tôm tổng hợp từ 10 loại axit amin thiết yếu [106,158].

Các nhu cầu về axit amin đối với tôm chưa được xác định rõ ràng vì tôm không sử dụng hiệu quả các axit amin từ chế độ ăn tinh khiết được sử dụng để nghiên cứu

axit amin các yêu cầu. Thành phần axit amin trong thức ăn cho tôm phần lớn dựa trên thành phần axit amin của cơ thịt tôm [27].

Thức ăn chăn nuôi phối trộn và kết hợp các nguồn khác nhau protein, mỗi loại có thành phần axit amin khác nhau và chế độ ăn cho tôm đáp phải ứng tối thiểu yêu cầu cho tất cả 10 axit amin thiết yếu. Người lập công thức cũng phải tính đến khả năng tiêu hóa của từng thành phần thức ăn và hàm lượng của các axit amin trong thức ăn. Bột cá được coi là nguồn protein chất lượng cao nhất vì thành phần axit amin của bột cá gần giống với thành phần axit amin của tôm [158]. Trong thức ăn tôm thương mại, nhuyễn thể và bột *Artemia* tốt hơn bột cá, nhưng chúng đắt hơn. Tuy nhiên, chúng được sử dụng trong chế độ ăn của tôm ấu trùng.

Bảng 1.8. Thành phần axit amin trong thức ăn tôm có hàm lượng protein 35% [27].

Axit amin	Tỷ lệ axit amin trong thức ăn tôm (%)	Hàm lượng axit amin so với protein (%)
Arginine	2,09	5,8
Histidine	0,76	2,1
Isoleucine	1,26	3,5
Leucine	1,94	5,4
Lysine	1,91	5,3
Methionine	0,86	2,4
Phenylalanine	1,44	4,0
Threonine	1,30	3,6
Tryptophan	0,29	0,8

1.6.3.3. Chất khoáng

Tôm có nhu cầu khoáng đa lượng (chủ yếu là canxi, photpho, đồng, kẽm) và khoáng vi lượng (đồng, sắt, mangan, niken), trong đó nhu cầu khoáng đa lượng cao hơn một số động vật thủy sản nuôi khác do tôm thường xuyên thực hiện quá trình lột xác để tăng trưởng. Khoáng canxi và photpho rất cần thiết cho quá trình hình thành vỏ kitin. Ngoài ra, canxi là thành phần quan trọng tham gia vào quá trình đông máu, các chức năng của cơ, sự truyền dẫn thần kinh, điều hòa áp suất thẩm thấu. Khoáng photpho là chất cấu thành hợp chất cao năng Adenosine triphosphate (ATP), Phospholipit, ADN, ARN và một số coenzyme. Photpho đóng vai trò trung tâm trong quá trình chuyển hóa năng lượng và hoạt động, quá trình biến dưỡng các chất dinh dưỡng trong

cơ thể. Vì vậy photpho là yếu tố tham gia vào quá trình Trao đổi năng lượng, điều khiển sinh sản, sinh trưởng, duy trì ổn định pH trong cơ thể động vật thủy sản...

Trong thực tế, trong môi trường nước nuôi tôm có chứa một số khoáng nên tôm có thể hấp thu trực tiếp khoáng qua mang, do vậy nhu cầu khoáng cho tôm phụ thuộc vào khoáng trong môi trường sống của tôm. Vì vậy, mức canxi bổ sung tối đa là 2,3%, photpho 1 - 2%, natriclorua 1 - 2% vào trong thức ăn tôm. Kẽm là thành phần thiết yếu của nhiều loại enzyme quan trọng cho quá trình Trao đổi chất của tôm; lượng kẽm bổ sung ở mức 15 - 18mg/kg thức ăn. Đồng là thành phần cấu tạo nên tế bào máu của tôm, nếu ở mức cao thì đồng có thể gây độc cho tôm. Khi thức ăn bổ sung thêm đồng

Chương 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Phế liệu cá Tra

Phế liệu cá Tra (*Pangasius hypophthalmus*) được thu nhận từ nguyên liệu cá Tra sử dụng có kích cỡ 1,2 – 1,5 kg/con (*Đối với nghiên cứu về ảnh hưởng kích cỡ nguyên liệu sử dụng phế liệu từ cá Tra có kích cỡ từ 0,5 – 2,0 kg/con*) trên dây chuyền công nghệ chế biến cá Tra phi-lê đông lạnh. Phế liệu cá Tra tươi (gồm đầu cá, nội tạng, vây, xương, đuôi) được bao gói trong túi PE và ướp đá lạnh trong thùng xốp, vận chuyển về phòng thí nghiệm. Mẫu được xay nhỏ bằng máy xay trục vít, kích thước lỗ sàng 1cm, trộn đều và đồng nhất mẫu. Cân mỗi mẫu 100g cho vào túi PE, buộc kín miệng túi và cấp đông bằng tủ đông tiếp xúc đến nhiệt độ tại tâm mẫu đạt -18°C , bảo quản đông mẫu trong tủ đông $-18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ và sử dụng dần cho quá trình thí nghiệm.



Hình 2.1. Phế liệu cá Tra sau phi-lê.

❖ Phương pháp thu gom mẫu

- Cá Tra (*Pangasius hypophthalmus*) nguyên liệu được thu hoạch từ các Trang trại nuôi của Công ty Nam Việt tại huyện Châu Phú tỉnh An Giang. Phế liệu cá Tra được thu gom vào lúc 9 giờ trong ngày từ dây chuyền chế biến cá Tra phi-lê đông lạnh của Công ty Chế biến Thủy sản Nam Việt, tỉnh An Giang - 19D Trần Hưng Đạo, Phường Mỹ Quý, Tp. Long Xuyên, tỉnh An Giang; nguyên liệu cá Tra sử dụng lấy mẫu thí nghiệm có kích cỡ 1,2 – 1,5 kg/con (*Đối với nghiên cứu về ảnh hưởng kích cỡ nguyên liệu sử dụng phế liệu từ cá Tra có kích cỡ từ 0,5 – 2,0 kg/con*). Mỗi đợt lấy mẫu được tiến hành thu gom 20 kg phế liệu/lần sử dụng cho thí nghiệm.

- Phế liệu cá (gồm đầu cá, nội tạng, vây, xương, đuôi) ngay sau công đoạn phi-lê được thu gom, cấp đông nhanh bằng tủ đông tiếp xúc đến nhiệt độ tại tâm sản phẩm đạt

-18°C, sau đó cho vào thùng cách nhiệt, bảo quản bằng đá khô và vận chuyển về Phòng thí nghiệm, Trường Đại học Nha Trang.

❖ Phương pháp xử lý mẫu

Tại phòng thí nghiệm, phế liệu cá được xử lý theo các bước:

- Mẫu phế liệu được làm tan băng gián tiếp trong môi trường nước lưu động.
- Xay nhỏ phế liệu qua máy có đường kính lỗ sàng 1 cm, sau đó đồng nhất mẫu bằng thiết bị.
- Mẫu phế liệu cá Tra được phân chia thành các đơn vị mẫu có khối lượng 100g, cho vào các túi PE, cột miệng túi và tiến hành cấp đông đến nhiệt độ tại tâm mẫu đạt -18°C, bảo quản đông mẫu trong tủ đông -18°C ± 2°C và sử dụng dần cho quá trình thí nghiệm.
- Đối với mẫu phân tích các chỉ tiêu trong phế liệu được chọn ngẫu nhiên 1 đơn vị mẫu thí nghiệm, tiến hành làm tan băng gián tiếp trong môi trường nước lưu động, đồng nhất mẫu bằng thiết bị và thực hiện lấy mẫu phân tích các chỉ tiêu.

2.1.2. Enzyme

Alcalase được mua của Công ty Novozyme (Đan Mạch), chi nhánh Việt Nam. Alcalase là một endopeptidase có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis* có hoạt lực là 2,4 AU (Anson Units)/g, điều kiện hoạt động thích hợp là 55 – 70°C, pH 6,5 – 8,5. Hoạt lực của alcalase thay đổi theo thời gian, do vậy trước khi sử dụng cho thí nghiệm, enzyme alcalase được kiểm tra lại hoạt lực.

Lipase được mua của Hãng Sigma-Aldrich (Đức). Enzyme này được tách chiết từ tụy lợn, có hoạt lực là 100 – 400 IU/mg protein, điều kiện hoạt động thích hợp là 55 – 60°C, pH 3,8 – 5,5. Lipase là xúc tác đặc hiệu cắt liên kết ester giữa các axit béo và glycerol của cơ chất triacylglycerol.

2.1.3. Tôm thẻ chân trắng

Tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) là một trong hai đối tượng tôm nuôi chủ lực của ngành tôm nuôi Việt Nam, hiện nay đối tượng tôm thẻ chân trắng được nuôi trồng phổ biến, chiếm tỷ trọng lớn ở các vùng nuôi tôm lớn của cả nước như: khu vực Miền Trung, vùng Đồng bằng Sông Cửu Long. Người nuôi tôm thẻ chân trắng, chọn tôm Post 12 (tôm 12 ngày tuổi) để thả nuôi tôm – đây là cỡ giống được người nuôi tôm Việt Nam sử dụng nhiều nhất. Hơn nữa, Post 12 là con giống đã trải qua giai đoạn biến thái hoàn chỉnh (gồm các giai đoạn nauplii, zoea và mysis) và thành hậu ấu trùng/ tôm post 12 ngày tuổi. Tại thời điểm này, con

giống đã hoàn thành quá trình phát triển hình thái và sinh lý của nó, quá trình ương ấu trùng chuẩn sẽ được hoàn tất.

Tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) 12 ngày tuổi (post 12) được mua chọn lọc tại Công ty Giống Thủy sản – Ninh Hòa, Khánh Hòa, tôm khỏe mạnh, hướng quang, tôm được kiểm tra không có các bệnh đốm trắng, bệnh EMS/AHPND, bệnh hoại tử cơ quan tạo máu và cơ quan lập biểu mô. Tôm thẻ chân trắng post 12 sau khi mua về được nuôi chăm sóc trong bể, thể tích mỗi bể $0,25\text{m}^3/250$ con, siphon – thay ước với 5% lượng nước hàng ngày, nước có độ mặn 3‰; nước thải ra được dẫn về hệ thống xử lý nước để xử lý thành nước đạt tiêu chuẩn trước khi thải ra môi trường. Tôm được cho ăn 4 lần/ngày với ăn 2 lần Artemia mới nở $4\text{ g/m}^3/\text{lần}$, 2 lần thức ăn thương mại Frippak-150 từ 2-6 $\text{g/m}^3/\text{lần}$ [16]. Tôm được chăm sóc tại Trung tâm nghiên cứu giống và dịch bệnh, Trường Đại học Nha Trang trong 8 ngày đạt chiều dài $39,45 \pm 0,42\text{ mm}$, khối lượng $0,29 \pm 0,02\text{g}$. Tôm có màu sắc tươi sáng, vỏ mỏng, đầu thân cân đối và đuôi xòe ra. Tất cả tôm linh hoạt, khỏe mạnh, phân bố đều trong bể nuôi, ruột tôm chứa đầy thức ăn.



Hình 2.2. Tôm thẻ chân trắng 20 ngày tuổi.

2.1.4. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất sử dụng trong quá trình nghiên cứu

2.1.4.1. Dụng cụ và thiết bị

Bảng 2.1. Dụng cụ và thiết bị sử dụng trong quá trình nghiên cứu.

STT	Tên thiết bị	Thông số kỹ thuật	Xuất xứ
1	Cân kỹ thuật điện tử BL 320H	Độ chính xác 0,001g	SHIMAZU, Nhật Bản
2	Cân kỹ thuật BL 3200	Thang cân tối thiểu: 0,01	Shimadzu, Nhật Bản

3	Máy lắc ổn nhiệt KS 4000i	Dải tốc độ: 10-500 vòng/phút Dải nhiệt: 5°C trên nhiệt độ môi trường đến 80°C	IKA, Đức
4	Cân phân tích	Khoảng cân: 0.0001 - 200g ($\pm 0,1$ mg)	Sartorius, Mỹ
5	Cân phân tích AY200	Độ chính xác: 0.0001g	Shimadzu, Nhật Bản
6	Bể ổn nhiệt	Thang nhiệt độ: 37 - 100°C	Trung quốc
7	Máy đồng hóa mẫu IKA T 25 digital ULTRA-TURRAX	Dung tích mẫu đồng hóa từ 1 - 2000 mL (H ₂ O), hiển thị tốc độ kỹ thuật số. Phạm vi điều chỉnh tốc độ rộng từ 3000 đến 25,000 vòng/phút.	IKA, Đức
8	Thiết bị chưng cất đậm bản tự động UDK 129	8 ống trên 1 lần vô cơ hoá mẫu	Velp, Ý
9	Máy đo UV – Vis	Bước sóng 325 - 1000nm	USA
10	Máy ly tâm thể tích lớn MF600	Tốc độ ly tâm: >3000 vòng /phút	Labkorea, Hàn Quốc
11	Ly tâm Hermle Z 323	Tốc độ tối đa với Roto 220:87:17000rpm Tốc độ tối đa với Roto 220:72:5000rpm	Hermle, Đức
12	Ly tâm lạnh Mikko 220R	Làm lạnh: Giải nhiệt độ - 20°C đến 40°C Dung tích tối đa của roto trống: 60 x 1,5/2 ml Tốc độ ly tâm tối đa (RPM): 18.000 Lực ly tâm tối đa RCF: 31.514	Hettich Đức

13	Tủ hút khí độc	Inox-mica, mặt đá granit	Việt Nam
14	Tủ sấy đối lưu	Nhiệt độ sấy: 0 - 300°C	Trung quốc
15	Lò nung vuông DE-5FKC	Nhiệt độ nung tối đa: 1000°C	Việt Nam
18	Lò nung CWF-13/5	Nhiệt độ nung tối đa: 1300°C	Nabertherm, Đức
19	Bút đo pH cầm tay HI98127	Khoảng đo pH: 0 - 14	Hanna, Mỹ
20	Thiết bị cô đặc chân không	Độ chân không 760 mmHg Nhiệt độ cô đặc tối đa: 70°C Thể tích : 30 lít/ mẻ	Việt Nam

2.1.4.2. Hóa chất sử dụng

Bảng 2.2. Một số vật tư hóa chất sử dụng trong quá trình nghiên cứu.

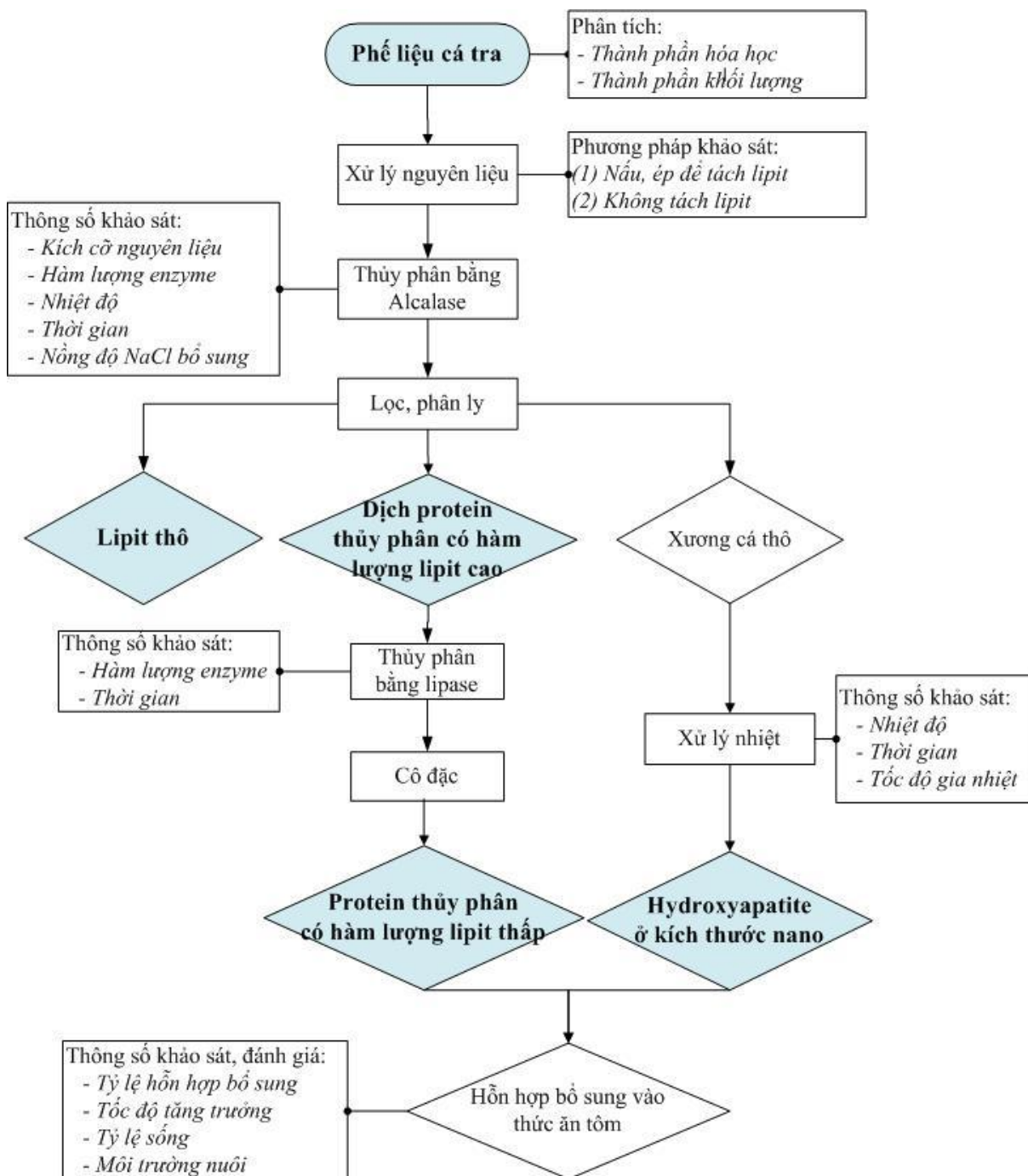
STT	Tên vật tư/hóa chất	Xuất xứ/Loại	Quy cách	ĐVT
1	Enzyme Alcalase 2,4 AU/g	Novozyme–Đan Mạch	Thương mại	mL
3	CuSO ₄	Trung Quốc	Tinh khiết	g
4	K ₂ SO ₄	Trung Quốc	Tinh khiết	g
5	H ₂ SO ₄	Trung Quốc	Đậm đặc	mL
6	HCl	Trung Quốc	Đậm đặc	mL
7	NaOH	Trung Quốc	Tinh khiết	g
8	Glycine	Trung Quốc	Tinh khiết	g
9	Na ₂ B ₄ O ₇ (Natri tetraborat)	Trung Quốc	Tinh khiết	g
10	H ₃ BO ₃	Trung Quốc	Tinh khiết	g
11	2,4-Dinitroflourobenzene (DNFB: C ₆ H ₃ FN ₂ O ₄)	Bỉ	Tinh khiết	mL
12	Bộ test SERA	Việt Nam	Test chuẩn	Bộ

Tất cả hóa chất dùng nghiên cứu đều thuộc loại tinh khiết đạt tiêu chuẩn dùng cho phân tích. Các loại hóa chất đều được bảo quản theo đúng yêu cầu của nhà sản xuất ghi trên bao bì trước khi sử dụng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tiếp cận nghiên cứu

Sơ đồ phương pháp tiếp cận các vấn đề nghiên cứu được trình bày ở Hình 2.3



Hình 2.3. Sơ đồ phương pháp tiếp cận các vấn đề nghiên cứu của Luận án.

2.2.1.1. Nghiên cứu xử lý nguyên liệu

Để làm cơ sở cho việc lựa chọn phương pháp thủy phân, phế liệu cá Tra (đầu, khung xương, nội tạng, da, vây...) được phân tích về thành phần khối lượng và thành

phân hóa học. Dựa trên kết quả phân tích, nghiên cứu quá trình xử lý phế liệu cá có tách lipít và không tách lipít. Các phương pháp gồm: (i) nấu chín và ép; (ii) không tách lipít.

2.2.1.2. Nghiên cứu quy trình sản xuất dịch protein thủy phân từ phế liệu cá Tra bằng enzyme alcalase

- Sử dụng alcalase thủy phân phế liệu cá Tra đã được xử lý ở trên. Để xác định điều kiện thủy phân thích hợp nhất, khảo sát ảnh hưởng của các thông số: kích cỡ nguyên liệu, hàm lượng enzyme, nhiệt độ, thời gian, nồng độ muối NaCl bổ sung. Sau quá trình thủy phân kết thúc, hỗn hợp được lọc tách thành hai phần gồm: (i) phần rắn, chứa chủ yếu là xương cá được sử dụng làm nguyên liệu để nghiên cứu thu nhận HA sau này; (ii) phần lỏng gồm protein hòa tan, protein không hòa tan (dạng sệt) và lipít thô.

2.2.1.3. Nghiên cứu giảm hàm lượng lipít có trong dịch protein thủy phân từ phế liệu cá Tra bằng enzyme lipase

Sử dụng lipase để tiếp tục thủy phân phần dịch lỏng thu được từ phế liệu cá Tra bằng alcalase để thu nhận dịch protein thủy phân có hàm lượng lipít thấp nhằm sử dụng làm nguồn bổ sung vào thức ăn tôm thẻ giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi. Ở giai đoạn này nghiên cứu các thông số gồm: hàm lượng lipase và thời gian thủy phân. Các yếu tố: nhiệt độ, pH tham chiếu theo hướng dẫn nhà sản xuất enzyme. Các cơ sở khoa học và thiết kế thí nghiệm chi tiết được trình bày trong Mục 2.2.4.

2.2.1.4. Nghiên cứu quy trình sản xuất hydroxyapatite kích thước nano từ phần xương cá thô của quá trình thủy phân phế liệu cá Tra

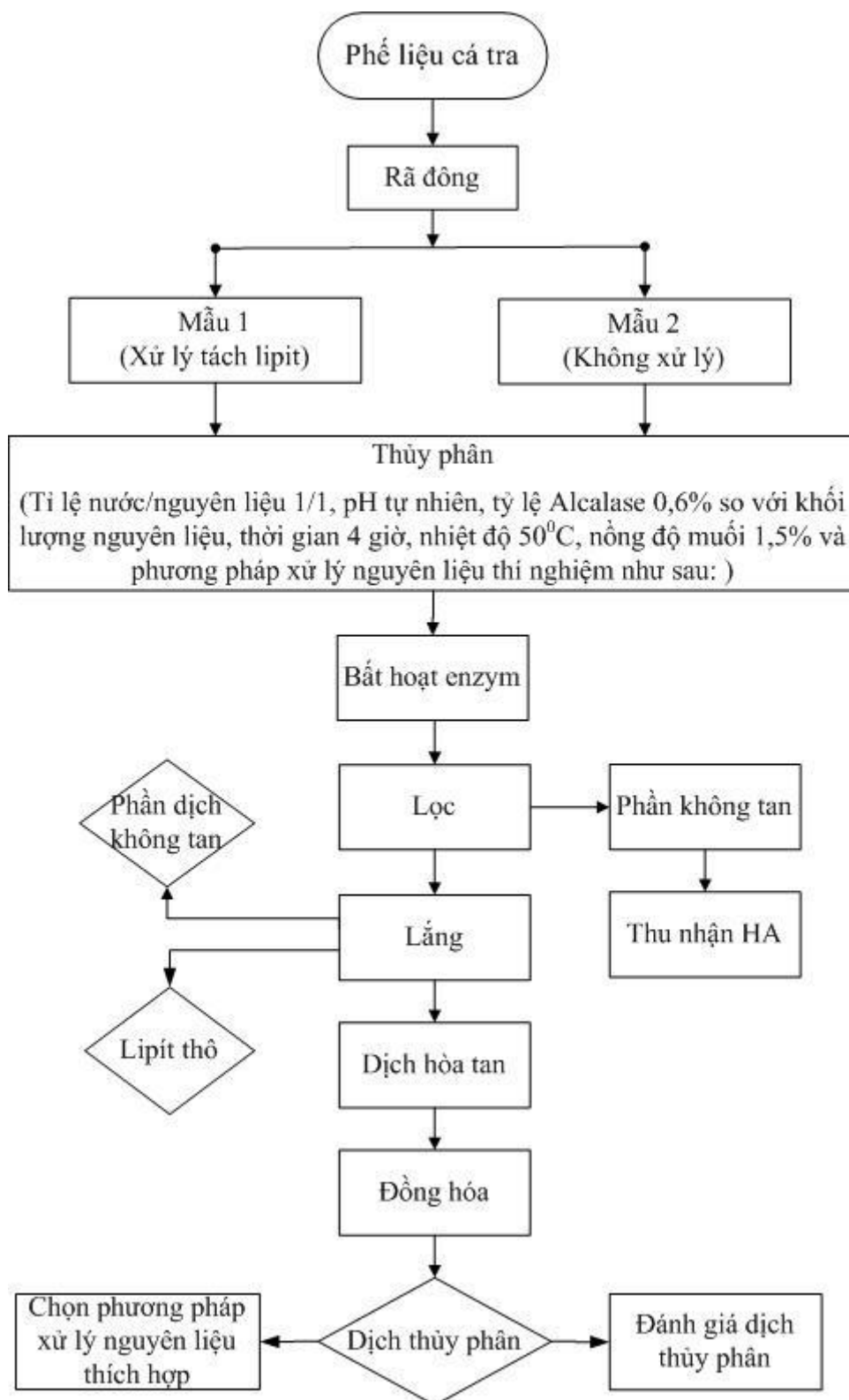
Phần xương cá thô thu nhận sau quá trình thủy phân phế liệu cá Tra bằng alcalase được rửa 3 lần bằng nước sạch, sấy khô đến khối lượng không đổi. Sau đó, tiến hành nung ở các chế độ nhiệt độ, thời gian, tốc độ gia nhiệt khác nhau để thu nhận hydroxyapatite kích thước nanomet. Các cơ sở khoa học và thiết kế thí nghiệm chi tiết được trình bày trong Mục 2.2.5.

2.2.1.5. Nghiên cứu bước đầu thử nghiệm ứng dụng bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy phân và hydroxyapatite kích thước nanomet thu nhận từ phế liệu cá Tra vào thức ăn tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi. Các cơ sở khoa học và thiết kế thí nghiệm chi tiết được trình bày trong Mục 2.2.6.

Phương pháp tiếp cận này hướng đến thu nhận tối đa các hợp chất có giá trị từ nguồn phế liệu cá Tra. Đồng thời sử dụng tác nhân enzyme có đặc tính an toàn, thân thiện với môi trường. Tuy nhiên, phạm vi của đề tài không tập trung nghiên cứu sâu về

tinh chế sản phẩm lipít và protein không tan mà chỉ dừng lại ở bước thu nhận hai sản phẩm này ở dạng thô.

2.2.2. Nghiên cứu xử lý tách lipít trong nguyên liệu



Hình 2.4. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của phương pháp xử lý tách lipít phế liệu cá Tra.

Mục tiêu nghiên cứu:

Xác định được hiệu quả của phương pháp xử lý tách lipít trong nguyên liệu trước khi thủy phân để thu nguyên liệu phế liệu cá Tra có hàm lượng lipít còn lại thấp nhất tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình thủy phân, từ đó chọn lựa phương pháp xử lý nguyên liệu phù hợp cho quá trình thủy phân.

Cơ sở khoa học:

Cơ chất có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình thủy phân. Ngoài các yếu tố của cơ chất như: kích thước mẫu, nồng độ cơ chất thì hàm lượng lipít trong nguyên liệu trước khi thủy phân cũng ảnh hưởng đến quá trình thủy phân, do vậy cần phải nghiên cứu xử lý nguyên liệu để tách, làm giảm hàm lượng lipít trong nguyên liệu trước khi thủy phân tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình thủy phân phế liệu cá Tra thu nhận dịch protein. Thực hiện các phương pháp xử lý nguyên liệu khác nhau trước khi thủy phân nhằm đánh giá hiệu quả của phương pháp xử lý nguyên liệu từ đó chọn phương pháp tách lipít phù hợp cho quá trình thủy phân. Thí nghiệm nghiên cứu phương pháp tách lipít trong nguyên liệu trước khi thủy phân được trình bày trong Hình 2.4.

Cách tiến hành thí nghiệm:

Hai mẫu phế liệu cá Tra (100g/mẫu) được rửa đông gián tiếp trong vòi nước lưu động.

- **Mẫu 1:** 100g phế liệu được hấp ở 90°C, trong 15 phút [150], sau đó mẫu được ép qua 3 tấm vải màng với lực ép thích hợp để tách phần dịch ép, đo thể tích, khối lượng phần dịch ép, phế liệu sau khi tách lipít được sử dụng cho quá trình thủy phân. Lấy mẫu phế liệu sau xử lý tiến hành phân tích các chỉ tiêu: protein, lipít.

- **Mẫu 2:** Không xử lý.

100g mẫu phế liệu cá Tra sau khi xử lý tách lipít được thực hiện thủy phân với enzyme alcalase bằng cách bổ sung thêm 100 mL nước cất, enzyme alcalase sử dụng với tỷ lệ 0,6% so với khối lượng nguyên liệu, nồng độ muối 1,5%, pH tự nhiên, nhiệt độ môi trường thủy phân 50°C, tiến hành thủy phân trong thời gian 4 giờ để thu nhận dịch protein thủy phân. Sau khi quá trình thủy phân kết thúc, bất hoạt enzyme ở nhiệt độ 90°C trong 15 phút, rồi tiến hành lọc để thu nhận phần dịch lọc; phần bã rắn được rửa sạch qua 3 lần bằng nước sạch, để ráo, sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi để thu phần xương cá Tra khô sử dụng cho thí nghiệm nghiên cứu sản xuất HA sau này. Phần dịch lỏng, sau đó thực hiện phân ly bằng cách lắng lọc ở môi trường không khí trong 30 phút để tách, thu nhận dịch protein thủy phân. Phần dịch protein thủy phân được đồng hóa để đồng nhất mẫu, tiến

hành lấy mẫu đánh giá các chỉ tiêu: DH, NR. Mỗi mẫu được tiến hành thí nghiệm lặp lại 3 lần, lấy kết quả giá trị trung bình. Dựa vào kết quả thu được, đánh giá, so sánh và lựa chọn phương pháp xử lý nguyên liệu phù hợp nhất. Sơ đồ bố trí thí nghiệm được thể hiện trong Hình 2.4.

2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của các thông số đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra bằng enzyme alcalase

2.2.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra

Mục tiêu nghiên cứu:

Đánh giá được ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra bằng enzyme alcalase thương mại có hoạt độ 2,4 AU/g để thu nhận dịch protein thủy phân có độ thủy phân cao, có khối lượng phân tử nhỏ, hàm lượng đạm axit amin cao. Chọn lựa nguyên liệu phù hợp cho quá trình thủy phân để thu nhận dịch protein thủy phân tốt nhất.

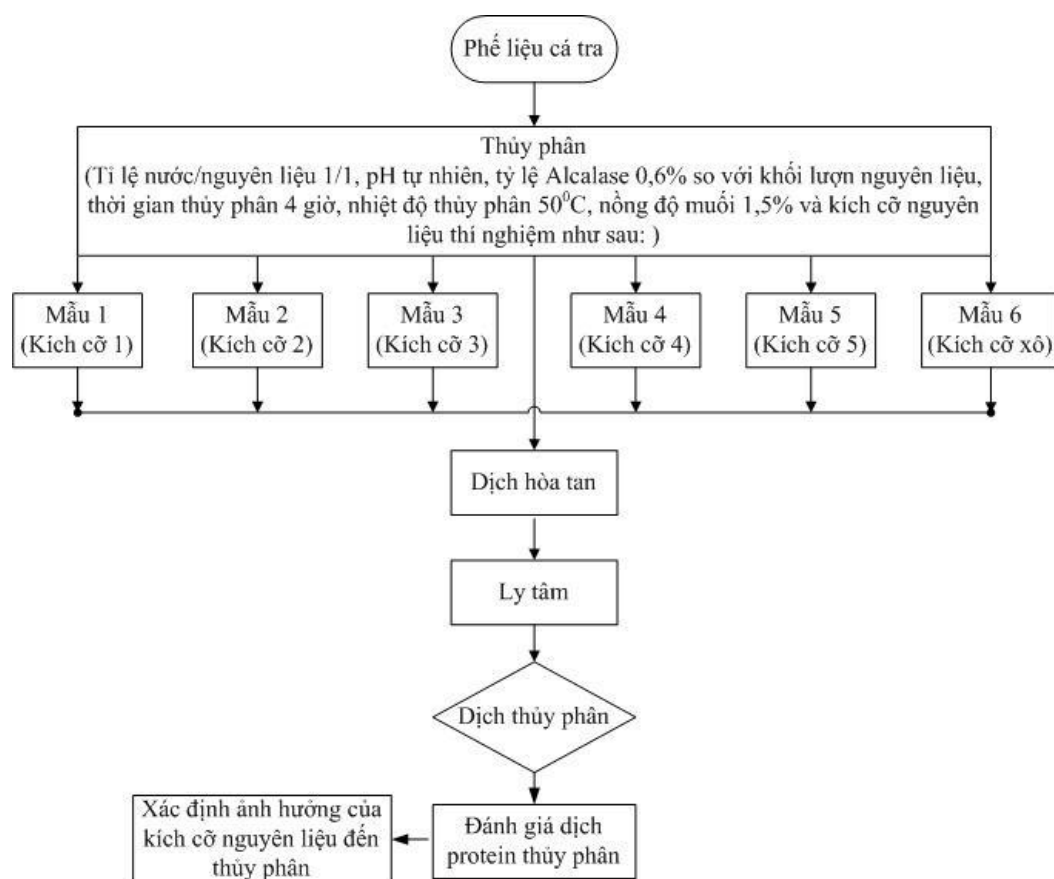
Cơ sở khoa học:

Cơ chất có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình thủy phân. Ngoài các yếu tố của cơ chất như: kích thước mẫu, tính chất của nguyên liệu (chủ yếu là hàm lượng lipit nguyên liệu) thì kích cỡ nguyên liệu cá Tra sử dụng cho chế biến tạo ra nguồn phế liệu cá có hàm lượng lipit khác nhau cũng ảnh hưởng đến thủy phân thu nhận dịch protein. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu đến quá trình thủy phân được trình bày trong Hình 2.5.

Cách tiến hành thí nghiệm:

Dựa theo kích cỡ nguyên liệu khác nhau, mẫu phế liệu cá Tra được chọn lựa theo kích thước trước khi phi-lê được chia thành 6 mẫu, mỗi mẫu phế liệu cá thu nhận từ các kích cỡ cá khác nhau được cho vào từng thùng chứa đựng riêng biệt đánh số thứ tự từ 1 đến 6, các mẫu cá Tra nguyên liệu gồm:

- Mẫu 1 (kích cỡ 1): mẫu phế liệu thu từ nguyên liệu cá Tra: 500-700 g/con.
- Mẫu 2 (kích cỡ 2): mẫu phế liệu thu từ nguyên liệu cá Tra: 700-900 g/con.
- Mẫu 3 (kích cỡ 3): mẫu phế liệu thu từ nguyên liệu cá Tra: 900-1100 g/con.
- Mẫu 4 (kích cỡ 4): mẫu phế liệu thu từ nguyên liệu cá Tra: 1100-1500 g/con.
- Mẫu 5 (kích cỡ 5): mẫu phế liệu thu từ nguyên liệu cá Tra: 1500-2000 g/con.
- Mẫu 6 (mẫu xô): mẫu phế liệu thu từ nguyên liệu cá Tra không phân chia cỡ.



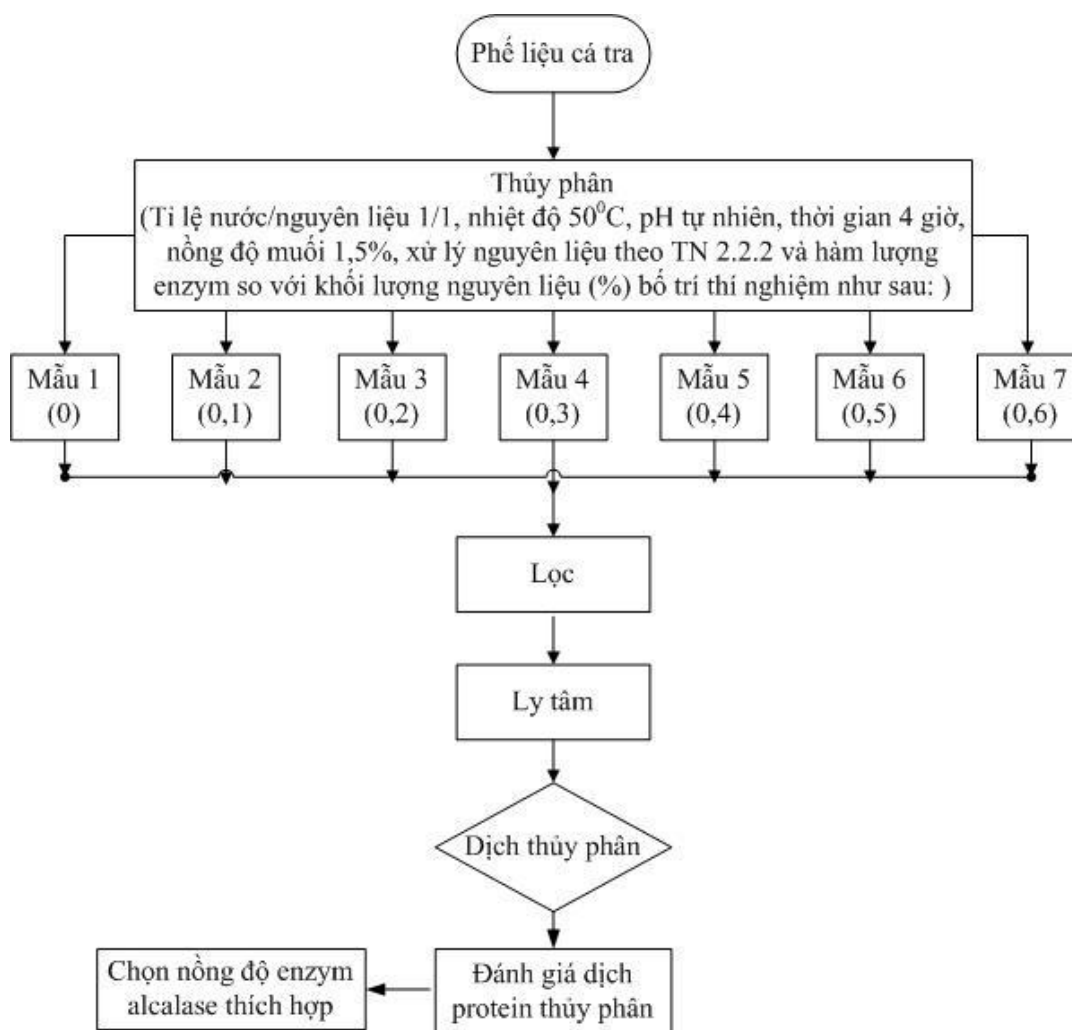
Hình 2.5. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra.

Tất cả các mẫu được xay nhỏ và đồng nhất mẫu, chia đều 100g/mẫu để sử dụng cho thí nghiệm. Mẫu được xử lý tách lipít trước khi thủy phân theo kết quả thí nghiệm 2.2.2. 100g mẫu phế liệu cá Tra sau khi xử lý tách lipít được thực hiện thủy phân với enzyme alcalase bằng cách bổ sung thêm 100 mL nước cất, enzyme alcalase sử dụng với tỷ lệ 0,6% so với khối lượng nguyên liệu, nồng độ muối 1,5%, không điều chỉnh pH môi trường, nhiệt độ môi trường thủy phân 50°C, tiến hành thủy phân trong thời gian 4 giờ để thu nhận dịch protein thủy phân. Sau khi quá trình thủy phân kết thúc, bất hoạt enzyme ở nhiệt độ 90°C trong 15 phút, rồi tiến hành lọc để thu nhận phần dịch lọc; phần bã rắn được rửa sạch qua 3 lần bằng nước sạch, để ráo, sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi để thu phần xương cá Tra khô sử dụng cho thí nghiệm nghiên cứu sản xuất HA sau này. Phần dịch lỏng, sau đó thực hiện phân ly bằng thiết bị ly tâm lạnh 8000 vòng/phút, trong thời gian 30 phút để tách, thu nhận dịch protein thủy phân. Phần dịch protein thủy phân được đồng hóa để đồng nhất mẫu, tiến hành lấy mẫu đánh giá các chỉ tiêu: DH, NR. Mỗi mẫu được tiến hành thí nghiệm lặp lại 3 lần, lấy kết quả giá trị trung bình. Sơ đồ bố trí thí nghiệm được thể hiện trong Hình 2.5.

2.2.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng enzyme alcalase

Mục tiêu nghiên cứu:

Xác định được hàm lượng enzyme alcalase thích hợp nhất để thủy phân phế liệu cá Tra, thu nhận dịch protein thủy phân có độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitơ cao nhất; sử dụng dịch protein thủy phân này để tiếp tục thủy phân bằng enzyme lipase và sản xuất dịch protein thủy phân cô đặc thử nghiệm ứng dụng bổ sung vào thức ăn tôm 20 – 55 ngày tuổi, thúc đẩy nhanh quá trình sinh trưởng của tôm.



Hình 2.6. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của hàm lượng alcalase đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra.

Cơ sở khoa học:

Hàm lượng enzyme sử dụng có ảnh hưởng lớn đến quá trình thủy phân cắt đứt liên kết peptit của protein. Khi hàm lượng enzyme sử dụng càng lớn thì số trung tâm hoạt động càng nhiều, do đó phản ứng cắt mạch peptit diễn ra nhanh và đạt hiệu quả cao. Tuy nhiên, nếu sử dụng hàm lượng enzyme cao dẫn đến tăng chi phí sản xuất, khó

khăn khi áp dụng ở quy mô công nghiệp. Ngược lại, nếu sử dụng enzyme với hàm lượng quá thấp, không đủ lượng enzyme cho thủy phân thì hiệu quả cắt mạch thấp và cần kéo dài thời gian thủy phân. Hình 2.6 mô tả bố trí thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng enzyme đến hiệu quả của quá trình thủy phân protein từ phế liệu cá Tra.

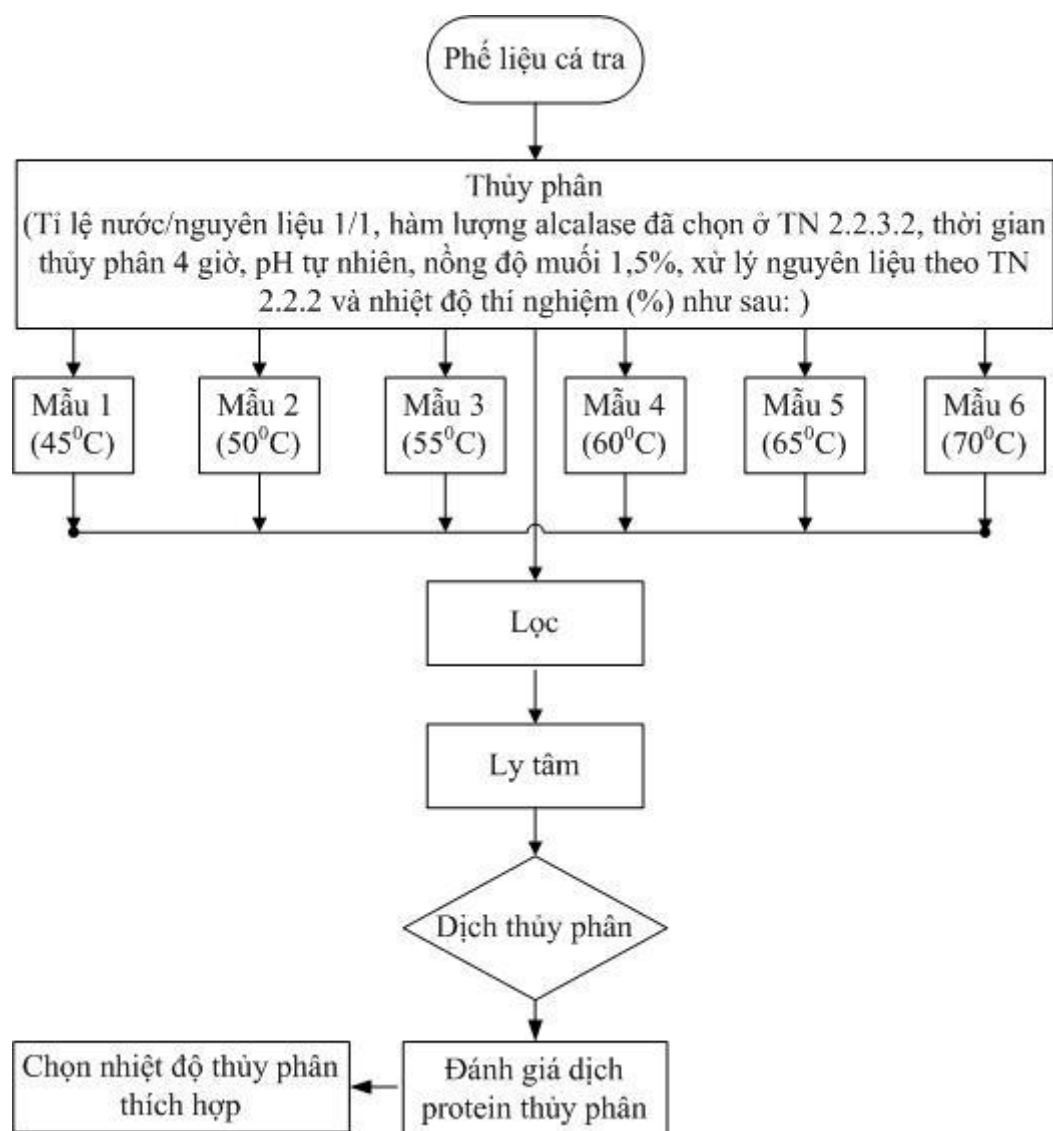
Cách tiến hành thí nghiệm:

100g mẫu phế liệu cá Tra được rửa đông gián tiếp trong vò nước lưu động. Mẫu được xử lý tách lipít trước khi thủy phân theo kết quả thí nghiệm 2.2.2. 100g mẫu phế liệu cá Tra sau khi xử lý tách lipít được thực hiện thủy phân với enzyme alcalase bằng cách cho thêm 100 mL nước cất, bổ sung alcalase sử dụng thủy phân với hàm lượng sử dụng lần lượt là: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 và 0,6 % so với khối lượng nguyên liệu, nồng độ muối 1,5%, không điều chỉnh pH môi trường, nhiệt độ thủy phân 50°C, tiến hành thủy phân trong thời gian 4 giờ để thu nhận dịch protein thủy phân. Sau khi quá trình thủy phân kết thúc, bất hoạt enzyme ở nhiệt độ 90°C trong 15 phút, rồi tiến hành lọc để thu nhận phần dịch lọc; phần bã rắn được rửa sạch qua 3 lần bằng nước nóng, để ráo, sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi để thu phần xương cá Tra khô sử dụng cho thí nghiệm nghiên cứu sản xuất HA sau này. Phần dịch lỏng, được phân ly bằng thiết bị ly tâm lạnh 8000 vòng/phút, trong thời gian 30 phút để tách, thu nhận dịch protein thủy phân. Phần dịch protein thủy phân được đồng hóa để đồng nhất mẫu, tiến hành lấy mẫu đánh giá các chỉ tiêu: DH, NR. Mỗi mẫu được tiến hành thí nghiệm lặp lại 3 lần, lấy kết quả giá trị trung bình. Sơ đồ bố trí thí nghiệm được thể hiện trong Hình 2.6.

2.2.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân

Mục tiêu nghiên cứu:

Xác định được nhiệt độ thủy phân thích hợp nhất sử dụng cho quá trình thủy phân phế liệu cá Tra bằng enzyme alcalase thương mại có hoạt độ 2,4 AU/g để thu nhận dịch protein thủy phân có độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitơ cao nhất; dịch protein thủy phân này được sử dụng sản xuất dịch protein thủy phân cô đặc, thử nghiệm ứng dụng bổ sung vào thức ăn tôm 20 – 55 ngày tuổi, thúc đẩy nhanh quá trình sinh trưởng của tôm.



Hình 2.7. Sơ đồ thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân

Cơ sở khoa học:

Mỗi enzyme có một khoảng nhiệt độ hoạt động thích hợp và cho hiệu quả thủy phân cao nhất. Alcalase hoạt động thích hợp nhất trong khoảng phạm vi nhiệt độ từ 45–70°C. Nếu nhiệt độ thấp sẽ không thúc đẩy nhanh được quá trình thủy phân, ngược lại nhiệt độ cao sẽ ức chế hoạt động của enzyme. Do vậy, việc xác định nhiệt độ thủy phân để vừa đạt hiệu quả cắt mạch cao vừa có thể áp dụng dễ dàng trong sản xuất công nghiệp là rất quan trọng. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân được trình bày trong Hình 2.7.

Cách tiến hành thí nghiệm:

100g mẫu phế liệu cá Tra được rửa đông gián tiếp trong vò nước lưu động. Mẫu được xử lý tách lipít trước khi thủy phân theo kết quả thí nghiệm 2.2.2. Sử dụng 100g mẫu phế liệu cá Tra sau khi xử lý tách lipít được thực hiện thủy phân

với enzyme alcalase bằng cách cho thêm 100 mL nước cất, alcalase sử dụng để thủy phân với một hàm lượng là giá trị phù hợp nhất lựa chọn từ thí nghiệm ảnh hưởng của hàm lượng enzyme ở TN 2.2.3.2, nồng độ muối 1,5%, không điều chỉnh pH môi trường, nhiệt độ thủy phân được điều chỉnh lần lượt là 45, 50, 55, 60, 65 và 70°C, tiến hành thủy phân trong thời gian 4 giờ để thu nhận dịch protein thủy phân. Sau khi quá trình thủy phân kết thúc, bất hoạt enzyme ở nhiệt độ 90°C trong 15 phút, rồi tiến hành lọc để thu nhận phần dịch lọc; phần bã rắn được rửa sạch qua 3 lần bằng nước nóng, để ráo, sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi để thu phần xương cá Tra khô sử dụng cho thí nghiệm nghiên cứu sản xuất HA sau này. Phần dịch lỏng, được phân ly bằng thiết bị ly tâm lạnh 8000 vòng/phút, trong thời gian 30 phút để tách, thu nhận dịch protein thủy phân. Phần dịch protein thủy phân được đồng hóa để đồng nhất mẫu, tiến hành lấy mẫu đánh giá các chỉ tiêu: DH, NR. Mỗi mẫu được tiến hành thí nghiệm lặp lại 3 lần, lấy kết quả giá trị trung bình. Sơ đồ thí nghiệm được mô tả trong Hình 2.7.

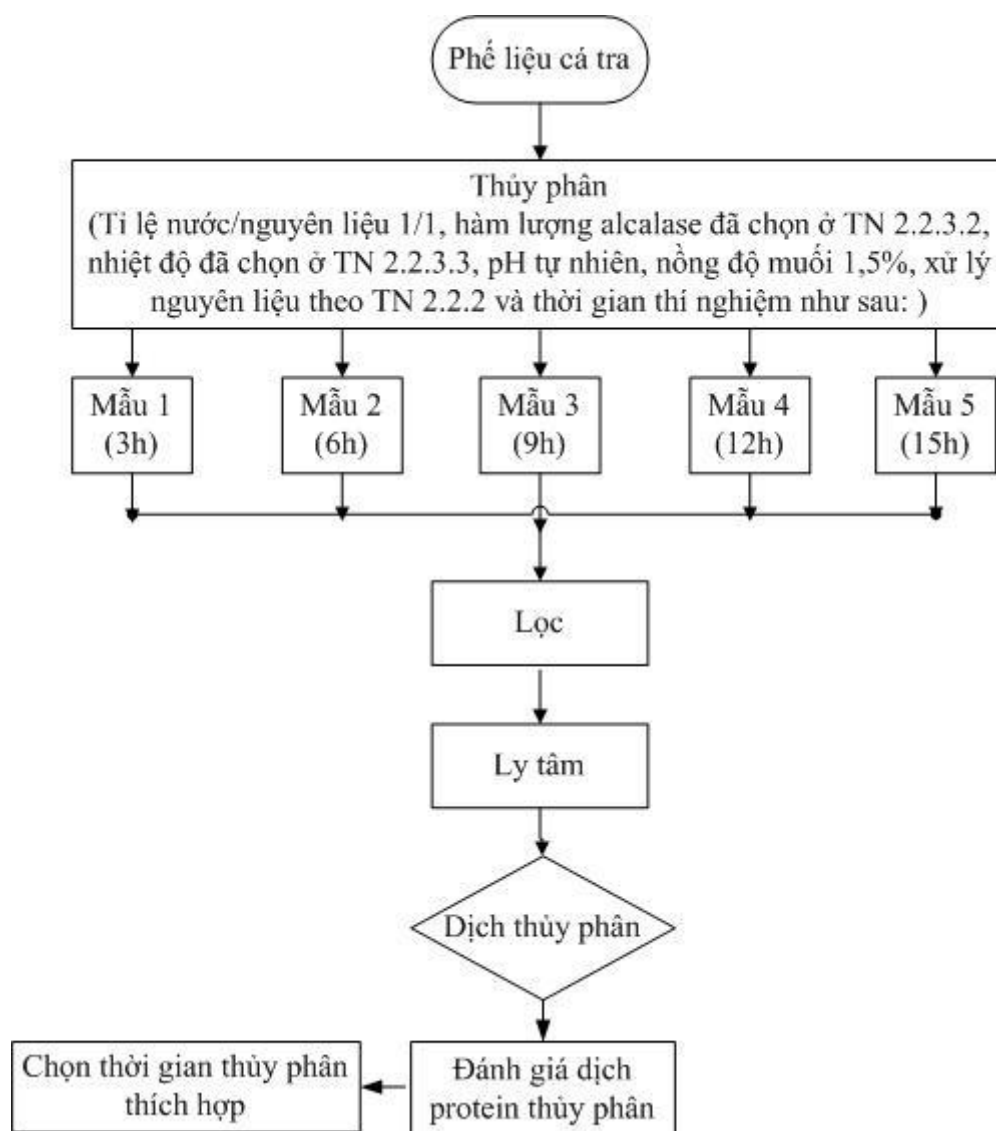
2.2.3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian thủy phân

Mục tiêu nghiên cứu:

Xác định được thời gian thủy phân thích hợp nhất cho quá trình thủy phân phế liệu cá Tra bằng enzyme alcalase thương mại có hoạt độ 2,4 AU/g để thu nhận dịch protein thủy phân có độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitơ cao nhất; sử dụng dịch protein thủy phân này để tiếp tục thủy phân bằng enzyme lipase và sản xuất dịch protein thủy phân cô đặc, thử nghiệm ứng dụng bổ sung vào thức ăn tôm 20 – 55 ngày tuổi, thúc đẩy nhanh quá trình sinh trưởng của tôm.

Cơ sở khoa học:

Khi thời gian thủy phân thích hợp, quá trình thủy phân xảy ra tốt nhất thì dịch protein thủy phân thu nhận sẽ có NR và DH cao nhất. Thời gian ngắn thì phản ứng thủy phân xảy ra chủ yếu trên bề mặt của cơ chất, chưa đủ thời gian để quá trình thủy phân xảy ra triệt để, do đó giá trị NR và DH của dịch protein thấp. Tuy nhiên, nếu thời gian thủy phân quá dài, có thể xảy hiện tượng thối của sản phẩm thủy phân, ngoài ra hiệu quả thủy phân không cao, tăng chi phí sản xuất, đồng thời khó khăn trong ứng dụng sản xuất công nghiệp. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian thủy phân được trình bày trong Hình 2.8.



Hình 2.8. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của thời gian đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra.

Cách tiến hành thí nghiệm:

Túi mẫu 100g phế liệu cá Tra được rửa đông gián tiếp trong vôi nước lưu động. Mẫu được xử lý tách lipit trước khi thủy phân theo kết quả thí nghiệm 2.2.2. Cho 100g mỗi mẫu vào cốc thủy tinh 500 mL, thêm 100 mL nước cất, khuấy trộn, bịt kín bình bằng giấy bạc. Đặt cốc mẫu vào bể ổn nhiệt ở nhiệt độ là giá trị phù hợp nhất theo thí nghiệm 2.2.3.3, nồng độ muối 1,5%, pH tự nhiên, bổ sung alcalase với hàm lượng được sử dụng là giá trị phù hợp nhất lựa chọn từ thí nghiệm ảnh hưởng của hàm lượng enzyme theo thí nghiệm 2.2.3.2. Thực hiện thủy phân với thời gian là 3, 6, 9, 12 và 15 giờ. Sau khi quá trình thủy phân kết thúc, bất hoạt enzyme ở nhiệt độ 90°C trong 15 phút, rồi tiến hành lọc để thu nhận phần dịch lọc; phần bã rắn được rửa sạch qua 3 lần bằng nước nóng, để ráo, sấy khô ở 105°C đến

khối lượng không đổi để thu phần xương cá Tra khô sử dụng cho thí nghiệm nghiên cứu sản xuất HA sau này. Phần dịch lỏng, được phân ly bằng thiết bị ly tâm lạnh 8000 vòng/phút, trong thời gian 30 phút để tách, thu nhận dịch protein thủy phân. Phần dịch protein thủy phân được đồng hóa để đồng nhất mẫu, tiến hành lấy mẫu đánh giá các chỉ tiêu: DH, NR. Mỗi mẫu được tiến hành thí nghiệm lặp lại 3 lần, lấy kết quả giá trị trung bình. Sơ đồ bố trí thí nghiệm được thể hiện trong Hình 2.8.

2.2.3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ muối

Mục tiêu nghiên cứu:

Xác định được nồng độ muối thích hợp nhất sử dụng cho quá trình thủy phân phế liệu cá Tra bằng enzyme alcalase 2,4 AU/g để thu nhận dịch protein thủy phân có độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nito cao nhất; sử dụng dịch protein thủy phân này để tiếp tục thủy phân bằng enzyme lipase và sản xuất dịch protein thủy phân cô đặc, thử nghiệm ứng dụng bổ sung vào thức ăn tôm 20 – 55 ngày tuổi, thúc đẩy nhanh quá trình sinh trưởng của tôm.

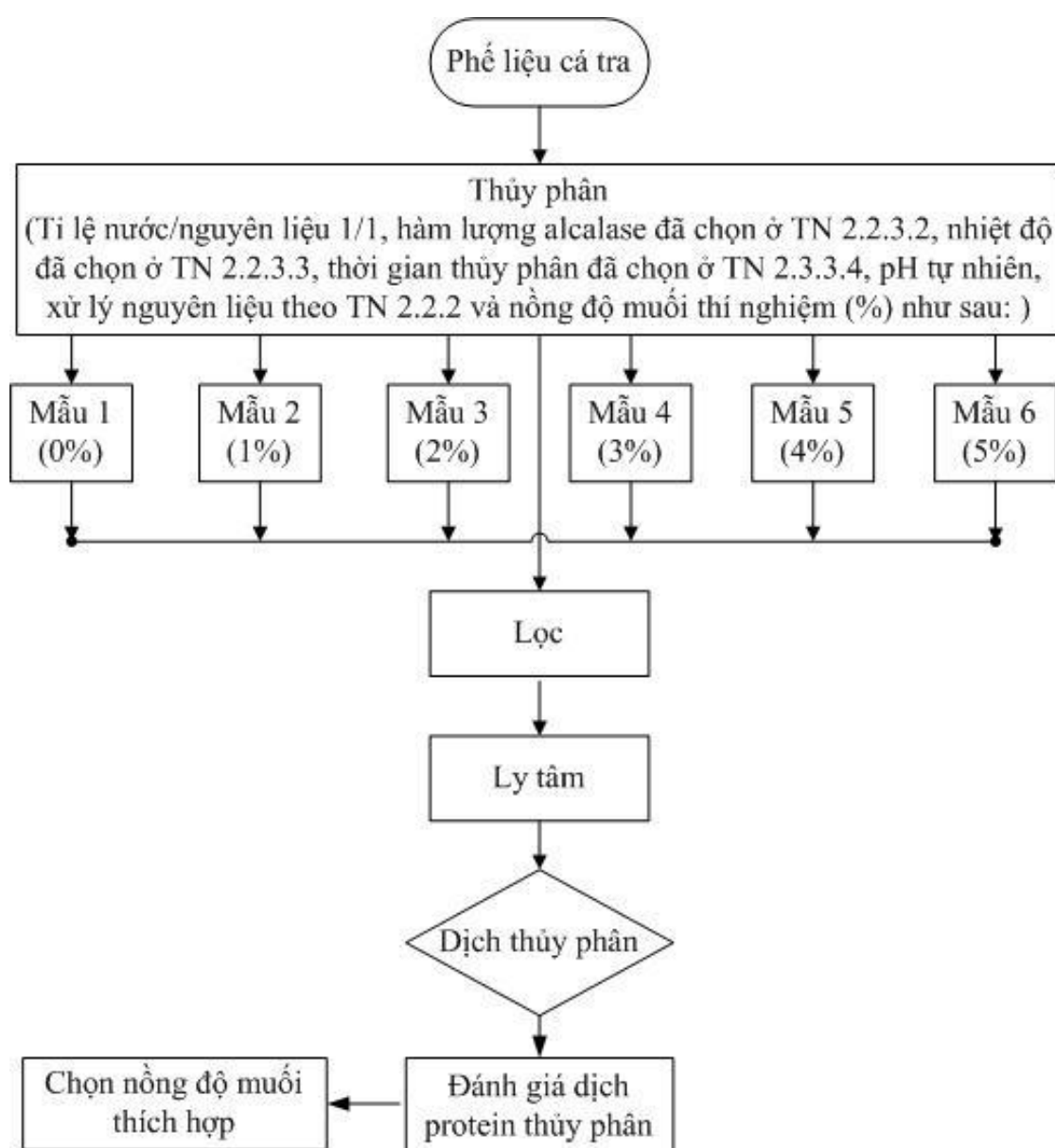
Cơ sở khoa học:

Muối có ảnh hưởng rất lớn đến enzyme và ảnh hưởng đến quá trình thủy phân cắt liên kết peptit của protein, ngoài ra muối còn có tác dụng bảo quản, phòng ngừa hư thối cho dịch thủy phân nhưng cũng sẽ ảnh hưởng đến vị của sản phẩm. Nếu sử dụng nồng độ muối cao sẽ gây ức chế hoạt động enzyme làm chậm quá trình thủy phân, gây mặn cho dịch thủy phân, do đó phản ứng cắt mạch peptit diễn ra chậm và hiệu quả thủy thấp. Ngược lại, nếu sử dụng nồng độ muối thấp thì ít ảnh hưởng đến quá trình thủy phân nhưng tác dụng phòng thối không tốt. Hình 2.9 mô tả bố trí thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ muối đến hiệu quả của quá trình thủy phân protein từ phế liệu cá Tra.

Cách tiến hành thí nghiệm:

Túi mẫu 100g phế liệu cá Tra được rửa đông gián tiếp trong vòi nước lưu động. Mẫu được xử lý tách lipid trước khi thủy phân theo kết quả thí nghiệm 2.2.2. Cho 100g mỗi mẫu vào cốc thủy tinh 500 mL, thêm 100 mL nước cất, khuấy trộn đều, bịt kín cốc bằng giấy bạc. Đặt cốc mẫu vào bể ổn nhiệt ở nhiệt độ là giá trị phù hợp nhất theo thí nghiệm 2.2.3.3; hàm lượng enzyme alcalase được sử dụng là giá trị phù hợp nhất lựa chọn từ thí nghiệm 2.2.3.2; thời gian thủy phân là giá trị phù hợp nhất theo thí nghiệm 2.2.3.4, pH tự nhiên. Nồng độ muối bổ sung cho quá trình thủy phân lần lượt là 0, 1, 2, 3, 4, 5%. Sau khi quá trình thủy phân kết thúc, bất hoạt enzyme ở nhiệt độ 90°C trong 15

phút, rồi tiến hành lọc để thu nhận phần dịch lọc; phần bã rắn được rửa sạch qua 3 lần bằng nước nóng, để ráo, sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi để thu phần xương cá Tra khô sử dụng cho thí nghiệm nghiên cứu sản xuất HA sau này. Phần dịch lỏng, được phân ly bằng thiết bị ly tâm lạnh 8000 vòng/phút, trong thời gian 30 phút để tách, thu nhận dịch protein thủy phân. Phần dịch protein thủy phân được đồng hóa để đồng nhất mẫu, tiến hành lấy mẫu đánh giá các chỉ tiêu: DH, NR. Mỗi mẫu được tiến hành thí nghiệm lặp lại 3 lần, lấy kết quả giá trị trung bình. Sơ đồ bố trí thí nghiệm được thể hiện trong Hình 2.9.



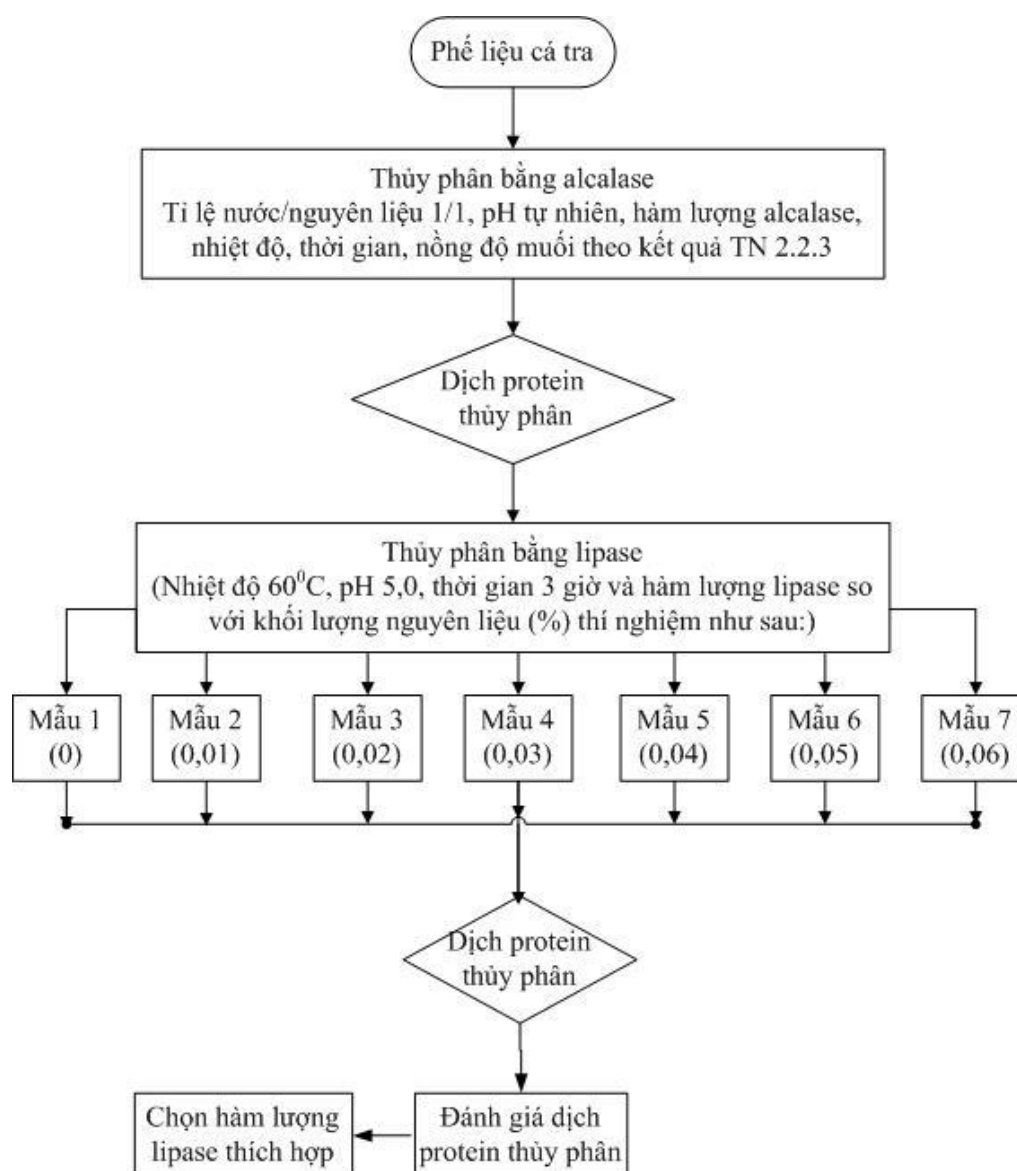
Hình 2.9. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nồng độ muối đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra.

2.2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của các thông số đến quá trình thủy phân dịch protein hòa tan bằng enzyme lipase

2.2.4.1. Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme lipase

Mục tiêu nghiên cứu:

Xác định được hàm lượng enzyme lipase phù hợp nhất sử dụng cho quá trình thủy phân dịch protein thủy phân bằng alcalase để thu dịch protein thủy phân có hàm lượng lipit tổng thấp nhất, chứa nhiều axit béo chưa bão hòa, phù hợp để bổ sung vào thức ăn tôm thẻ chân trắng 20 – 55 ngày tuổi và ứng dụng cho các lĩnh vực khác.



Hình 2.10. Sơ đồ thí nghiệm xác định ảnh hưởng của hàm lượng enzyme lipase

Cơ sở khoa học:

Phần dịch protein thủy phân thu nhận được sau khi thủy phân bằng enzyme alcalase có hàm lượng lipit cao hơn so với qui định [22] (*dịch protein thủy phân từ cá Tra thu được*

có hàm lượng lipít 10,80 %, trong khi đó yêu cầu thức ăn bổ sung cho tôm thẻ chân trắng theo TCVN-10325 : 2014 có hàm lượng lipít từ 6 – 7 %), không đạt tiêu chuẩn để làm thức ăn bổ sung cho tôm thẻ chân trắng nên dịch protein thủy phân bằng alcalase cần phải được tiếp tục thủy phân bằng enzyme lipase để chuyển lipít thành các axit béo để thu được dịch protein thủy phân có hàm lượng lipít thấp, chứa nhiều các axit béo chưa bão hòa phù hợp để bổ sung vào thức ăn tôm và ứng dụng cho các lĩnh vực khác. Nếu hàm lượng lipase sử dụng cao, tốc độ thủy phân nhanh, tách được lipít nhiều nhưng hiệu quả sử dụng thấp, lãng phí. Nếu hàm lượng lipase sử dụng thấp thì không đủ lượng enzyme làm cho quá trình thủy phân chậm, kéo dài. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng enzyme lipase đến quá trình thủy phân được trình bày trong Hình 2.10.

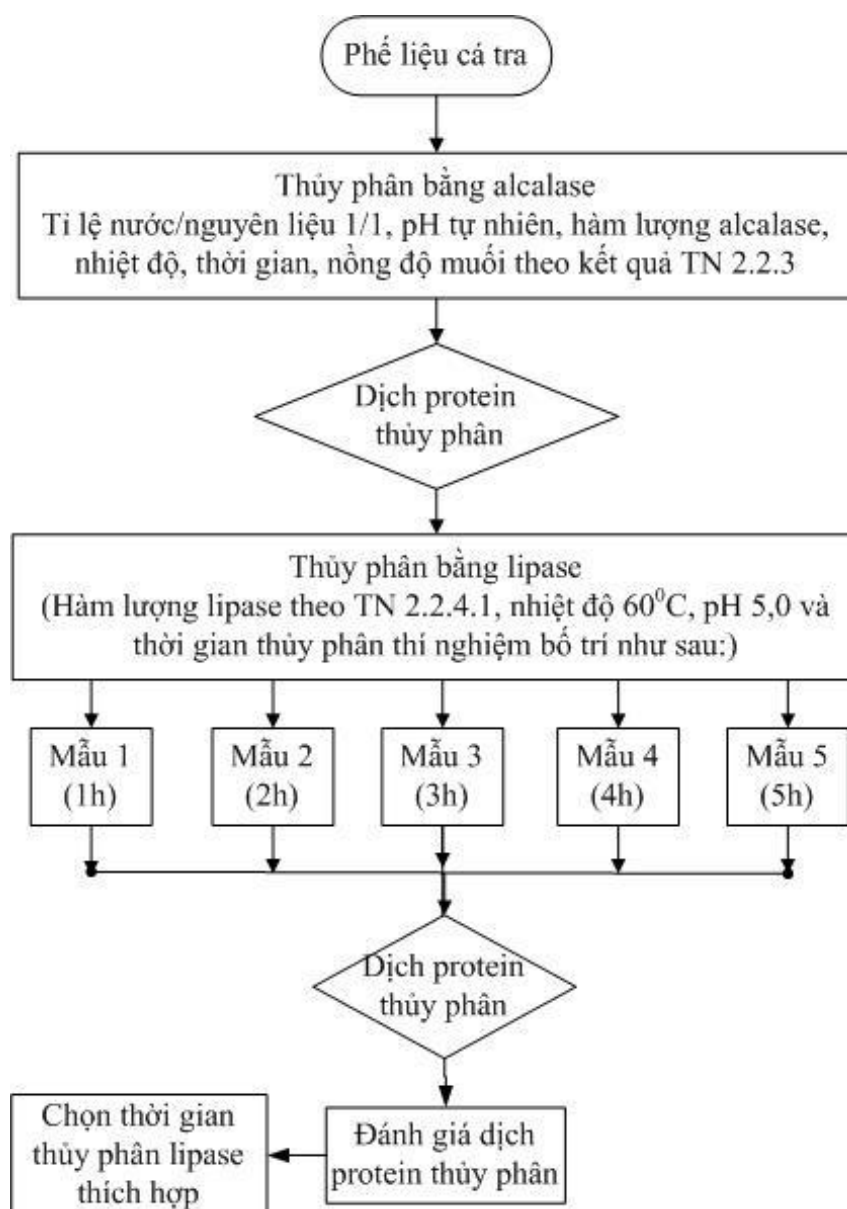
Cách tiến hành thí nghiệm:

Phần dịch thủy phân hòa tan thu được của quá trình thủy phân phế liệu cá Tra bằng alcalase ($180\text{ mL} \pm 5\text{ mL}$) được điều chỉnh pH về 5,0 bằng dung dịch HCL 1N. Đặt cốc mẫu vào bể ổn nhiệt ở 60°C , bổ sung enzyme lipase thủy phân với hàm lượng lần lượt là: 0; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 và 0,06% so với khối lượng nguyên liệu, tiến hành thủy phân trong 3 giờ. Sau khi quá trình thủy phân kết thúc, mẫu được bất hoạt enzyme ở 95°C trong 15 phút, cốc mẫu được phân ly tách phần dịch protein thủy phân bằng cách lắng lọc ở môi trường không khí trong 30 phút. Phần dịch protein thủy phân được đồng hóa để đồng nhất mẫu, rồi lấy mẫu đánh giá hàm lượng lipít tổng. Mỗi thí nghiệm được tiến hành 3 lần, lấy kết quả giá trị trung bình. Dựa vào kết quả phân tích hàm lượng lipít trong mẫu, so sánh, đánh giá và lựa chọn được thời gian thủy phân bằng enzyme lipase thích hợp nhất. Sơ đồ bố trí thí nghiệm được thể hiện trong Hình 2.10.

2.2.4.2. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng lipase

Mục tiêu nghiên cứu:

Xác định được thời gian thủy phân phù hợp nhất cho quá trình thủy phân dịch protein bằng enzyme lipase để thu dịch protein thủy phân có hàm lượng lipít tổng thấp, chứa nhiều axit béo chưa bão hòa, phù hợp để làm nguồn thức ăn bổ sung cho tôm giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi và ứng dụng cho các lĩnh vực khác.



Hình 2.11. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng lipase

Cơ sở khoa học:

Phần dịch protein thủy phân thu nhận được sau khi thủy phân bằng enzyme alcalase có hàm lượng lipít cao hơn so với qui định [22] (*dịch protein thủy phân từ cá Tra thu được có hàm lượng lipít 10,80 %, trong khi đó yêu cầu thức ăn bổ sung cho tôm thẻ chân trắng theo TCVN-10325 : 2014 có hàm lượng lipít từ 6 – 7 %*), không đạt tiêu chuẩn để làm thức ăn bổ sung cho tôm thẻ chân trắng. Do vậy, cần phải tiếp tục thủy phân để chuyển hàm lượng lipít thành các axit béo tự do để thu được dịch protein thủy phân có hàm lượng lipít tổng thấp, chứa nhiều axit béo chưa bão hòa, đạt tiêu chuẩn để làm chất bổ sung vào thức ăn nuôi tôm và ứng dụng cho các lĩnh vực khác.

Nếu thời gian thủy phân kéo dài thì quá trình thủy phân xảy ra triệt để nhưng hiệu quả thủy phân không cao, ảnh hưởng chất lượng dịch thủy phân. Nếu thời gian thủy phân ngắn thì quá trình thủy phân chưa triệt để, hàm lượng lipit trong dịch cao, chất lượng dịch thủy phân thấp. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến quá trình thủy phân giai đoạn 2 được trình bày trong Hình 2.11.

Cách tiến hành thí nghiệm:

Phần dịch thủy phân hòa tan thu được từ 100g phế liệu cá Tra bằng alcalase ($180\text{ mL} \pm 5\text{ mL}$) được điều chỉnh pH môi trường về 5,0 bằng dung dịch HCL 1N. Đặt cốc mẫu vào bể ổn nhiệt ở 60°C , hàm lượng enzyme lipase bổ sung được sử dụng theo kết quả ở TN 2.2.4.1, thời gian thủy phân là 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ và 5 giờ. Sau khi quá trình thủy phân kết thúc, tiến hành bất hoạt enzyme ở 95°C trong 15 phút, cốc mẫu được phân ly tách phần dịch protein thủy phân bằng cách lắng lọc ở môi trường không khí trong 30 phút. Phần dịch protein thủy phân được đồng hóa để đồng nhất mẫu, tiến hành lấy mẫu đánh giá hàm lượng lipit tổng. Mỗi thí nghiệm được tiến hành 3 lần, lấy kết quả giá trị trung bình. Dựa vào kết quả phân tích hàm lượng lipit tổng trong mẫu, so sánh, đánh giá và lựa chọn được thời gian thủy phân bằng enzyme lipase thích hợp nhất. Sơ đồ bố trí thí nghiệm ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng lipase được thể hiện trong Hình 2.11.

2.2.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của các thông số đến quá trình thu nhận HA từ xương cá Tra thô

2.2.5.1. Khảo sát tiền xử lý nguyên liệu thu nhận xương cá Tra khô

Cách tiến hành thí nghiệm:

Quá trình tiền xử lý nhằm tách bỏ phần hữu cơ như protein, lipit từ lượng thịt còn sót lại trong xương cá Tra sau phi-lê và phần nội tạng cá ra khỏi xương cá để thu nhận phần xương cá Tra. Có nhiều cách khác nhau để tách bỏ phần hữu cơ trên nhưng phổ biến nhất là phương pháp đun sôi nước, nấu chín nguyên liệu và phương pháp thủy phân protein bằng enzyme. Luận án tiến hành xử lý nguyên liệu để thu nhận xương cá Tra khô theo cả hai trên, đồng thời đánh giá, so sánh tính chất sản phẩm HA. Cụ thể:

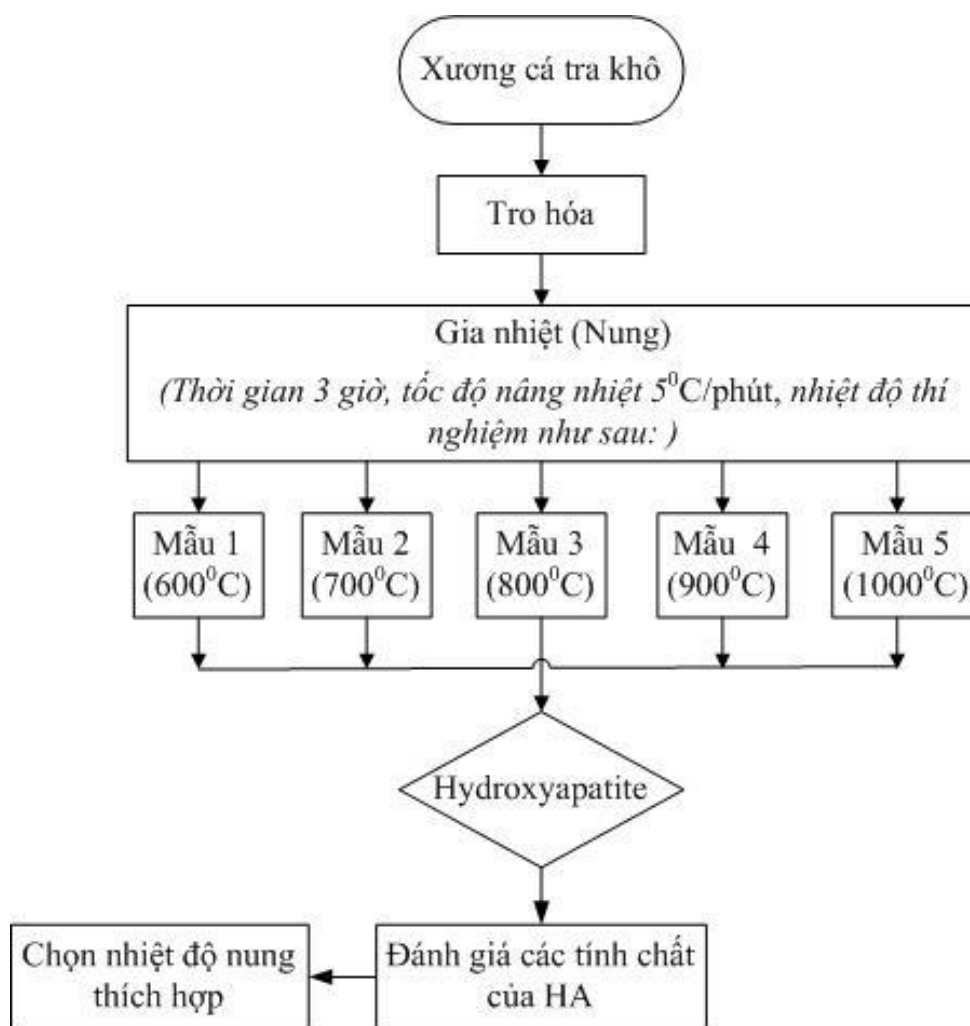
- **Phương pháp đun sôi [7,14]:** Túi mẫu 100g phế liệu cá Tra được cắt nhỏ từ 2 – 4 cm; 100g phế liệu cá được cho vào nồi chứa nước cất với tỷ lệ mẫu/nước là 1/10 (w/v), sau đó đun sôi mẫu ở 100°C trong thời gian 2 giờ. Mẫu được làm nguội và rửa

sạch bằng nước nóng 3 lần để loại bỏ các phần hữu cơ, thu nhận phần xương cá. Xương cá tiếp tục được sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi, thu được xương cá Tra khô.

- **Phương pháp thủy phân bằng enzyme:** thực hiện thủy phân phần hữu cơ trong phế liệu cá bằng enzyme alcalase 2,4 AU/g. Mẫu phế liệu cá Tra được xay nhỏ và đồng nhất, cân chia đều mỗi mẫu 100g mẫu/PE để sử dụng cho thí nghiệm. Cho 100g mẫu vào cốc thủy tinh 500 mL, thêm 100 mL nước cất, khuấy trộn đều, bịt kín cốc mẫu bằng giấy bạc. Đặt cốc mẫu vào bể ổn nhiệt ở 50°C, bổ sung enzyme alcalase với hàm lượng 0,6% so với khối lượng nguyên liệu, tiến hành thủy phân trong 4 giờ. Sau khi quá trình thủy phân kết thúc, tiến hành bất hoạt enzyme ở 95°C trong 15 phút, rồi đem cốc mẫu lọc để tách phần bã rắn và phần dịch lọc. Phần bã rắn (chủ yếu là xương cá) được rửa sạch bằng nước nóng 3 lần, sau đó sấy khô ở 100°C đến khối lượng không đổi, thu được xương cá Tra khô.

- Tiến hành đánh giá và so sánh các thành phần hữu cơ trong xương cá Tra khô sau khi thực hiện xử lý ở các phương pháp trên để lựa chọn phương pháp tiền xử lý phù hợp nhất thu nhận xương cá khô để sản xuất HA có chất lượng tốt nhất.

2.2.5.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ nung



Hình 2.12. Sơ đồ bố trí thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ nung đến quá trình thu nhận HA từ xương cá Tra khô.

Mục tiêu nghiên cứu:

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ nung đến quá trình thu nhận hydroxyapatite từ xương cá Tra khô. Xác định nhiệt độ nung thích hợp cho công đoạn nung để thu nhận hydroxyapatite dạng nano có các đặc tính SEM, TEM, XRD, FTIR, Ca/P gần giống với HA chuẩn. HA được sử dụng làm nguồn khoáng thử nghiệm bổ sung vào thức ăn tôm giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi và ứng dụng trong các lĩnh vực khác.

Cơ sở khoa học:

Nhiệt độ nung có ảnh hưởng lớn đến quá trình nung đốt cháy, loại bỏ các chất hữu cơ để thu nhận hydroxyapatite. Nhiệt độ thấp sẽ không đốt cháy hoàn toàn, không loại bỏ được hoàn toàn các hợp chất hữu cơ. Tuy nhiên, nhiệt độ quá cao cũng sẽ làm HA bị phá hủy chuyển sang dạng sản phẩm khác (β -Tricalcium phosphate), HA bị mất nước triệt để nên ảnh hưởng đến tính chất và hiệu suất thu nhận HA. Hình 2.12 trình bày sơ đồ bố trí

thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình nung thu nhận hydroxyapatite từ xương cá Tra.

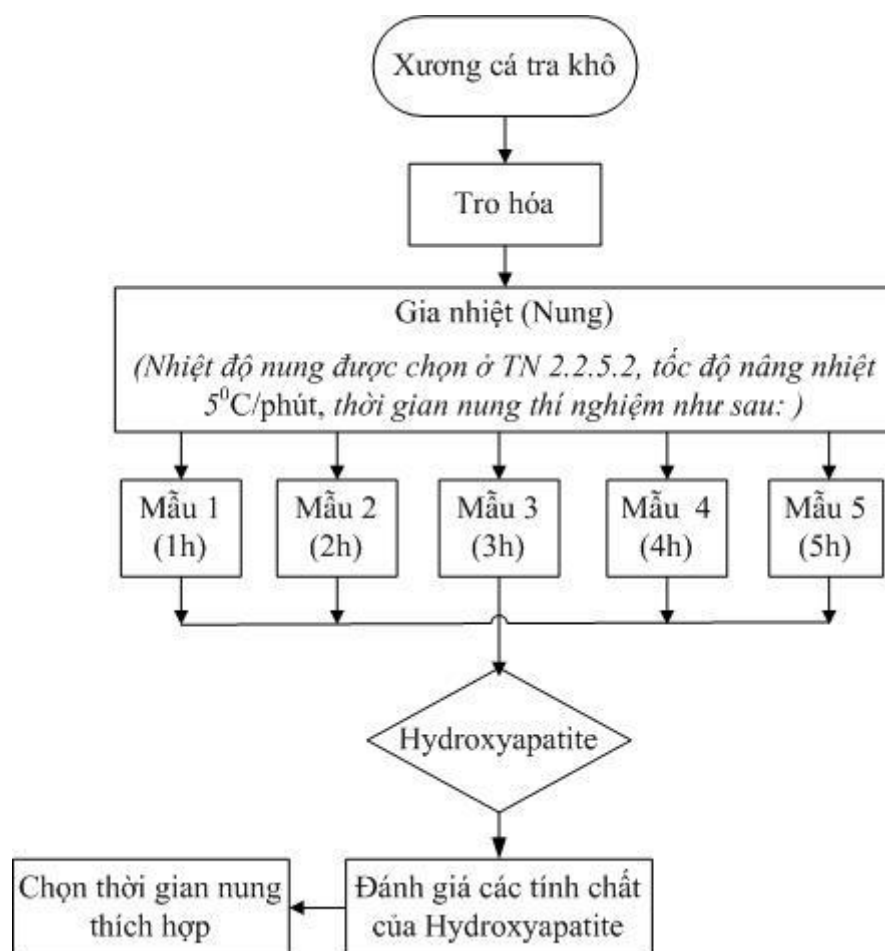
Cách tiến hành thí nghiệm:

Phần bã rắn thu được sau khi lọc của quá trình thủy phân phế liệu cá Tra được rửa qua nước sạch 3 lần để loại bỏ các phần hữu cơ trên bề mặt xương cá, để ráo và thực hiện sấy khô xương cá ở 105°C đến khối lượng không đổi. Cân 5g mẫu xương cá đã sấy khô, thực hiện tro hóa sơ bộ trên bếp điện để đốt cháy một phần chất hữu cơ dễ cháy trong mẫu, tránh hiện tượng mẫu bị bùng cháy trong lò nung, gây mất an toàn khi nung mẫu; sau đó cho mẫu vào lò nung, bật công tắc lò nung, đóng kín cửa, tiến hành nâng nhiệt lò nung từ nhiệt độ ban đầu đến nhiệt độ cần nung mẫu với tốc độ nâng nhiệt là 5°C/phút. Giữ nhiệt lò nung ở nhiệt độ nung mẫu trong 3 giờ, nhiệt độ giữ nhiệt nung lần lượt từ 600, 700, 800, 900 và 1000°C. Khi quá trình nung kết thúc, lấy mẫu ra khỏi lò nung và để nguội trong bình hút ẩm, cân khối lượng mẫu. Tiến hành đánh giá các đặc tính SEM, TEM, XRD, FTIR của mẫu HA để chọn nhiệt độ HA phù hợp nhất.

2.2.5.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nung

Mục tiêu nghiên cứu:

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nung đến quá trình thu nhận hydroxyapatite từ xương cá Tra thô. Thời gian nung được tính là thời gian giữ nhiệt để thực hiện quá trình nung, không bao gồm thời gian nâng nhiệt từ nhiệt độ ban đầu của tủ nung đến nhiệt độ nung. Xác định thời gian nung thích hợp cho công đoạn nung để thu nhận hydroxyapatite kích thước nano có các đặc tính SEM, TEM, XRD, FTIR, Ca/P gần giống với HA thương mại để sử dụng làm nguồn khoáng thử nghiệm bổ sung vào thức ăn tôm giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi và ứng dụng trong các lĩnh vực khác.



Hình 2.13. Sơ đồ bố trí thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nung đến HA từ xương cá Tra

Cơ sở khoa học:

Thời gian nung có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả quá trình nung đốt cháy, loại bỏ các chất hữu cơ như protein, lipit để thu nhận hydroxyapatite. Khi thời gian nung ngắn, các hợp chất hữu cơ chưa được đốt cháy, loại bỏ hoàn toàn, đặc biệt là các hợp chất hữu cơ liên kết bên trong xương cá. Tuy nhiên, thời gian nung quá dài sẽ làm phân hủy HA chuyển sang dạng sản phẩm khác (β -Tricalcium phosphate), ngoài ra, thời gian nung dài thì HA sẽ bị mất nước triệt để nên ảnh hưởng lớn đến tính chất, hiệu suất thu nhận và tăng chi phí năng lượng khi sản xuất HA. Hình 2.13 trình bày sơ đồ bố trí thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình nung thu nhận hydroxyapatite từ xương cá Tra.

Cách tiến hành thí nghiệm:

Phần rắn thu được sau công đoạn lọc của quá trình thủy phân phế liệu cá Tra được rửa bằng nước sạch 3 lần để loại bỏ các phần hữu cơ trên bề mặt xương cá, để ráo, thực hiện sấy khô mẫu xương cá ở 105°C đến khối lượng không đổi. Cân 5g mẫu xương cá đã sấy khô, thực hiện tro hóa sơ bộ trên bếp điện để đốt cháy một phần chất

hữu cơ dễ cháy trong mẫu, tránh hiện tượng mẫu bị bùng cháy trong lò nung, gây mất an toàn khi nung mẫu; sau đó cho mẫu vào tủ nung, bật công tắc lò nung, đóng kín cửa, tiến hành nung mẫu với nhiệt độ nung được lựa chọn từ thí nghiệm ảnh hưởng của nhiệt độ ở thí nghiệm 2.2.5.1, tốc độ nâng nhiệt từ nhiệt độ ban đầu của tủ nung đến nhiệt độ nung là 5°C/phút, thời gian giữ nhiệt nung lần lượt là 1, 2, 3, 4 và 5 giờ. Khi quá trình nung kết thúc, lấy mẫu ra khỏi lò nung và để nguội trong bình hút ẩm, cân khối lượng mẫu. Tiến hành đánh giá các đặc tính SEM, TEM, XRD, FTIR của mẫu HA để chọn thời gian nung HA phù hợp nhất.

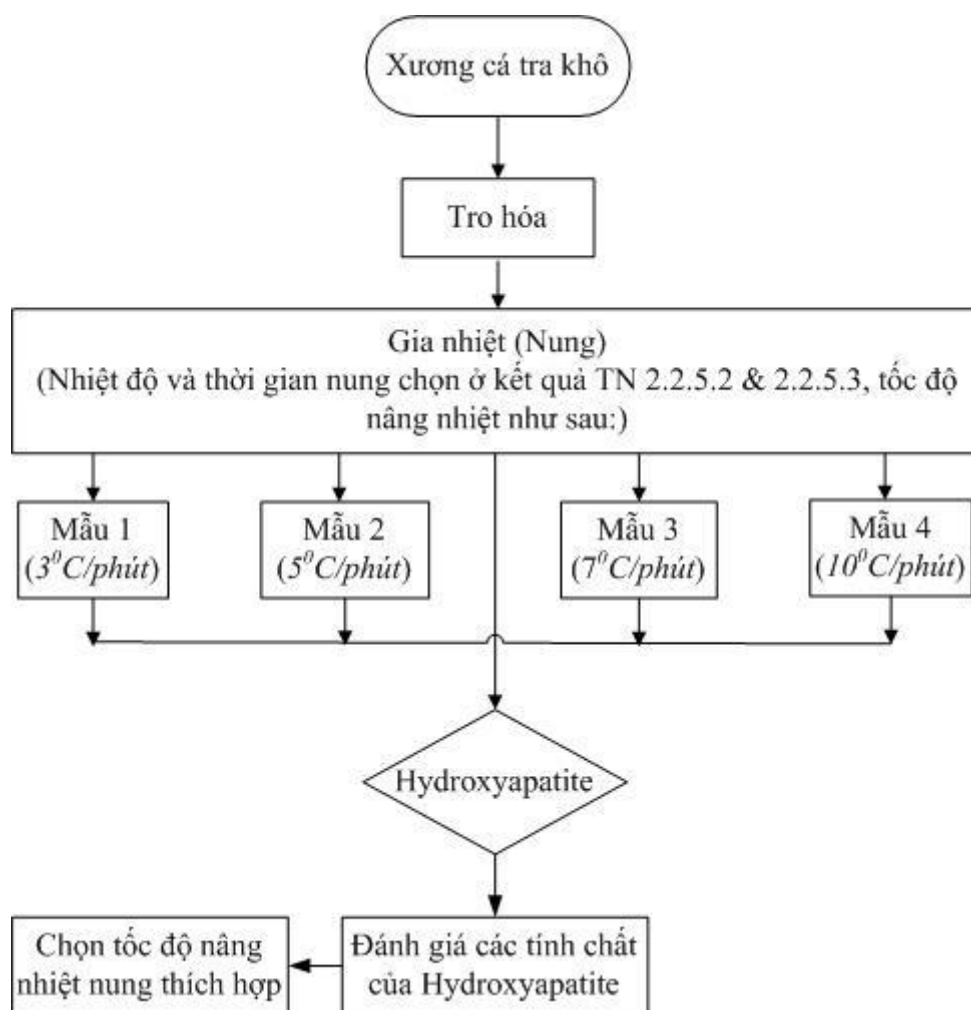
2.2.5.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ gia nhiệt nung

Mục tiêu nghiên cứu:

Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ gia nhiệt nung đến quá trình đốt cháy, loại bỏ các hợp chất hữu cơ để thu nhận hydroxyapatite từ xương cá Tra. Xác định tốc độ gia nhiệt nung thích hợp cho công đoạn nung để thu nhận hydroxyapatite kích thước nano có các đặc tính SEM, TEM, XRD, FTIR, Ca/P gần giống với HA thương mại để sử dụng làm nguồn khoáng thử nghiệm bổ sung vào thức ăn tôm giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi và ứng dụng trong các lĩnh vực khác.

Cơ sở khoa học:

Tốc độ gia nhiệt có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả quá trình nung đốt cháy, loại bỏ các chất hữu cơ để thu nhận hydroxyapatite. Tốc độ gia nhiệt nhỏ, nhiệt độ nung tăng chậm sẽ làm kéo dài thời gian nung, chưa loại bỏ được hoàn toàn các hợp chất hữu cơ nằm sâu bên trong khối xương, ngoài ra còn làm tăng chi phí năng lượng. Tuy nhiên, tốc độ nâng nhiệt quá lớn sẽ dẫn đến loại bỏ, đốt cháy được phần phi HA trên bề mặt mà chưa loại bỏ được các hợp chất hữu cơ sâu bên trong xương cá, ngoài ra tốc độ gia nhiệt lớn còn làm đốt cháy luôn cả phần HA bên ngoài, không an toàn cho thiết bị và con người. Hình 2.14 trình bày sơ đồ bố trí thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ gia nhiệt đến quá trình nung thu nhận hydroxyapatite từ xương cá Tra.



Hình 2.14. Sơ đồ bố trí thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ gia nhiệt HA từ xương cá Tra.

Cách tiến hành thí nghiệm:

Phần rắn thu được sau công đoạn lọc của quá trình thủy phân phế liệu cá Tra được rửa sạch 3 lần bằng nước sạch để loại bỏ phần hữu cơ trên bề mặt xương cá, để ráo, đem mẫu xương cá sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi. Cân 5g mẫu xương cá đã sấy khô, thực hiện tro hóa mẫu sơ bộ trên bếp điện để đốt cháy một phần chất hữu cơ dễ cháy trong mẫu, tránh hiện tượng mẫu bị bùng cháy trong lò nung, gây mất an toàn khi nung mẫu; sau đó cho mẫu vào tủ nung, bật công tắc lò nung, đóng kín cửa, sau đó tiến hành nung mẫu ở nhiệt độ giữ nhiệt nung được lựa chọn từ thí nghiệm ảnh hưởng của nhiệt độ ở thí nghiệm 2.2.5.2, thời gian nung được lựa chọn từ thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nung ở thí nghiệm 2.2.5.3 và với các tốc độ nâng nhiệt từ nhiệt độ ban đầu của tủ nung đến nhiệt độ giữ nhiệt nung lần lượt là 3°C/phút, 5°C/phút, 7°C/phút, 10°C/phút. Khi quá trình nung kết thúc, lấy mẫu ra khỏi lò nung và để nguội trong bình hút ẩm, cân khối

lượng mẫu. Tiến hành đánh giá các đặc tính SEM, TEM, XRD, FTIR của mẫu HA để chọn tốc độ nâng nhiệt nung HA phù hợp nhất.

2.2.6. Nghiên cứu thử nghiệm bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy phân (FPH) và hydroxyapatite (HA) vào thức ăn tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi.

Hầu hết thức ăn tôm thương mại có chứa từ 35 - 50% protein và được sử dụng tùy thuộc vào kích cỡ tôm ở các giai đoạn khác nhau [101,156]. Protein yêu cầu cao đối với tôm post và tôm nhỏ, nhưng giảm dần khi tôm phát triển lớn hơn. Nếu mức protein trong thức ăn quá thấp, tốc độ tăng trưởng sẽ giảm. Sự thiếu hụt protein nghiêm trọng có thể dẫn đến khối lượng tôm bị sụt giảm trong quá trình nuôi. Protein dư thừa trong chế độ ăn của tôm cũng có thể ức chế sự phát triển của tôm.

Tôm có khả năng hấp thụ canxi trực tiếp từ nước, và tôm sống trong nước biển không cần bổ sung canxi trong chế độ ăn uống [54]. Trong khẩu phần ăn cho tôm nuôi, hàm lượng khoáng canxi khoảng gần 2,5%. Đối với tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus*, nhu cầu khoáng photpho phụ thuộc vào hàm lượng canxi trong chế độ ăn uống, và nếu không có canxi, thì 0,34% photpho là đủ cho sự sinh trưởng và phát triển bình thường. Khẩu phần ăn tôm thường chứa tới 1% photpho trong khẩu phần. Canxi và photpho thường được bổ sung vào chế độ ăn của tôm dưới dạng muối canxi photphat [156].

Hỗn hợp dịch protein thủy phân và HA thu nhận từ phế liệu cá Tra được bổ sung vào thức ăn thương mại nuôi tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi nhằm đánh giá sự tương thích, tạo nguồn và tăng sản lượng protein, đa dạng nguồn protein cho sản xuất thức ăn tôm.

Mục tiêu nghiên cứu:

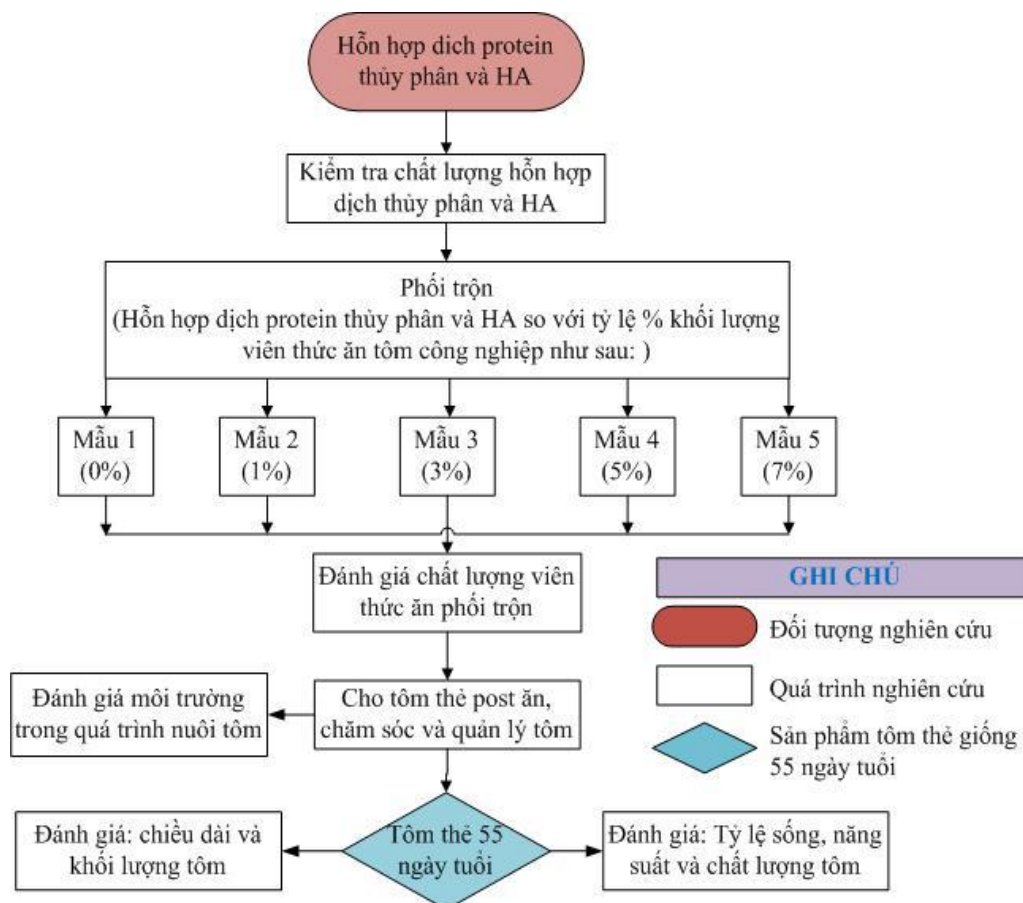
Xác định được hàm lượng hỗn hợp dịch FPH và HA thu nhận từ phế liệu cá Tra bổ sung vào thức ăn tôm thẻ chân trắng 20 – 55 ngày tuổi phù hợp để tôm tăng trưởng và phát triển nhưng không làm ảnh hưởng các chỉ tiêu hóa lý và ô nhiễm của môi trường nước nuôi tôm. Đánh giá, so sánh sự tăng trưởng và phát triển của tôm khi có bổ và không bổ sung hỗn hợp dịch FPH và HA vào thức ăn tôm thương mại trong thực nghiệm nuôi tôm.

Cơ sở khoa học:

Thí nghiệm về thử nghiệm ứng dụng hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung vào thức ăn tôm dựa trên cơ sở khoa học như sau:

Tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi cần nhu cầu dinh dưỡng trong thức ăn về hàm lượng protein từ 30 - 35% [101,156] trong thức ăn tôm và hàm lượng khoáng

cho sinh trưởng và phát triển. Trong khi đó, dịch FPH thu nhận từ phế liệu cá Tra của Luận án có hàm lượng được đậm tổng 33,2%, hàm lượng lipit 1,93% và HA thu nhận từ phế liệu cá Tra dạng nano, có hàm lượng khoáng canxi, photpho cao rất phù hợp để làm thức ăn cho tôm thẻ chân trắng theo TCVN-10325 : 2014 thúc đẩy nhanh quá trình tăng trưởng của tôm. Hình 2.15 trình bày sơ đồ bố trí thí nghiệm ảnh hưởng của hàm lượng dịch FPH và HA bổ sung vào thức ăn tôm.



Hình 2.15. Sơ đồ bố trí thí nghiệm ảnh hưởng của hàm lượng hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung vào thức ăn tôm.

Cách bố trí thí nghiệm:

Hệ thống bể thí nghiệm nuôi thử nghiệm tôm gồm có 05 bể được đánh số thứ tự 1, 2, 3, 4, 5 tương ứng với 5 nghiệm thức từ NT1, NT2, NT3, NT4 và NT5. Bể nuôi có dạng hình khối trụ chữ nhật, làm bằng vật liệu composit, thể tích bể 250 lít, thể tích sử dụng 200 lít/bể, mật độ tôm thả nuôi 250 con/lít, mỗi nghiệm thức nuôi được lặp lại 3 lần, nước nuôi có độ mặn 30‰.

- + Nghiệm thức 1: Không bổ sung hỗn hợp dịch FPH và HA (Mẫu đối chứng).
- + Nghiệm thức 2: Bổ sung hỗn hợp dịch FPH và HA 1%
- + Nghiệm thức 3: Bổ sung hỗn hợp dịch FPH và HA 3%

+ Nghiệm thức 4: Bổ sung hỗn hợp dịch FPH và HA 5%

+ Nghiệm thức 5: Bổ sung hỗn hợp dịch FPH và HA 7%

Nguồn nước nuôi tôm: Nước ngọt được lấy từ nguồn nước máy tại thành phố Nha Trang và nước ót có độ mặn 110‰, nước mặn được lấy từ Vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa. Nước sau khi pha đến độ mặn 30‰ được xử lý bằng chlorine 50 g/m³ và sục khí mạnh đến khi hết chlorine trong nước, sau đó nước được lọc qua ống vi lọc 1 µm trước khi sử dụng để làm thí nghiệm.

Cách thực hiện thí nghiệm và chăm sóc, quản lý tôm:

Dịch protein thu nhận từ phế liệu cá Tra sau khi thủy phân bằng alcalase và lipase được cô đặc ở điều kiện áp suất chân không của thiết bị là 720 mmHg, nhiệt độ 60°C, thời gian 2 giờ [2] để thu dịch protein thủy phân cô đặc có hàm lượng chất khô 40,6%, hàm lượng protein 33,2%, hàm lượng lipít 1,93%, hàm lượng axit amin 420,16 mg/g protein, 70% dịch thủy phân có khối lượng phân tử < 1000 Da để sử dụng bổ sung vào thức ăn tôm giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi.

HA thu nhận từ xương cá Tra được điều chế theo điều kiện đã nghiên cứu ở trên được phân bố vào dịch protein thủy phân cô đặc với nồng độ 50 ppm [18].

Hỗn hợp dịch FPH và HA từ phế liệu cá Tra được bổ sung một lượng 0, 1, 3, 5 và 7% so với khối lượng thức ăn thương mại số 1 của hãng CP, Thái Lan đang sử dụng cho tôm ăn vào thức ăn của tôm thí nghiệm giai đoạn từ 20 – 55 ngày tuổi. Thức ăn dạng bột mịn, mùi thơm tự nhiên; kích thước < 0,6mm; protein tổng từ 38 – 42%; lipít tổng 6 – 8%; glucit 3%; canxi 2 – 3%; photpho từ 1 – 2%, độ ẩm 11%. Cách thực hiện phối trộn như sau: hỗn hợp dịch protein thủy phân cô đặc và HA cho vào bình phun tia, lắc đều và phun trộn đều vào thức ăn tôm thương mại, thực hiện sấy khô viên thức ăn đến độ ẩm 11%, rồi mang thức ăn cho tôm ăn trong 05 bể theo đúng qui định cho tôm ăn. Tiến hành cho tôm ăn 4 lần/ngày trong cả giai đoạn nuôi chăm sóc và suốt quá trình thí nghiệm. Với 15 ngày đầu cho tôm ăn 2 lần Artemia mới nở 4 g/m³/lần, 2 lần thức ăn thương mại Frippak-150 từ 2-6 g/m³/lần [16], sau đó tôm ở giai đoạn từ ngày thứ 20 đến ngày 55 sử dụng thức ăn thương mại số 1 của nhà sản xuất CP, Thái Lan và bổ sung hỗn hợp dịch FPH và HA từ phế liệu cá Tra để cho tôm ăn. Thực hiện siphon – thay nước trong quá trình nuôi tôm: thay nước 80% lượng nước/3lần/ngày cho giai đoạn tôm từ post 12 đến post 15 và thay nước 100% cho tôm giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi.

Môi trường nuôi được kiểm soát các thông số hóa lý như: nhiệt độ, pH, độ kiềm, NO_2^- , NH_4^+ , DO. Mức độ ô nhiễm môi trường nuôi tôm được đánh giá bằng 02 chỉ tiêu: tổng vi khuẩn, tổng vi khuẩn vibrio để đảm bảo môi trường nuôi không làm ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của tôm. Hệ thống bể thí nghiệm nuôi tôm được mô tả trong Hình 2.16.

Các chỉ tiêu theo dõi trong quá trình thí nghiệm:

Các chỉ tiêu môi trường theo dõi gồm: Nhiệt độ và pH được đo 2 lần/ngày vào lúc 7:00 giờ sáng và 15:00 giờ chiều bằng nhiệt kế và máy đo pH (HI98127 – Hanna, Mỹ) đã được kiểm Tra độ chính xác; độ kiềm, nitrite, DO được đo 3 ngày/lần. Độ kiềm được phân tích theo phương pháp chuẩn độ axít, DO được phân tích theo phương pháp Indophenol Blue; độ kiềm, NO_2^- , NH_4^+ , được xác định bằng bộ test SERA.

Các chỉ tiêu vi sinh: Thu mẫu, phân tích vi khuẩn tổng số và vi khuẩn vibrio 1 tuần/lần trong nước. Mật độ vi khuẩn tổng được xác định bằng phương pháp pha loãng và đếm trên đĩa thạch Nutrient agar có bổ sung 1,5% NaCl (NA) [75]. Tương tự, mật độ vibrio tổng số được xác định bằng phương pháp pha loãng và đếm trên đĩa thạch TCBS (Thiosulfat Citrate Bile Salt Surcose). Cụ thể, mẫu nước ban đầu (nồng độ 100) được pha loãng với nước muối 0,85% ra 3 nồng độ khác nhau: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Sau đó, lấy 100 μl từ mỗi nồng độ pha loãng của mẫu nước cho vào đĩa môi trường NA hoặc TCBS, dùng que thủy tinh trải dàn đều, mỗi nồng độ lặp lại 2 lần. Ủ đĩa môi trường ở 28°C trong 24 giờ và xác định kết quả với công thức: Mật độ vi khuẩn (CFU/mL) = Số khuẩn lạc x độ pha loãng x 10.

Các chỉ tiêu theo dõi tôm:

Thu ngẫu nhiên 20 mẫu tôm, đo chiều dài tổng tôm ở các giai đoạn 12 ngày tuổi bằng kính hiển vi có trục vi thị kính. Đối với tôm các giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi đo chiều dài tổng bằng thước đo có thang đo 0,1mm và khối lượng thân tôm bằng cân tiểu li với độ chính xác 1 mg. Chiều dài tổng tôm được tính từ phần đầu chuyển tôm đến điểm cuối đuôi tôm. Trong quá trình đo chiều dài thì tôm được cố định để đảm bảo con tôm ở vị trí thẳng đứng nhất rồi thực hiện đo chiều dài tổng của tôm để cho kết quả nhanh, chính xác và đảm bảo tôm còn sống, số liệu kết quả thu được là giá trị trung bình của 20 lần đo.



Hình 2.16. Hệ thống bể thí nghiệm nuôi thử nghiệm tôm.

Khối lượng tôm được tính theo khối lượng con tôm ướt (tính theo khối lượng tịnh của nguyên liệu) trong khi đo. Kết quả đo khối lượng tôm dựa theo quy định về ghi khối lượng tịnh trên nhãn sản phẩm của Cục Quản lý Chất lượng Nông lâm sản và Thủy sản (Nafiqad) thì khối lượng tịnh hay khối lượng sản phẩm được thể hiện là Net weight (khối lượng tịnh).

Tỷ lệ sống được xác định khi tôm đạt giai đoạn 55 ngày tuổi. Tỷ lệ sống (%) = $\frac{\text{Tổng số tôm thu hoạch (con)} \times 100}{\text{tổng số tôm thả ban đầu (con)}}$.

Năng suất tôm thu hoạch được xác định là trọng lượng tôm thu hoạch trung bình của các bể thí nghiệm (kg/m^2).

Đánh giá chất lượng của tôm 55 ngày tuổi (Tôm kết thúc thí nghiệm):

Phương pháp đánh giá chất lượng tôm thể 55 ngày tuổi dựa theo tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8398: 2012 [23].

- **Cách thực hiện:** Phương pháp gây sốc bằng formol 100 ppm: Thu ngẫu nhiên 100 tôm 55 ngày tuổi cho vào cốc chứa 1 lít nước, cho formol vào cốc chứa tôm với nồng độ 100 ppm, sau 30 phút. Nếu tỉ lệ tôm sống là 100% là tôm có chất lượng tốt.

Ngoài ra để đánh giá chất lượng vỏ tôm thể 55 ngày tuổi, tiến hành thực hiện 2 chỉ tiêu đánh giá về hình dạng và độ rắn cấu trúc của vỏ tôm được xác định bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM, S-4800, Hitachi) và nhiễu xạ tia X (XRD, PANalytical, X'Pert-PRO MPD) với bức xạ Cu K α tương ứng.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Phân tích phân tích các chỉ tiêu vật lý

- Đo nhiệt độ bằng nhiệt kế điện tử cầm tay với thang đo từ 0 – 100°C (HI98501 – Hanna, Mỹ).
- Đo pH bằng máy đo pH cầm tay (HI98127 – Hanna, Mỹ).
- Đo chiều dài tổng ở các giai đoạn 12 ngày tuổi bằng kính hiển vi có trục vị thị kính. Đối với tôm các giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi đo chiều dài tổng bằng thước đo có thang đo 0,1mm.
- Cân khối lượng tôm bằng cân tiểu li với độ chính xác 1 mg.
- Phương pháp đánh giá chất lượng tôm thẻ 55 ngày tuổi dựa theo tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8398: 2012

2.3.2. Phân tích phân tích các chỉ tiêu hóa học

- Hàm lượng protein thô được xác định bằng phương pháp Kjeldahl.
- Hàm lượng tro được xác định theo phương pháp chuẩn của AOAC.
- Hàm lượng lipit tổng số bằng phương pháp Folch (1957).
- Hàm lượng nước được xác định theo phương pháp chuẩn của AOAC.
- Xác định DH theo phương pháp DNFB (Phụ lục 1.6 - Phụ lục các phương pháp phân tích).

- Xác định hiệu suất thu hồi nitơ (NR) theo công thức sau:

$$NR = \frac{N_{sp}}{N_{NL}} \times 100 (\%)$$

N_{sp} : Hàm lượng nitơ tổng số có trong dịch thủy phân thu được.

N_{NL} : Hàm lượng nitơ tổng số có trong 100g phế liệu cá Tra.

- Xác định thành phần và hàm lượng đạm axit amin bằng Kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).
- Xác định khối lượng phân tử bằng phương pháp sắc ký gell thấm qua (GPC).
- Phân tích hàm lượng kim loại bằng phương pháp Hệ thống khối phổ plasma ghép cặp cảm ứng ICP-MS.
- Phân tích hàm lượng oxit kim loại bằng phương pháp XRF.
- Xác định thành phần nguyên tố của HA bằng phổ XPS.
- Xác định diện tích bề mặt của HA bằng phương pháp Brunauer–Emmett–Teller

- Các thông tin về cấu trúc hóa học được xác định bằng phổ FTIR (Nicolet iS10, Thermo Scientific) với số sóng 500–4000 cm^{-1} .
- Độ rắn cấu trúc hydroxyapatite được xác định bằng XRD (PANalytical, X'Pert-PRO MPD).
- Cấu trúc bề mặt, hình dạng và kích thước của hydroxyapatite được kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử SEM (Hitachi, S-4200).
- Đo độ kiềm, NO_2^- , NH_4^+ , được xác định bằng bộ test SERA.

2.3.3. Phân tích phân tích các chỉ tiêu cảm quan

- Đánh giá chỉ tiêu cảm quan theo TCVN 3215–79.
- Đánh giá chất lượng thức ăn tôm theo TCVN–10325 : 2014

2.3.4. Phân tích phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật

- Mật độ vi khuẩn tổng được xác định bằng phương pháp pha loãng và đếm trên đĩa thạch Nutrient agar có bổ sung 1,5% NaCl (NA).
- Mật độ vibrio tổng số được xác định bằng phương pháp pha loãng và đếm trên đĩa thạch TCBS (Thiosulfat Citrate Bile Salt Surcose).

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm SPSS phân tích ANOVA kết hợp với Duncan test, T-test để so sánh giá trị trung bình của các mẫu nghiên cứu. Vẽ đồ thị bằng phần mềm Origin 10.2. Tất cả thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu báo cáo là giá trị trung bình của 3 lần phân tích, giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa về mặt thống kê.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu những tính chất của phế liệu cá Tra

Trước khi lựa chọn phương pháp, tác nhân thủy phân và các thông số cho quá trình thu nhận các sản phẩm, thành phần phế liệu cá được đánh giá. Kết quả phân tích được trình bày trong Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Thành phần khối lượng và hóa học của phế liệu cá Tra

Thông số		Hàm lượng (%)
<i>Thành phần khối lượng</i>		
	Đầu	45,25 ± 0,45
	Nội tạng	21,30 ± 0,23
	Xương	28,95 ± 0,28
	Vây, đuôi	4,5 ± 0,15
<i>Thành phần hóa học</i>	<i>Hàm lượng theo nguyên liệu</i>	<i>Hàm lượng theo chất khô</i>
	Protein	14,66 ± 0,75 42,62± 0,75
	Lipít	14,60 ± 0,63 41,85± 0,63
	Nước	65,11 ± 0,68 -
	Khoáng	5,63 ± 0,15 15,53 ± 0,15

Phế liệu cá Tra được thu gom từ dây chuyền chế biến cá Tra phi-lê đông lạnh của Công ty Chế biến Thủy sản Nam Việt, tỉnh An Giang; nguyên liệu cá Tra sử dụng có kích cỡ 1,2 – 1,5 kg/con (*Đối với nghiên cứu về ảnh hưởng kích cỡ nguyên liệu sử dụng phế liệu từ cá Tra có kích cỡ từ 0,5 – 2,0 kg/con*). Phế liệu cá được thu gom ngay sau công đoạn phi-lê và phân chia phế liệu theo các phần: đầu, nội tạng, khung xương và vây đuôi để xác định thành phần khối lượng của phế liệu, quá trình được thực hiện lặp lại 3 lần, lấy kết quả trung bình. Bảng 3.1 cho thấy, thành phần khối lượng phế liệu cá Tra tính theo hàm lượng chất khô chứa chủ yếu là đầu (45,25%) và xương (28,95%), phần còn lại là nội tạng (21,30%) và một lượng nhỏ vây, đuôi (4,5%). Từ kết quả này lựa chọn phương pháp xay phế liệu bằng máy xay trục vít trước khi đông nhất mẫu. Ngoài ra, với lượng nội tạng khá cao và phế liệu cá Tra nên mẫu phế liệu cần được bảo quản ở nhiệt độ -18°C để sử dụng dần trong quá trình thí nghiệm.

Về thành phần hóa học, phế liệu cá Tra có 3 phần chính bao gồm protein (42,62%), lipít (41,85%) và khoáng (15,53%). Tất cả các thành phần trên đều có thể được sử dụng

để sản xuất các sản phẩm có giá trị gia tăng. Các nghiên cứu cho thấy protein trong phế liệu cá có thể được thủy phân tạo thành dịch FPH và được thử nghiệm ứng dụng cho thực phẩm, nông nghiệp và nuôi thủy sản [39,86,136]. Phần khoáng trong phế liệu cá Tra chứa chủ yếu là HA, đây là thành phần chính trong xương và răng của động vật [26]. Do đó, nhiều nghiên cứu tách chiết HA từ xương cá và thử nghiệm ứng dụng làm vật liệu sinh học trong các lĩnh vực như giải phẫu thẩm mỹ, xương giả, chất tái tạo xương, chất chống loãng xương [26]. Phần lipid của phế liệu cá Tra là nguồn nguyên liệu tiềm năng để sản xuất dầu cá giàu vitamin A và các axit béo không no (chủ yếu là EPA và DHA) sử dụng cho người [165]. Tuy nhiên, hàm lượng lipid cao (42,02%) nên có thể ảnh hưởng đến việc lựa chọn phương pháp, các thông số và tác nhân trong quá trình thủy phân thu nhận FPH, HA và thu hồi lipid. Do đó, cần nghiên cứu phương pháp xử lý nguyên liệu và ảnh hưởng của lipid đến hiệu quả của quá trình thủy phân phế liệu cá Tra.

Như vậy, dựa trên kết quả phân tích thành phần hóa học cơ bản trong phế liệu cá Tra cho thấy các thành phần như protein, lipid, khoáng có trong phế liệu cá Tra. Trong đó, hàm lượng protein cao (42,62%), khoáng (15,53%) nhưng hàm lượng lipid rất cao (41,85%) so với các phế liệu cá khác. Do đó, cần phải có nghiên cứu tách lipid trong phế liệu cá Tra trước khi thủy phân để đạt được mục đích thủy phân.

3.2. Nghiên cứu tách lipid từ phế liệu cá Tra

Phế liệu cá Tra có hàm lượng lipid cao (14,60%, tính theo nguyên liệu) có thể ảnh hưởng lớn đến quá trình thủy phân. Do vậy, cần phải nghiên cứu phương pháp tiền xử lý phế liệu cá Tra thích hợp để tách lipid trước khi thủy phân để nguyên liệu phế liệu cá Tra có hàm lượng lipid còn lại ít nhất tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình thủy phân.

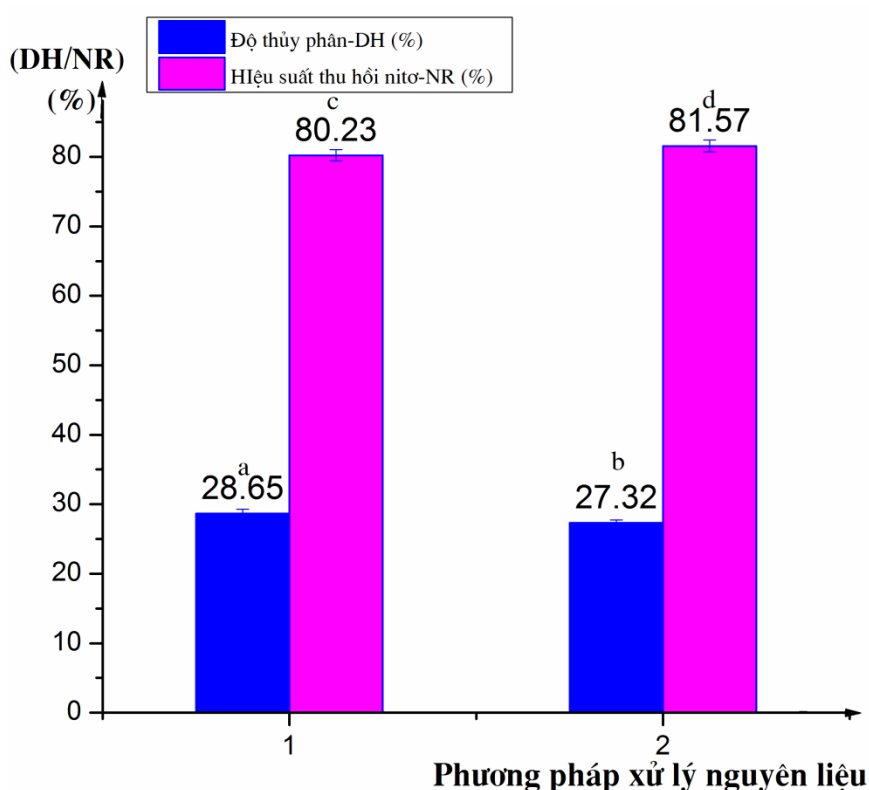
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của các phương pháp tách lipid phế liệu cá Tra

Phương pháp	Hàm lượng lipid được tách ra (%)	Hàm lượng lipid và protein còn lại, theo nguyên liệu (%)	
		Lipid	Protein
Nấu chín – ép	61,92 ± 0,85	5,56 ± 0,48	10,48 ± 0,53
Không tách lipid	0	14,60 ± 0,63	14,66 ± 0,75

Từ Bảng 3.2 thấy rằng, khi xử lý nguyên liệu theo phương pháp Nấu chín – ép, hàm lượng lipid được tách ra khỏi nguyên liệu là 61,92%. Khi gia nhiệt nấu chín

nguyên liệu, một phần lipít liên kết với các phân tử protein sẽ bị cắt đứt và khi ép sẽ được tách ra ngoài cùng với lipít trên bề mặt nguyên liệu. Do vậy, khi xử lý nguyên liệu theo phương pháp Nấu chín – ép, hàm lượng lipít còn lại trong nguyên liệu (5,56%). Tuy nhiên, khi xử lý nguyên liệu tách lipít, dưới tác động của gia nhiệt nấu chín và ép, một phần protein bị tổn thất do nhiệt, một phần bị ép tách ra cùng với lipít, do đó sẽ có một lượng protein bị tách và làm giảm hàm lượng protein trong nguyên liệu, hàm lượng protein còn lại trong nguyên liệu là 10,48% sẽ ảnh hưởng rất lớn hiệu suất thu hồi đạm trong quá trình thủy phân.

Để làm rõ hơn ảnh hưởng của các phương pháp xử lý tách lipít trong phế liệu cá Tra trước thủy phân, phế liệu cá sau khi xử lý được thủy phân để thu nhận dịch protein. Kết quả được biểu diễn trên đồ thị Hình 3.1.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của phương pháp xử lý nguyên liệu đến DH và NR của dịch protein thủy phân.

Từ đồ thị Hình 3.1, ta thấy rằng, giá trị DH sẽ tăng từ 27,32% đến 28,85%, khi phế liệu được xử lý trước khi thủy phân. Đối với mẫu 1, phế liệu được hấp chín, ép tách dịch lỏng, dịch protein thủy phân thu nhận có giá trị DH cao hơn so với mẫu 2, nguyên liệu không xử lý, giá trị DH tương ứng của các mẫu là 28,85% và 27,32%. Thực hiện xử lý thống kê kết quả thí nghiệm thu được thấy rằng, DH của dịch thủy

phân có xử lý nguyên liệu theo phương pháp 1 có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với phương pháp 2, mẫu 2 (không xử lý nguyên liệu trước khi thủy phân).

Đối với giá trị NR của mẫu 1 đạt 80,23% thấp hơn giá trị NR của mẫu 2 là 81,57%, sự khác nhau giá trị NR của 2 mẫu không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). NR của mẫu xử lý trước khi thủy phân giảm xuống có thể do khi tiến hành xử lý nguyên liệu sẽ làm tổn thất 1 phần dịch đậm protein thoát ra theo phần lỏng khi xử lý. Vì vậy, phương pháp tiền xử lý nguyên liệu không ảnh hưởng lớn đến DH và NR của dịch thủy phân.

Do vậy, tùy theo mục đích và điều kiện thủy phân thu nhận sản phẩm dịch thủy phân protein có thể chọn phương pháp xử lý nguyên liệu trước khi thủy phân cho phù hợp. Với mục tiêu thủy phân phế liệu cá Tra thu nhận dịch protein thủy phân ứng dụng bổ sung vào thức ăn tôm thẻ chân trắng 20 – 55 ngày tuổi, chọn phương pháp không xử lý nguyên liệu trước khi thủy phân.

3.3. Nghiên cứu những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân protein trong phế liệu cá Tra bằng enzyme alcalase

Để đánh giá hiệu quả của quá trình thủy phân phế liệu cá Tra bằng enzyme cho các nội dung nghiên cứu cho cũng như đạt được mục đích, phù hợp phạm vi nghiên cứu của Luận án này, NCS đánh giá bằng 02 chỉ tiêu DH và NR của dịch protein thủy phân

- Độ thủy phân (DH - Degree Hydrolysis): là một thông số cơ bản để mô tả đặc tính, tính chất và quá trình sản xuất của dịch protein thủy phân [86,165]. DH là tỉ số liên kết peptit bị cắt đứt khi thủy phân bằng enzyme và tổng số liên kết peptit ban đầu trong một đơn vị khối lượng protein sử dụng cho quá trình thủy phân. Với mỗi liên kết peptit bị cắt đứt sẽ làm giảm khối lượng phân tử của cơ chất (protein) ban đầu, tạo ra các sản phẩm thủy phân có khối lượng phân tử nhỏ hơn. Mục đích của quá trình thủy phân làm cho số liên kết peptit của cơ chất ban đầu bị cắt đứt càng nhiều, DH càng cao, sản phẩm tạo thành của quá trình thủy phân có khối lượng phân tử càng nhỏ và sản phẩm cuối cùng mong muốn là các axit amin dễ hòa tan, dễ hấp thụ, sản phẩm thủy phân có chất lượng tốt. Do vậy, DH của dịch protein thủy phân thu nhận từ quá trình thủy phân cơ chất ban đầu (protein) là một trong những yếu tố phản ánh hiệu quả, chất lượng của quá trình thủy phân. DH có thể đạt đến giá trị tuyệt đối mong muốn 100% khi quá trình thủy phân bằng enzyme hoàn hảo. Tuy nhiên trong thực tế thủy phân protein bằng enzyme

khó đạt được điều này do quá trình thủy phân bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như: enzyme, nhiệt độ, thời gian, nồng độ muối, tỷ lệ nước/nguyên liệu...

- NR (Nitrogen Recovery): Hiệu suất thu hồi nitơ

$$NR = \frac{N_{sp}}{N_{NL}} \times 100 (\%)$$

+ N_{sp} : Hàm lượng nitơ tổng số có trong dịch thủy phân thu được.

+ N_{NL} : Hàm lượng nitơ tổng số có trong 100g phế liệu cá Tra.

Hiệu suất thu hồi nitơ – NR – có ý nghĩa xác định được số gam nitơ thu hồi được trong sản phẩm của dịch protein thủy phân từ tổng số gam nitơ có trong 100g phế liệu cá Tra ban đầu. Quá trình thủy phân sẽ đạt hiệu quả tốt nhất khi số gam nitơ từ 100g phế liệu cá Tra ban đầu được thu hồi toàn bộ vào trong dịch protein thủy phân sau khi thực hiện quá trình thủy phân, lúc này NR đạt 100%. Tuy nhiên để đánh giá chất lượng dịch protein thủy phân, ngoài chỉ tiêu NR còn phải đánh giá thêm thành phần nitơ có trong dịch protein thủy phân.

3.3.1. Ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu

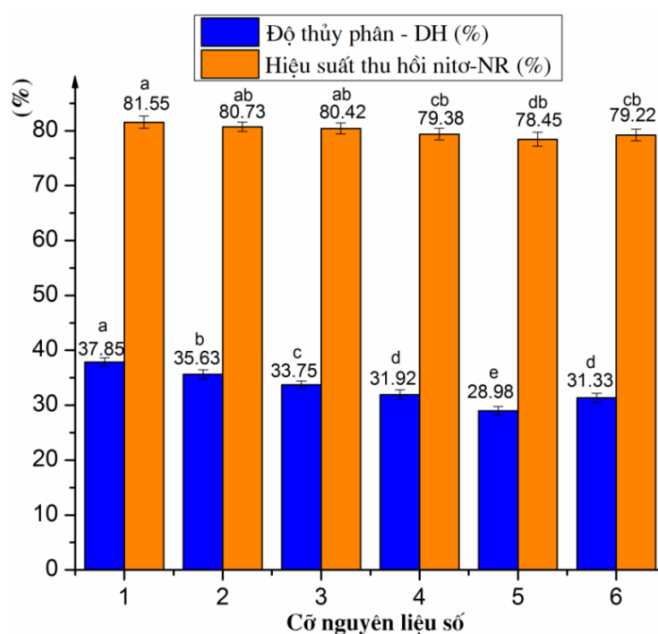
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu đến DH và NR của dịch FPH

Kích cỡ nguyên liệu (g/con)	Hàm lượng nước (%)	Hàm lượng protein (%)	DH (%)	NR (%)
500 – 700	68,30 ± 0,85	13,60 ± 0,60	37,85 ^a ± 0,98	81,55 ^a ± 1,12
700 – 900	68,10 ± 0,75	13,68 ± 0,55	35,63 ^b ± 1,05	80,78 ^{ab} ± 0,85
900 – 1100	67,40 ± 0,70	14,25 ± 0,72	33,75 ^c ± 0,95	80,42 ^{ab} ± 1,02
1100 – 1500	66,50 ± 0,75	14,70 ± 0,80	31,92 ^d ± 1,08	79,38 ^{cb} ± 1,05
1500 – 2000	65,30 ± 0,58	14,20 ± 0,65	28,98 ^e ± 1,13	78,45 ^{db} ± 1,25
Cỡ xô (không phân chia mẫu)	65,50 ± 0,65	14,50 ± 0,85	31,33 ^d ± 0,87	79,22 ^{cb} ± 1,05

Trong thực tế, tùy theo điều kiện sản xuất của nhà máy và thị trường mà kích cỡ cá nguyên liệu dùng cho chế biến sẽ khác nhau. Kích cỡ cá nguyên liệu khác nhau sẽ tạo ra phế liệu cá có thành phần hóa học khác nhau và ảnh hưởng đến quá trình thủy phân thu nhận dịch FPH.

Từ Bảng 3.3, thành phần hóa học của phế liệu theo cỡ cá khác nhau cho nên với cùng một lượng enzyme sử dụng nếu tính cho tỷ lệ enzyme/khối lượng nguyên liệu sẽ không tương đương nhau vì thành phần hóa học của các cỡ cá là khác nhau. Tuy nhiên do sự chênh lệch về hàm lượng nước của phế liệu cá Tra từ các cỡ cá nguyên liệu khác nhau không lớn nên tỷ lệ enzyme/nguyên liệu không khác nhau nhiều. Hơn nữa, phế liệu cá Tra sử dụng cho quá trình thí nghiệm của luận án là dạng xô nên tỷ lệ enzyme/khối lượng vật liệu là rất giống nhau.

Dựa theo kích cỡ của nguyên liệu cá Tra sử dụng cho chế biến phân chia phế liệu ra 6 loại mẫu khác nhau. Bảng 3.3 cho thấy, trong điều kiện thủy phân như nhau, với kích cỡ nguyên liệu khác nhau khi thủy phân thu nhận dịch protein thủy phân có độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitơ được biểu diễn trên Hình 3.2.



Hình 3.2. Ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu đến DH và NR của dịch FPH.

Quan sát đồ thị Hình 3.2, ta thấy rằng trong cùng điều kiện thủy phân: tỷ lệ enzyme 0,6% so với nguyên liệu, nhiệt độ 50⁰C, pH tự nhiên, tỷ lệ nước/nguyên liệu 1/1, nồng độ muối 1,5%, thời gian thủy phân 4 giờ thì nguyên liệu có kích cỡ nhỏ (500 – 700 g/con) ảnh hưởng không đáng kể đến hiệu suất thu hồi nitơ và độ thủy phân nhưng khi kích cỡ nguyên liệu tăng lên thì hiệu suất thu hồi nitơ và độ thủy phân đều giảm. Cụ thể, khi sử dụng loại phế liệu có cỡ nguyên liệu lớn dần (từ cỡ 500 – 700 tăng lên cỡ 700 – 900) thì giá trị NR giảm nhẹ từ 81,55% lên 80,78%, không có ý nghĩa khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$). Cùng với đó, giá trị độ thủy phân cũng giảm từ 37,85% xuống 35,63% khi cỡ nguyên liệu tăng từ 500 - 700 lên cỡ 700 – 900;

sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Nhưng khi tiếp tục sử dụng nguyên liệu lớn hơn, cỡ nguyên liệu tăng từ 900 - 1100 lên cỡ 1500 – 2000 thì giá trị DH và NR đều giảm mạnh xuống còn 28,98% và 78,45% tương ứng, sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$). Điều này được giải thích, khi kích cỡ nguyên liệu cá càng lớn, cá càng trưởng thành, kết cấu cơ thịt cá bền vững, chặt chẽ nên quá trình thủy phân khó khăn hơn, tốc độ thủy phân chậm.

Tuy nhiên có một điều thú vị là, khi không phân chia cỡ cá nguyên liệu (cỡ xô) thì kết quả thủy phân phế liệu cá thu nhận dịch thủy phân có các giá trị DH và NR là 31,33% và 79,22% tương ứng. Các giá trị DH và NR này khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ($P > 0,05$) so với giá trị DH và NR của mẫu phế liệu cá thu nhận từ cỡ cá nguyên liệu 1100 – 1500 g/con.

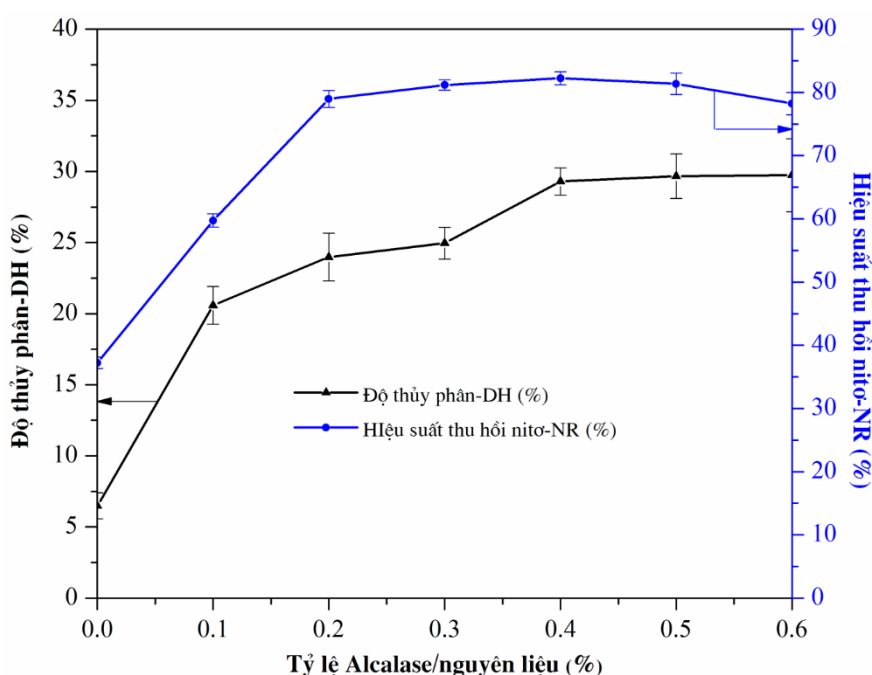
Vì vậy, phế liệu cá Tra thu nhận từ các kích cỡ nguyên liệu khác nhau có ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi nitơ NR và độ thủy phân DH của dịch protein thủy phân thu nhận. Do vậy, tùy theo mục đích công nghệ, có thể phân loại phế liệu cá Tra theo kích cỡ trước khi thủy phân để thu nhận dịch FPH phù hợp. Với mục đích thủy phân phế liệu cá Tra bằng enzyme thu nhận dịch protein thủy phân ứng dụng để bổ sung vào thức ăn tôm thẻ chân trắng 20 – 55 ngày tuổi thì phế liệu cá Tra được sử dụng từ nguyên liệu cá Tra có kích cỡ 1100 – 1500 g/con.

3.3.2. Ảnh hưởng hàm lượng enzyme alcalase đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra

Hàm lượng alcalase sử dụng có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình thủy phân cũng như hiệu quả kinh tế. Khi sử dụng alcalase không đủ lượng, quá trình thủy phân sẽ xảy ra chậm, hiệu quả thủy phân kém nhưng nếu dư dụng alcalase dư thừa sẽ làm tăng chi phí sản xuất.

Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme alcalase sử dụng đến hiệu quả quá trình thủy phân phế liệu cá Tra được đánh giá bởi 2 giá trị độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitơ (NR) được biểu diễn trên Hình 3.3. Ở cùng điều kiện thủy phân 4 giờ, nhiệt độ 50°C, pH thủy phân tự nhiên, DH và NR tăng lên khi hàm lượng enzyme tăng từ 0,1% đến 0,6%. Khi không có enzyme bên ngoài thêm vào (nghĩa là quá trình tự thủy phân diễn ra), DH đạt giá trị 6,48% sau 3 giờ thủy phân và sẽ đạt đến 20,58% khi enzyme alcalase thương mại được bổ sung vào quá trình thủy phân với tỷ lệ alcalase 0,1%, giá trị DH này tăng lên có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Trong quá trình tự thủy phân, quá trình thủy phân xảy ra chậm là do phụ thuộc lớn của nhiệt độ và enzyme nội tại trong bản thân nguyên liệu, hiện tượng này cũng đã công bố bởi [94]. DH tiếp tục tăng lên chậm từ 23,98% đến 30,69% trong khoảng hàm lượng enzyme từ 0,2% - 0,4% và đạt đến giá trị cao nhất là 30,69% ở hàm lượng enzyme alcalase là 0,4%. Sau đó, DH gần như không thay đổi hoặc giảm rất ít với nồng độ enzyme sử dụng cho quá trình thủy phân lớn hơn 0,4%. Quá trình này được giải thích do sự bảo hòa peptit tạo thành trong quá trình thủy phân, sự biến tính do nhiệt của enzyme. Thêm nữa, DH giảm là do sự tạo thành sản phẩm thủy phân plastein [67].



Hình 3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng alcalase đến DH và NR của dịch FPH.

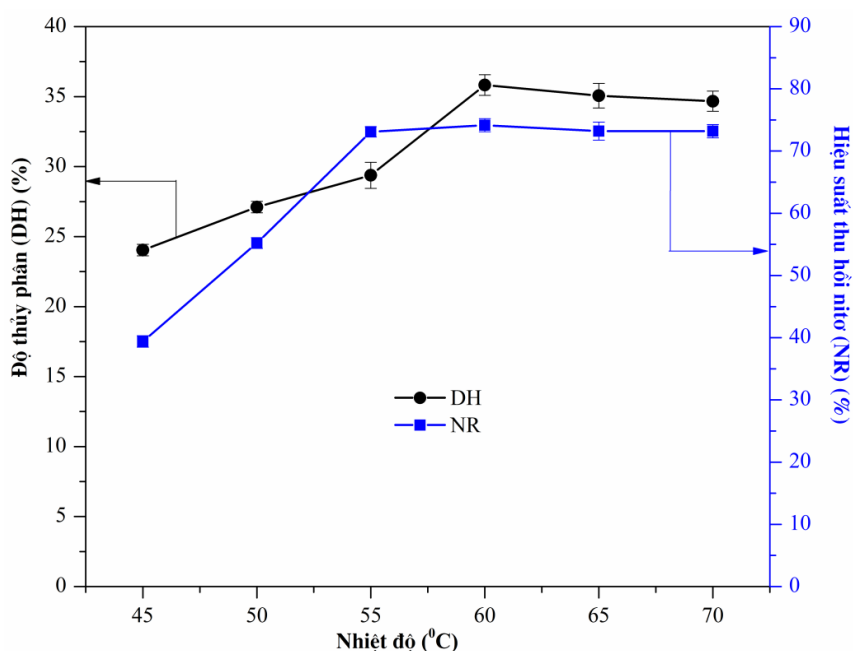
Quan sát ở Hình 3.3, khi hàm lượng enzyme tăng từ 0,1% đến 0,6% thì giá trị NR tăng lên từ 37,22% đến 78,23%, sự tăng lên khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Đáng chú ý, giá trị NR tăng nhanh chóng từ 37,22% đến 78,98% trong khoảng hàm lượng enzyme alcalase từ 0,1% đến 0,2%, kết quả này cũng được công bố bởi [57,82]. Khi hàm lượng enzyme tăng lên từ 0,3% đến 0,4% thì NR tăng chậm lên 81,16% đạt giá trị cao nhất 82,24%. Sau đó, giá trị NR có sự giảm nhẹ trong khoảng hàm lượng enzyme từ 0,5% đến 0,6%.

Từ các phân tích trên, hàm lượng enzyme alcalase sử dụng phù hợp nhất cho quá trình thủy phân phế liệu cá Tra thu nhận dịch protein thủy phân có DH và NR tốt nhất là 0,4% so với khối lượng nguyên liệu sử dụng. Với mẫu 100g phế liệu cá Tra sử dụng 0,4

mL enzyme alcalase thủy phân sẽ thu được 180 mL $\pm$ 5 mL dịch protein thủy phân và 7g $\pm$ 0,5g xương cá Tra khô để sản xuất HA.

3.3.3. Ảnh hưởng nhiệt độ thủy phân đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra

Enzyme alcalase mang bản chất là một protein nên chịu ảnh hưởng của nhiệt độ. Nhiệt độ cao sẽ gây ra biến tính protein làm giảm hoạt tính enzyme, quá trình thủy phân phế liệu cá Tra chậm. Khi nhiệt độ thủy phân quá thấp, không thuận lợi cho enzyme xúc tác thủy phân, quá trình thủy phân cũng xảy ra chậm. Do vậy, nhiệt độ thủy phân phải phù hợp không ảnh hưởng đến enzyme mà còn thúc đẩy nhanh quá trình thủy phân.



Hình 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến DH và NR của dịch FPH.

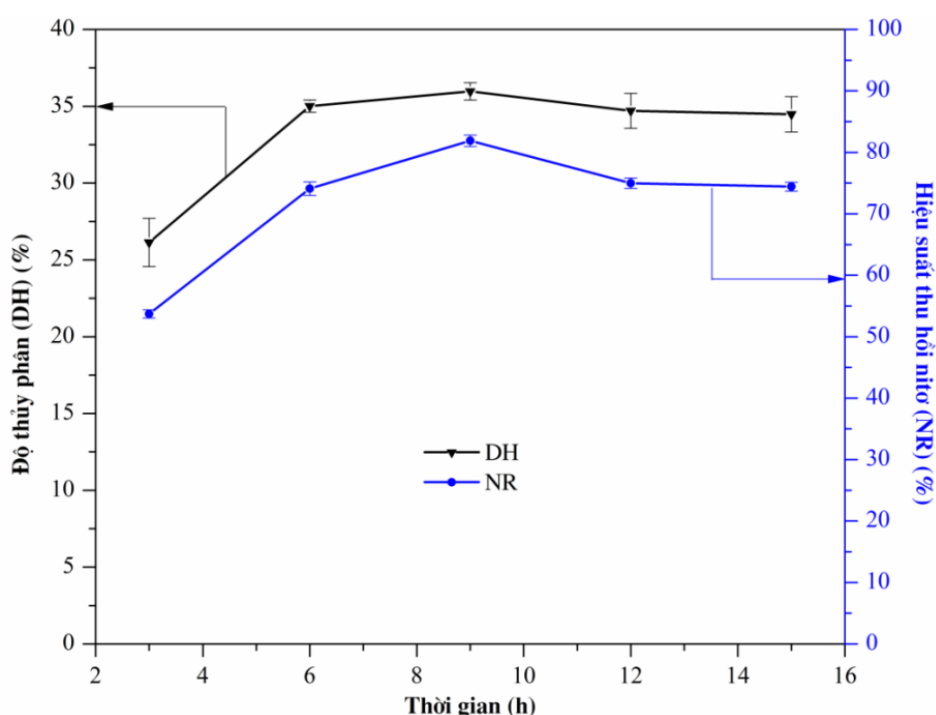
Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra được biểu diễn trên Hình 3.4. Kết quả cho thấy rằng, giá trị DH tăng lên từ 24,04% đến 35,83%, nhưng sau đó giảm nhẹ còn 34,67% khi nhiệt độ thủy phân tăng từ 45 – 70°C, sự khác nhau giữa các giá trị DH có ý nghĩa ($P < 0,05$). Khi nhiệt độ tăng từ 45 – 55°C thì giá trị DH tăng lên từ 24,04% đến 29,38%, giá trị tăng có ý nghĩa ($P < 0,05$). Sau đó, khi nhiệt độ tăng lên từ 55 – 60°C thì DH đạt giá trị cao nhất là 35,83% nhưng khi tiếp tục nhiệt độ 60 – 70°C thì DH sẽ giảm nhẹ xuống 34,67%, sự khác nhau không có ý nghĩa ($P > 0,05$). Điều này có thể giải thích là sự biến tính do nhiệt độ của enzyme [99]. Một số enzyme sẽ thay đổi cấu trúc khi nhiệt độ cao ($> 60^{\circ}\text{C}$), kết quả sẽ làm mất hoạt tính thủy phân [99]. Tương tự, khi nhiệt độ thủy phân tăng lên từ 45 – 70°C thì giá trị NR tăng lên nhanh từ 39,39% đến 74,15% và giảm nhẹ còn 73,19%, sự khác nhau giữa các

giá trị NR có ý nghĩa ($P < 0,05$). Xu hướng này cũng được công bố bởi các nghiên cứu trước [57,99]. Khi nhiệt độ thủy phân tăng từ 45 – 55°C, giá trị NR thu nhận tăng lên rất nhanh từ 39,19% đến 73,09% và tăng chậm dần đạt giá trị cao nhất là 74,19% khi nhiệt độ thủy phân là 60°C. Nếu tiếp tục tăng nhiệt độ thủy phân lên đến 65 – 70°C thì giá trị NR thu được sẽ giảm nhẹ còn 73,19%, sự khác nhau giá trị NR không có ý nghĩa ($P > 0,05$).

Như vậy thấy rằng, nhiệt độ thủy phân thích hợp nhất cho quá trình thủy phân phế liệu cá Tra bằng alcalase để thu nhận dịch protein thủy phân có DH và NR tốt nhất là 60°C. Với mẫu 100g phế liệu cá Tra sử dụng 0,4 mL enzyme alcalase thủy phân ở 60°C sẽ thu được $180 \text{ mL} \pm 5 \text{ mL}$ dịch protein thủy phân và $7 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$ xương cá Tra khô để sản xuất HA.

3.3.4. Ảnh hưởng thời gian thủy phân đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra

Thời gian thủy phân có ảnh hưởng đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra để thu nhận dịch protein. Khi thời gian thủy phân kết thúc sớm thì enzyme alcalase sẽ không xúc tác thủy phân cắt mạch polypeptit của cơ chất triệt để tạo ra các sản phẩm ngắn mạch peptit hay sản phẩm cuối cùng axit amin, ảnh hưởng đến DH dịch thủy phân. Nhưng khi thời gian thủy phân kéo dài sẽ làm ảnh hưởng đến chất lượng dịch protein thủy phân và hiệu suất thủy phân thấp. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra được biểu diễn trên Hình 3.5.



Hình 3.5. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến DH và NR của dịch FPH

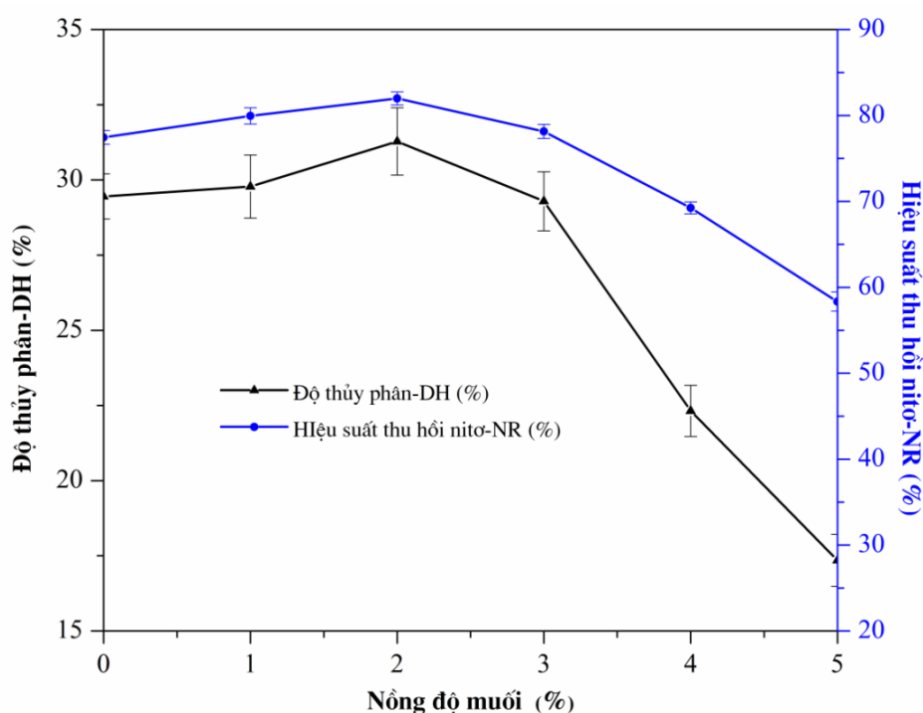
Quan sát đồ thị Hình 3.5 cho thấy, trong khoảng thời gian thủy phân từ 3 – 15 giờ, khi thời gian thủy phân 9 giờ thì cả 2 giá trị DH và NR đều tăng từ 26,13%; 53,71% lên 35,97%; 81,88% tương ứng, sự khác nhau giá trị DH, NR có ý nghĩa ($P < 0,05$). Nhưng cả DH, NR không tăng hoặc giảm nhẹ sau 9 giờ thủy phân và giảm còn 34,48% và 74,41% tương ứng, hiện tượng này cũng được công bố [56].

Cụ thể, khi thời gian thủy phân tăng từ 3 giờ lên 6 giờ thì giá trị DH rất nhanh, từ 26,13% lên 35,01%. Khi thời gian kéo dài đến 9 giờ thì DH đạt giá trị cao nhất là 35,97%, giá trị DH cao hơn so với các nghiên cứu đã công bố trước bởi [31]. Sự khác nhau của DH có thể do thành phần protein của cơ chất ảnh hưởng đến quá trình thủy phân [31]. Khi tiếp tục kéo dài thời gian thủy phân đến 15 giờ thì DH giảm nhẹ xuống còn 34,58%, sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Đối với giá trị NR, khi thời gian thủy phân tăng từ 3 giờ lên 9 giờ thì giá trị NR tăng nhanh từ 53,71% và đạt giá trị lớn nhất là 81,88%. Tuy nhiên, NR bắt đầu giảm nhẹ xuống còn từ 74,98% và 74,41% sau 12 giờ và 15 giờ tương ứng.

Từ các kết quả trên, thời gian thủy phân thích hợp cho quá trình thủy phân thu nhận dịch thủy phân protein có DH, NR tốt nhất là 9 giờ. Với mẫu 100g phế liệu cá Tra sử dụng 0,4 mL enzyme alcalase thủy phân ở 60°C trong 9 giờ sẽ thu được 180 mL $\pm$ 5 mL dịch protein thủy phân và 7g $\pm$ 0,5g xương cá Tra khô để sản xuất HA.

3.3.5. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra



Hình 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến DH và NR của dịch FPH.

Muối vừa là yếu thúc đẩy enzyme alcalase xúc tác thủy phân nhanh thịt cá Tra thành dịch protein thủy phân nhưng đồng thời là yếu tố kìm hãm làm chậm quá trình thủy phân. Do vậy, cần phải sử dụng nồng độ muối thích hợp cho quá trình thủy phân phế liệu cá Tra để thu nhận dịch protein thủy phân có DH và NR cao nhất, phù hợp để sử dụng bổ sung vào trong thức ăn tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi, thúc đẩy nhanh sự tăng trưởng của tôm.

Ảnh hưởng của nồng độ muối đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra được biểu diễn trên Hình 3.6.

Theo đồ thị Hình 3.6, khi nồng độ muối tăng từ 0 – 5% thì cả 2 giá trị DH và NR đều tăng nhẹ từ 29,45 % lên 31,28% và từ 77,45 lên 81,98% tương ứng, nhưng sau đó cả DH và NR đều giảm dần còn 17,35% và 58,34% tương ứng, sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Cụ thể, khi nồng độ muối tăng từ 0 – 2% thì giá trị DH và NR đều tăng lên nhanh và đạt giá trị cao nhất là 31,28% và 81,98%, hiện tượng này cũng được công bố [13]. Điều này có thể được giải thích là ở nồng độ muối 0 – 2% kích thích enzyme alcalase xúc tác thủy phân nhanh mạch polypeptit của thịt phế liệu cá Tra, lúc này muối không làm ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme alcalase. Khi tiếp tục tăng nồng độ muối lên 3% thì cả 2 giá trị DH và NR đều giảm nhẹ xuống còn 29,29% và 78,15% tương ứng, sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Nhưng nếu tiếp tục tăng nồng độ muối lên 4 – 5% thì DH và NR giảm xuống rất nhanh còn 17,35% và 58,34% tương ứng. Sự giảm xuống nhanh của DH và NR có thể do nồng độ muối cao ức chế hoạt động của enzyme, làm đình trệ quá trình thủy phân, quá trình thủy phân xảy ra chậm, nên cắt mạch protein chậm và thu hồi nitơ ít hơn [13].

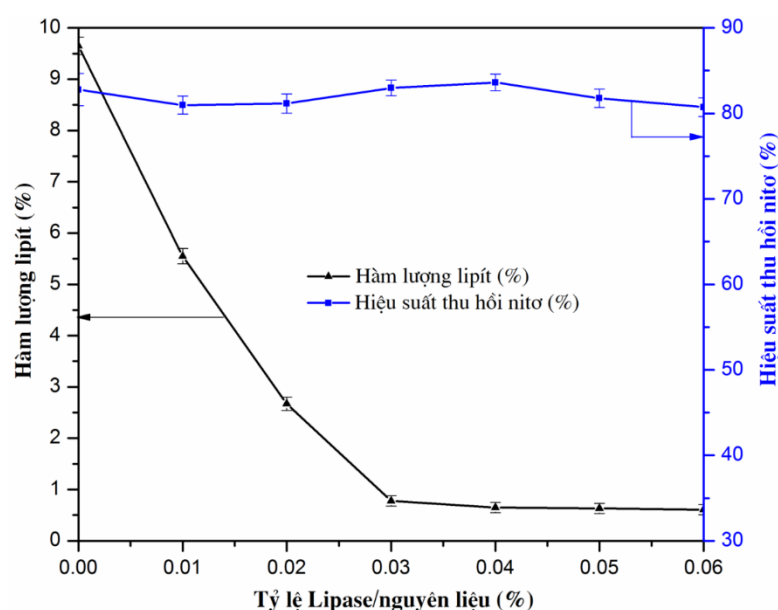
Từ các phân tích ở trên cho kết quả, nồng độ muối bổ sung thích hợp vào quá trình thủy phân phế liệu cá Tra là 2%. Với mẫu 100g phế liệu cá Tra sử dụng 0,4 mL enzyme alcalase trong môi trường có nồng độ muối 2%, pH tự nhiên, thủy phân ở 60°C trong 9 giờ sẽ thu được $180 \text{ mL} \pm 5 \text{ mL}$ dịch protein thủy phân và $7\text{g} \pm 0,5\text{g}$ xương cá Tra khô để sản xuất HA.

Kết luận: Khi thủy phân phế liệu cá Tra theo giai đoạn 1, điều kiện thủy phân phù hợp nhất khi sử dụng enzyme alcalase: tỷ lệ nước/nguyên liệu 1:1, nồng độ muối 2%, tỷ lệ enzyme alcalase 0,4% so với khối lượng nguyên liệu, nhiệt độ 60°C, thời gian 9 giờ thu nhận được dịch protein thủy phân có hàm lượng lipid tổng 10,80%. Dịch protein thủy phân được tiếp tục thủy phân ở giai đoạn 2 bằng enzyme lipase để làm giảm hàm lượng lipid tổng nhỏ hơn 6 – 7% đạt tiêu chuẩn để sử dụng để làm thức ăn bổ sung cho tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi.

3.4. Nghiên cứu những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân dịch thủy phân lipid bằng enzyme lipase

3.4.1. Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme lipase

Dịch protein thủy phân thu nhận được sau khi thủy phân bằng enzyme alcalase có hàm lượng lipid cao hơn so với qui định [22] (*dịch protein thủy phân từ cá Tra thu được có hàm lượng lipid 10,80%, trong khi đó yêu cầu thức ăn bổ sung cho tôm thẻ chân trắng theo TCVN-10325 : 2014 có hàm lượng lipid từ 6 – 7%*), không đạt tiêu chuẩn để làm thức ăn bổ sung cho tôm thẻ chân trắng nên dịch protein thủy phân bằng alcalase cần phải được tiếp tục thủy phân bằng enzyme lipase để thủy phân lipid, làm giảm hàm lượng lipid, phù hợp bổ sung vào thức ăn tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi nên. Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme lipase đến quá trình thủy phân dịch protein thủy phân được biểu diễn trên Hình 3.7.



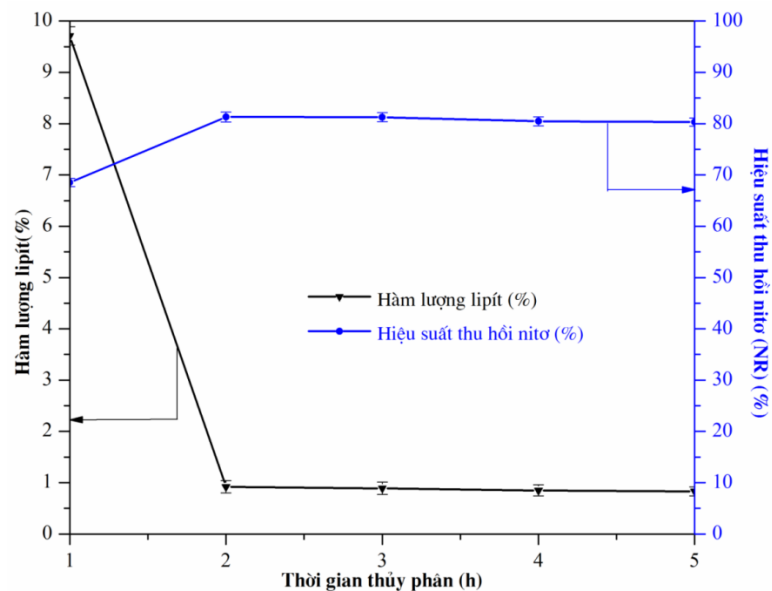
Hình 3.7. Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme lipase đến hàm lượng lipid và NR.

Từ đồ thị Hình 3.7, khi hàm lượng enzyme lipase sử dụng tăng từ 0 – 0,06% thì hàm lượng lipít trong dịch thủy phân giảm xuống rất nhanh từ 9,65% xuống còn 0,78%, sau đó lipít trong dịch thủy phân tách ra không đáng kể, hàm lượng lipít trong dịch thủy phân còn 0,30%, sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong khi đó, giá trị NR tăng nhẹ từ 80,96% lên 82,97% và sau đó giảm nhẹ còn 80,73%, không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Cụ thể, khi hàm lượng lipase tăng từ 0 – 0,03% thì quá trình thủy phân lipít trong dịch protein xảy ra mạnh, lipít được thủy phân tạo thành các axit béo tự do hòa tan trong dịch thủy phân nên hàm lượng lipít trong dịch thủy phân giảm xuống rất nhanh từ 9,65% xuống còn 0,78%, nếu tiếp tục tăng hàm lượng enzyme lipase lên nữa từ 0,03% – 0,06% thì hàm lượng lipít trong dịch thủy phân tách ra không đáng kể, không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Trong khi đó, giá trị NR tăng nhẹ từ 80,96% lên 82,97% tương ứng với hàm lượng enzyme tăng từ 0,01% đến 0,03%, khi tăng enzyme lên từ 0,03% đến 0,06% thì giá trị NR tăng lên chậm và đạt giá trị cao nhất là 83,62% và sau đó giảm nhẹ còn 80,73%. Nhìn chung hàm lượng enzyme lipase không ảnh hưởng nhiều đến NR khi tiến hành thủy phân dịch thủy phân protein mà chỉ ảnh hưởng đến hàm lượng lipít còn lại trong dịch. Vì vậy, hàm lượng enzyme lipase bổ sung thích hợp vào quá trình thủy phân dịch thủy phân cá Tra là 0,03%. Dịch thủy phân protein sau khi thủy phân bằng enzyme lipase thu được có hàm lượng lipít rất thấp (0,38% wt.) rất phù hợp để làm thức ăn bổ sung cho tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi.

3.4.2. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng enzyme lipase

Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến quá trình thủy phân dịch protein thủy phân bằng lipase được biểu diễn trên Hình 3.8. Theo đó, khi thời gian thủy phân kéo dài đến 2 giờ thì quá trình thủy phân lipít trong dịch protein xảy ra mạnh, lipít được thủy phân tạo thành các axit béo tự do hòa tan trong dịch thủy phân, nên hàm lượng lipít trong dịch thủy phân giảm xuống rất nhanh từ 9,71% xuống còn 0,92%, nếu tiếp tục kéo dài thời gian lên nữa từ 3 – 5 giờ thì hàm lượng lipít trong dịch thủy phân bị thủy phân, giảm không đáng kể còn 0,83%, sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 3.8. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng lipít và NR

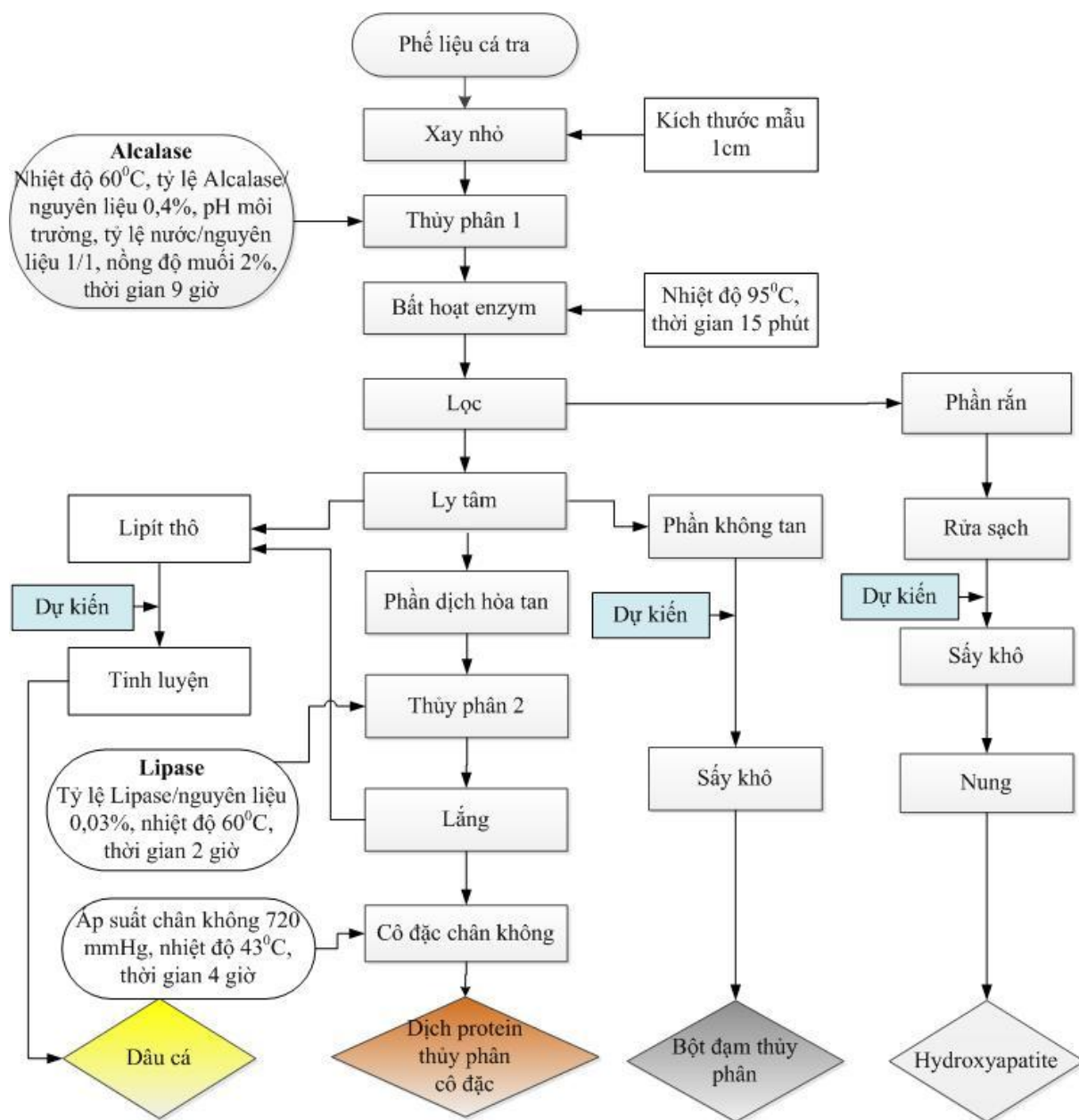
Trong khi đó, giá trị NR tăng từ 68,50% lên 81,30% tương ứng với thời gian thủy phân tăng từ 1 giờ lên 2 giờ, nếu tiếp tục tăng thời gian từ 3 – 5 giờ thì NR tăng lên chậm và đạt giá trị cao nhất là 81,25% và sau đó giảm nhẹ còn 80,30%, sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Nhìn chung, khi tiến hành thủy phân dịch thủy phân protein bằng lipase thì thời gian thủy phân không ảnh hưởng nhiều đến NR mà chỉ ảnh hưởng đến hàm lượng lipít còn lại trong dịch. Vì vậy, thời gian thủy phân thích hợp cho quá trình thủy phân dịch thủy phân cá Tra là 2 giờ. Dịch thủy phân protein sau khi thủy phân bằng enzyme lipase thu được có hàm lượng lipít rất thấp (0,83% wt.) rất phù hợp để làm thức ăn bổ sung cho tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi.

Như vậy, khi thủy phân phế liệu cá Tra theo giai đoạn 1, điều kiện thủy phân phù hợp nhất khi sử dụng enzyme alcalase: tỷ lệ nước/nguyên liệu 1:1, nồng độ muối 2%, tỷ lệ enzyme alcalase 0,4% so với khối lượng nguyên liệu, nhiệt độ 60°C, thời gian 9 giờ; giai đoạn 2, điều kiện thủy phân phù hợp nhất khi dùng lipase: hàm lượng enzyme lipase 0,03% so với khối lượng nguyên liệu, nhiệt độ 60°C, thời gian 2 giờ thu nhận dịch protein thủy phân cô đặc có DH 35%, MW < 1000 Da, đậm tổng 33,2%, lipít tổng 1,93%, đậm axit amin 420,16 mg/g protein. Dịch protein thủy phân có thể sử dụng để làm thức ăn bổ sung cho tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi.

3.5. Đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm protein thủy phân và hydroxyapatite từ phế liệu cá Tra

Sau khi thực hiện nghiên cứu thí nghiệm và xác định các thông số phù hợp nhất của quá trình thủy phân phế liệu cá Tra bằng enzyme alcalase và lipase để thu nhận

dịch protein thủy phân ứng dụng bổ sung vào thức ăn tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi, quy trình sản xuất thu nhận dịch protein thủy phân theo 2 giai đoạn bằng enzyme alcalase và lipase từ phế liệu cá Tra ở qui mô phòng thí nghiệm được trình bày như mô tả ở Hình 3.9.



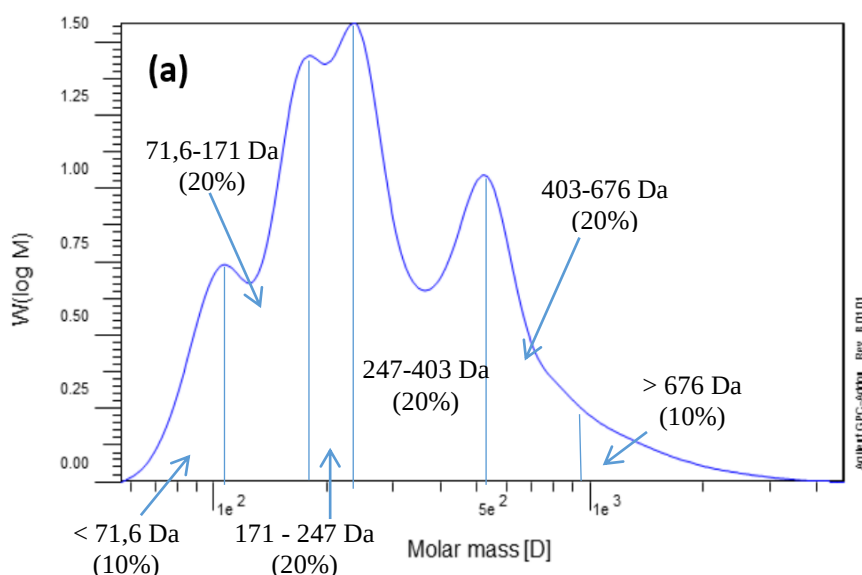
Hình 3.9. Sơ đồ quy trình sản xuất dịch protein thủy phân bằng enzyme alcalase và lipase thương mại từ phế liệu cá Tra.

Phế liệu từ cá Tra nguyên liệu (*Pangasius hypophthalmus*) kích cỡ 1,2 – 1,5 kg/con được thu nhận từ Công ty Chế biến Thủy sản Nam Việt, tỉnh An Giang. Phế liệu cá tươi (đầu cá, nội tạng, vây, xương, đuôi) được bao gói trong túi PE và ướp đá lạnh trong thùng xốp, vận chuyển nhanh chóng về phòng thí nghiệm. Mẫu được xay

nhỏ đến kích thước 1cm bằng máy xay trục vít, trộn đều, đồng nhất, cân mỗi mẫu 100g/PE, bột kín miệng túi để sử dụng.

Túi mẫu 100g/PE phế liệu cá Tra cho vào bình thủy phân, thêm nước cất với một lượng tỷ lệ 1/1 so với nguyên liệu, khuấy đều mẫu, bổ sung thêm muối để đạt nồng độ dung dịch có độ mặn 2%, cho enzyme alcalase vào mẫu với lượng 0,4% so với khối lượng nguyên liệu, khuấy trộn đều, bịt kín bình thủy phân bằng giấy bạc. Đặt bình mẫu vào bể ổn nhiệt ở 60°C, thực hiện thủy phân mẫu trong 9 giờ.

Sau khi quá trình thủy phân kết thúc tiến hành lọc để tách riêng phần bã rắn và phần dịch lọc. Phần bã rắn được rửa 3 lần bằng nước nóng, sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi để thu nhận xương cá Tra khô, sử dụng cho nghiên cứu sản xuất HA sau này. Phần dịch lọc được tiến hành ly tâm lạnh 8000 vòng/phút, trong thời gian 30 phút để tách phần lipid thô và phần không tan (để sản xuất bột đậm thủy phân), thu nhận phần dịch lọc hòa tan. Phần dịch lọc được điều chỉnh pH môi trường bằng 5,0 với HCL 1N, sau đó tiếp tục bổ sung enzyme lipase với hàm lượng 0,03% so với nguyên liệu, khuấy đều mẫu, đặt bình mẫu vào bể ổn nhiệt ở 60°C, thủy phân trong 2 giờ, đem dịch bất hoạt enzyme ở 90°C, trong 15 phút rồi tiến hành phân ly bằng cách lắng lọc trong môi trường không khí để tách riêng thu nhận phần dịch hòa tan. Phần dịch hòa tan được cô đặc chân không ở điều kiện áp suất 720 mmHg, nhiệt độ 60°C, thời gian 2 giờ [2] để thu dịch protein thủy phân cô đặc có hàm lượng đậm 33,2%, hàm lượng lipid 1,93%, hàm lượng axit amin 420,16 mg/g protein, khối lượng phân tử < 1000 Da được trình bày ở Bảng 3.4; 3.5 và Hình 3.10.



Hình 3.10. Đồ thị biểu diễn phân bố khối lượng phân tử của dịch thủy phân.

Thành phần hóa học của dịch protein thủy phân

Thành phần axit amin (AA) của dịch protein thủy phân là yếu tố quan trọng, đặc trưng cho giá trị dinh dưỡng và ảnh hưởng đến đặc tính của dịch protein thủy phân [35]. Hình. 3.10 trình bày sự phân bố khối lượng phân tử (Mw) của các peptit FPH. Kết quả cho thấy rằng, tỷ lệ % các peptits là 10% (<71,6 Da), 20% (71,6 – 171 Da), 20% (171 – 247 Da), 20% (246 – 403 Da), 20% (403 – 676 Da), 10% (> 676 Da).

Bảng 3.4. Thông số chất lượng của dịch FPH từ phế liệu cá Tra

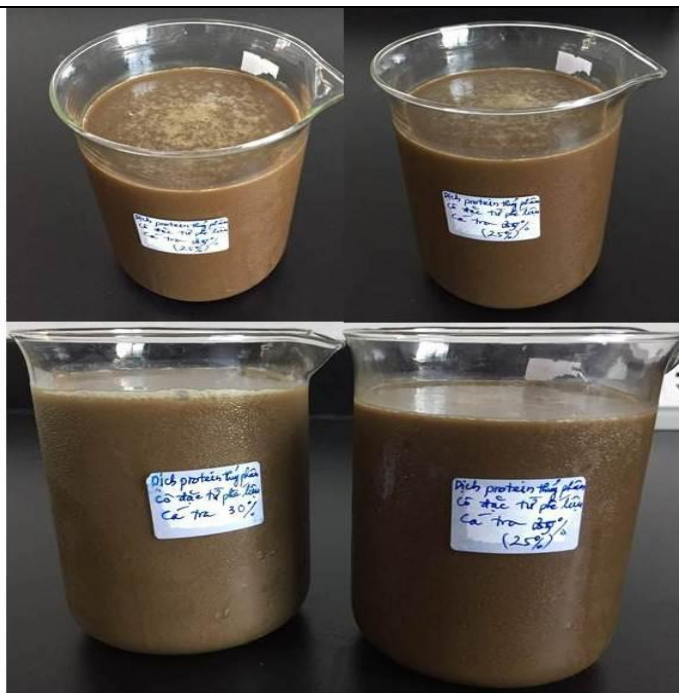
Chỉ tiêu	Hàm lượng/tính chất
Hàm lượng protein (g/l)	33,20 ± 2,15
Hàm lượng lipít (%)	1,93 ± 0,05
Hàm lượng chất khô (%)	40,6 ± 2,32
Hàm lượng đạm axit amin (mg/g)	420,16 ± 2,75
Màu sắc	Nâu sẫm
Mùi	Thơm tự nhiên

Với hơn 70% dịch protein thủy phân có khối lượng phân tử < 1000 Da, nên dịch protein thủy phân từ phế liệu cá Tra thu nhận rất phù hợp để làm thức ăn bổ sung cho tôm. Hàm lượng cao peptit hòa tan là nguồn rất tốt để sử dụng làm thức ăn dẫn dụ cho thủy sản [60]. Thành phần hóa học của FPH được trình bày ở bảng 3.5. FPH có chứa 8 AA thiết yếu và 12 AA không thiết yếu. Tổng lượng AA của dịch là 420,16 mg/g protein, trong đó tổng AA thiết yếu là 19,37 %w/w và tổng AA không hòa tan trong nước là 33,56% w/w. Các AA chủ yếu của FPH gồm ornithine (46,11 mg/g protein), aspartic (42,85 mg/g protein), glycine (40,92 mg/g protein), alanine (39,88 mg/g protein) và glutamic (38,40 mg/g protein). FPH này rất giàu AA có thể sử dụng làm thức ăn dẫn dụ cho tôm nuôi [164,165].

Bảng 3.5. Thành phần axit amin của dịch FPH từ phế liệu cá Tra

Axit amin	Hàm lượng (mg/g)
Arginine	30,24
Serine	5,04
Aspartic	42,85
Glutamic	38,40
Hydroxylproline	26,54
Glycine	40,92
Threonine	12,45

Alanine	39,88
Aminobutyric acid	2,82
Proline	18,83
Methionine	14,38
Valine	12,45
Phenylalanine	3,56
Cysteine/Cystine	10,97
Isoleucine	3,56
Tyrosine	36,17
Leucine	7,41
Ornithine	46,11
Lysine	15,57
Histidine	12,01
Tổng số axit amin không thay thế	81,39
Tổng số axit amin thay thế	338,77
Tổng axit amin	420,16



Hình 3.11. Hình ảnh dịch FPH cô đặc từ phế liệu cá Tra thủy phân bằng enzyme alcalase và lipase.

Bảng 3.6. Thành phần axit béo của dầu cá thô thu nhận từ phế liệu cá Tra thủy phân bằng alcalase

Axit béo	Hàm lượng (mg/g)
C14:0 (Myristic)	13,28 ± 0,10
C16:1 (Palmitoleic)	5,42 ± 0,10
C18:0 (Stearic)	41,51 ± 0,35
C18:1n9c (Oleic)	7,99 ± 0,15
C18:2n6c (Linoleic)	1,53 ± 0,04
C18:3 (Linolenic)	18,32 ± 0,03
C20:4 (Arachidonic)	1,44 ± 0,07
C20:5n3 (Eicosapentaenoic)	2,21 ± 0,06
C22:6 (docosahexaenoic)	0,57 ± 0,05
Tổng axit béo no	54,79 ± 0,25
Tổng axit béo không no	36,91 ± 0,18

3.6. Nghiên cứu qui trình sản xuất HA từ phế liệu cá Tra

3.6.1. Thành phần hóa học của xương cá Tra thô và sản phẩm HA

Để đánh giá hàm lượng các thành phần cơ bản của xương cá Tra và HA được thu nhận từ xương cá Tra thô, tiến hành thực hiện thí nghiệm xử lý phế liệu cá Tra để thu phần xương cá Tra thô. Sau đó, tiến hành xử lý nhiệt thu nhận HA từ các nguồn xương cá Tra thô. Từ kết quả thí nghiệm, thực hiện đánh giá được tiềm năng cũng như tính chất của phế liệu/xương cá Tra để làm nguồn nguyên liệu sản xuất HA. Ngoài ra, luận án cũng so sánh tính chất của HA thu từ xương cá Tra với HA thu từ xương cá khác.

Bảng 3.7 cho thấy, thành phần hóa học cơ bản của xương cá Tra trước và sau khi nung ở 700°C. Các hợp chất hữu cơ như protein và lipit không được phát hiện sau khi nung xương cá ở nhiệt độ 700°C. Nguyên liệu xương cá Tra có hàm lượng khoáng 51,60%, đây là hàm lượng khoáng khá cao. Như vậy, với trữ lượng nguồn nguyên liệu cá Tra năm 2019 đạt 1,25 triệu tấn và khoảng gần 0,75 triệu tấn phế liệu cá Tra (60 wt.%) thì có thể thu được khoảng 33,75 nghìn tấn HA. Do đó, việc nghiên cứu sản xuất HA từ phế liệu cá Tra là rất cần thiết và có ý nghĩa. Ngoài ra, Bảng 3.7 cũng cho thấy phế liệu cá Tra

có chứa các thành phần có giá trị khác như protein và lipít, là nguồn tiềm năng để sản xuất các sản phẩm có giá trị gia tăng như dịch protein thủy phân, dầu cá được ứng dụng cho các lĩnh vực thực phẩm, dược phẩm, nông nghiệp và chăn nuôi.

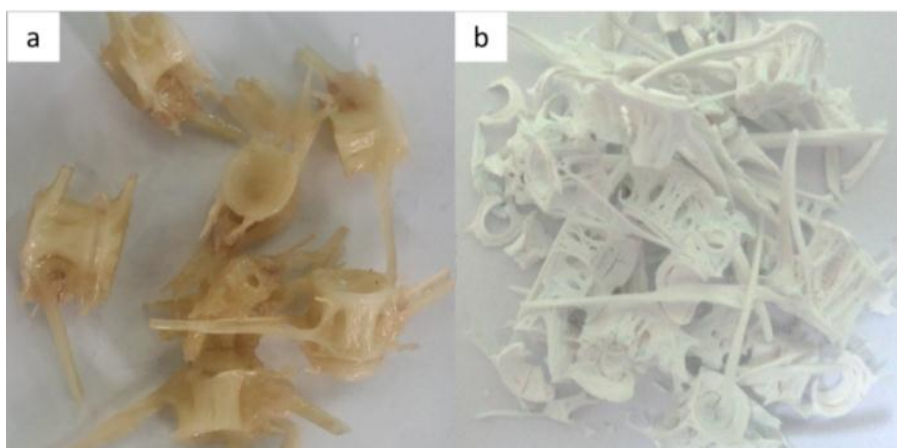
3.6.2. Kết quả khảo sát tiền xử lý nguyên liệu thu nhận xương cá dạng thô

Quá trình tiền xử lý nhằm tách riêng phần hữu cơ chứa như protein, lipít từ lượng thịt còn sót lại trong xương cá Tra sau phi-lê và phần nội tạng cá. Có nhiều cách khác nhau để tách riêng phần hữu cơ trên nhưng phổ biến nhất là phương pháp đun sôi nước, nấu chín nguyên liệu và phương pháp thủy phân protein bằng enzyme. Luận án này tiến hành xử lý nguyên liệu để thu nhận xương cá thô theo cả hai trên, đồng thời đánh giá, so sánh tính chất sản phẩm HA. Cụ thể:

- **Phương pháp đun sôi [7,14]:** Mẫu phế liệu cá Tra được cắt nhỏ từ 2 – 4 cm, phế liệu được cho vào nồi chứa nước cất với tỷ lệ 1/10 (w/v), sau đó đun sôi ở 100°C trong thời gian 2 giờ. Sau đó, mẫu được làm nguội và rửa sạch bằng nước nóng 3 lần để loại bỏ các phần hữu cơ, thu nhận phần xương cá. Mẫu tiếp tục được sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi, thu được xương cá Tra khô. Hình 3.12a cho thấy hình ảnh xương cá sau khi đun sôi trong 2 giờ, rửa sạch và sấy khô.

- **Phương pháp thủy phân bằng enzyme:** thực hiện thủy phân phần hữu cơ trong phế liệu cá bằng enzyme alcalase 2,4 AU/g. Mẫu phế liệu cá Tra được xay nhỏ và đồng nhất, cân đều 100g mẫu/PE để sử dụng cho thí nghiệm. Cho 100g mẫu vào bình tam giác 500 mL, thêm 100 mL nước cất, khuấy trộn, bịt kín bình bằng giấy bạc. Đặt bình mẫu vào bể ổn nhiệt ở 60°C. Hàm lượng enzyme sử dụng 0,4%, thời gian thủy phân là 9 giờ. Sau khi quá trình thủy phân kết thúc tiến hành bất hoạt enzyme ở 95°C trong 15 phút, rồi đem lọc để tách phần bã rắn và phần dịch lọc. Phần bã rắn (chủ yếu là xương cá) được rửa sạch bằng nước 3 lần, sau đó sấy khô đến khối lượng không đổi, thu được xương cá Tra dạng thô. Hình 3.12b cho thấy hình ảnh xương cá sau khi đun sôi trong 2 giờ, rửa sạch và sấy khô.

Hình 3.12 cho thấy rằng, xương cá thô thu được khi xử lý nguyên liệu bằng phương pháp đun sôi có màu trắng ngà, bề mặt không nhẵn, sẫm màu; trong khi đó thu nhận theo phương pháp thủy phân bằng alcalase có màu trắng ngà, bề mặt nhẵn, sáng bóng. Điều này có thể giải thích, khi thủy phân phế liệu cá Tra bằng alcalase, phần protein trên bề mặt và bên trong cấu trúc của xương cá sẽ bị thủy phân, loại bỏ ra khỏi xương nên khi rửa sạch, sấy khô sẽ thu nhận xương cá Tra thô có bề mặt nhẵn, sáng bóng hơn so với phương pháp xử lý bằng đun sôi.



Hình 3.12. Hình ảnh xương cá Tra thu được theo (a) phương pháp đun sôi và (b) phương pháp thủy phân bằng alcalase.

Kết quả từ Bảng 3.7 cho thấy, khi xử lý phế liệu cá Tra bằng alcalase, xương cá Tra thô thu nhận có hàm lượng phần hữu cơ (protein, lipít, 35,24 %) còn lại thấp hơn so với khi xử lý theo phương pháp đun sôi (36,58%); điều này có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình nung thu nhận HA và chất lượng HA sau này. Trong khi đó hàm lượng tro của xương cá Tra thô xử lý theo phương pháp thủy phân bằng alcalase cao hơn với giá trị 51,06% và 50,06% tương ứng. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng khoáng chất này chính là hydroxyapatite với một lượng vết các kim loại nặng và gốc muối khác [45,90]. Do đó, đây chính là nguồn nguyên liệu tốt tiềm năng để sản xuất HA có độ tinh khiết cao và có nguồn gốc từ tự nhiên.

Như vậy, khi xử lý phế liệu cá Tra theo phương pháp thủy phân bằng alcalase thì xương cá Tra thô thu nhận có hàm lượng phần hữu cơ (protein, lipít) còn lại thấp hơn so với khi xử lý phế liệu cá theo phương pháp đun sôi. Điều này có ảnh hưởng rất lớn đến độ tinh khiết và chất lượng sản phẩm HA thu nhận sau này. Với đề tài Luận án này, tôi chọn phương pháp thủy phân bằng alcalase xử lý phế liệu cá Tra thu nhận xương cá Tra thô để sản xuất hydroxyapatite sau này. Và đây cũng là một sản phẩm giá trị gia tăng được thu nhận đồng thời với dịch protein thủy phân và lipít từ phế liệu cá Tra bằng enzyme.

Bảng 3.7. Thành phần hóa học của xương cá Tra thô

Nguồn cá	Xương cá Tra thô							
	Phương pháp thủy phân bằng alcalase				Phương pháp đun sôi			
	Protein	Lipít	Hàm ẩm	Tro	Protein	Lipít	Hàm ẩm	Tro
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Cá Tra	25,70 ± 0,25	9,54 ± 0,12	12,7 ± 0,18	51,06 ± 0,35	27,85 ± 0,25	8,73 ± 0,12	12,82 ± 0,23	50,06 ± 0,35

Bảng 3.8. Thành phần hóa học của sản phẩm HA

Nguồn cá	Sản phẩm HA từ xương cá Tra thô							
	Phương pháp thủy phân bằng alcalase				Phương pháp đun sôi			
	Protein	Lipít	Hàm ẩm	Tro	Protein	Lipít	Hàm ẩm	Tro
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Cá Tra	ND	ND	0,40 ± 0,04	99,2 ± 0,75	0,82 ± 0,04	ND	0,45 ± 0,05	98,73 ± 0,63

Bảng 3.9. Thành phần hóa học của phế liệu từ các loại cá khác nhau

Mẫu xương cá	Thành phần (g/kg mẫu)				Tham khảo
	Protein	Lipít	Nước	Tro	
Cá tuyết	357,8 ± 1,6	11,4 ± 0,3	77,7 ± 0,4	526,4 ± 0,4	[152]
Cá hồi	292,0 ± 31,6	381,2 ± 32,4	49,6 ± 3,3	263,7 ± 20,4	
Cá thu	261,3 ± 1,1	471,8 ± 0,1	44,2 ± 0,4	212,4 ± 0,8	
Cá hồi Đại Tây Dương	474	93	-	446	[145]
Cá hồi (g/kg mẫu khô)	330 ± 0,2	96 ± 1	415 ± 1	514,1 ± 0,5	[109]
Cá Tra	146,6± 0,7	152,8± 0,7	651,1± 0,2	56,3± 0,2	Nghiên cứu này

3.6.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nung đến các đặc tính của HA

Nhiệt độ giữ nhiệt nung có ảnh hưởng lớn đến quá trình đốt cháy để loại bỏ phần hữu cơ trong xương cá thô. Ngoài ra nhiệt độ nung còn ảnh hưởng đến màu sắc, hình thái, kích thước và cấu trúc tinh thể của hạt HA, độ xốp, kích thước hạt của sản phẩm HA [42]. Khi nhiệt độ giữ nhiệt nung quá thấp, không đủ nhiệt lượng để đốt cháy các phần hữu cơ, sản phẩm HA thu nhận vẫn còn chứa các phần hữu cơ, độ tinh khiết của sản phẩm thấp. Nếu nhiệt độ giữ nhiệt nung quá cao sẽ đốt cháy, loại bỏ phần hữu cơ triệt để, tuy nhiên nhiệt độ cao sẽ làm mất nước triệt để, sản phẩm HA bị phân hủy chuyển sang dạng khác, hiệu suất thu hồi thấp, kích thước hạt HA lớn, độ xốp giảm, năng lượng tiêu tốn lớn, chi phí sản xuất tăng lên, hiệu quả kinh tế thấp. Do vậy cần phải xác định nhiệt độ giữ nhiệt nung thích hợp để thu nhận sản phẩm HA có chất lượng và hiệu quả tốt nhất.

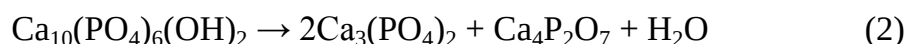
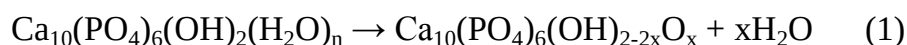
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của nhiệt độ nung đến hiệu suất và trạng thái của HA từ xương cá Tra thô

Thông số		Hiệu suất thu hồi)	Trạng thái
Nhiệt độ (°C)	Xương nguyên liệu	-	Vàng nhạt
	600	59,90 ^a ± 0,94	Đen
	700	58,70 ^{ab} ± 0,71	Xanh nhạt
	800	57,30 ^{bc} ± 0,61	Trắng
	900	56,70 ^c ± 0,75	Trắng ngà
	1000	56,90 ^c ± 0,55	Trắng ngà

Kết quả ở bảng 3.10 cho thấy, ở nhiệt độ giữ nhiệt nung khác nhau sẽ thu nhận HA có màu sắc, trạng thái và hiệu suất thu hồi khác nhau. Ở nhiệt độ nung 600°C mẫu HA thu nhận có màu đen, khi nâng nhiệt độ nung lên 700°C sản phẩm HA chuyển sang màu xanh nhạt, nếu tiếp tăng nhiệt độ nung lên 800 – 1000°C thì HA thu nhận có màu trắng ngà.

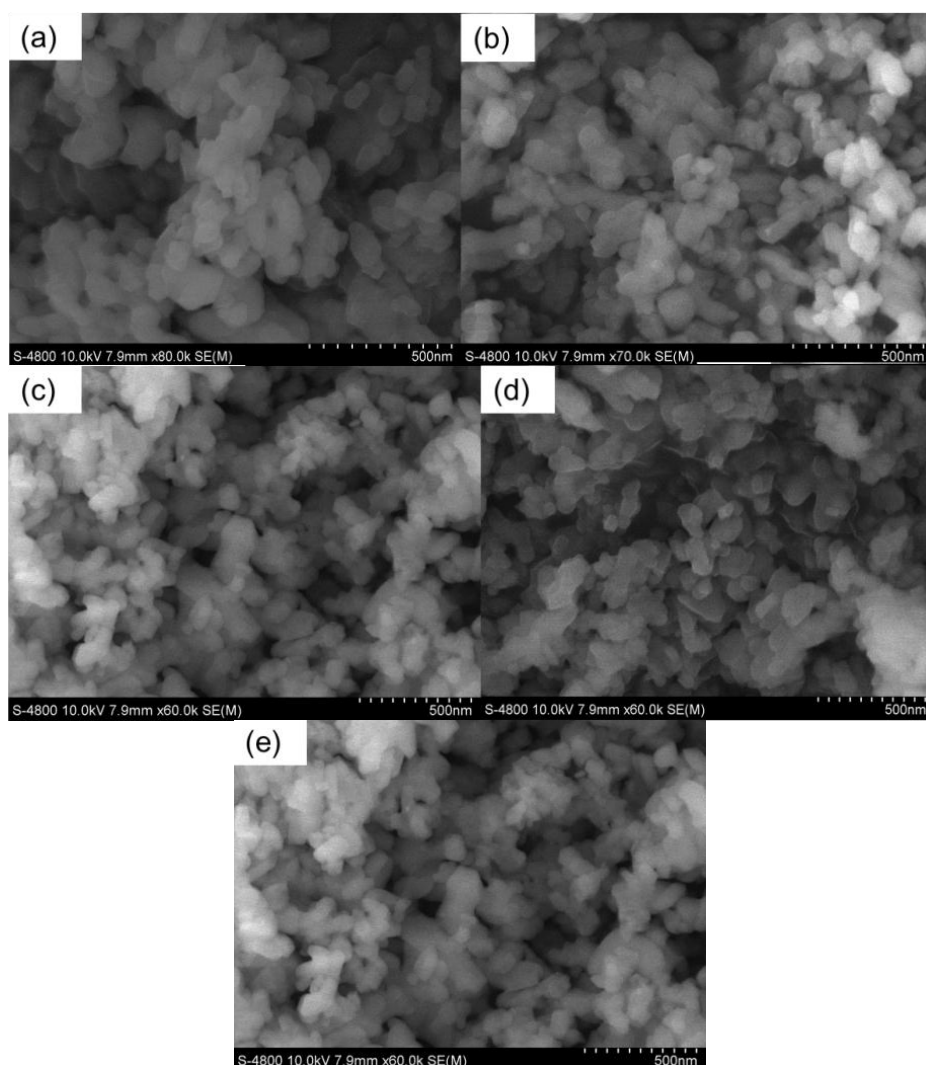
Màu sắc của HA khác nhau ở các nhiệt độ nung khác nhau được giải thích như sau, với mẫu xương cá sau khi nung ở nhiệt độ 600°C có màu đen có thể là do có sự hiện diện của các thành phần hữu cơ trong xương nguyên liệu như sự góp mặt của phân tử collagen và protein. Ở nhiệt độ nung 700°C và 800°C, các thành phần hữu cơ đó được đốt cháy, loại bỏ hoàn toàn, HA thu nhận có màu trắng. Tất cả các mẫu HA được nung ở 900°C và

1000°C có màu trắng ngà, điều này là do sự mất nước và phá hủy thành phần HA ở nhiệt độ cao. Quá trình đó có thể được trình bày theo phản ứng sau [137]:



Màu sắc của HA có thể liên quan đến sự hiện diện các vết kim loại trong sản phẩm HA như: Cu^{2+} , Pb^{2+} và Ni^{2+} [26].

Đối với hiệu suất thu hồi HA, khi nhiệt độ nung tăng từ 600 – 1000°C thì hiệu suất thu hồi HA giảm từ 59,90% xuống còn 56,90%, sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Ở nhiệt độ nung 600°C thì hiệu suất thu hồi HA đạt giá trị cao nhất (59,9%), khi nhiệt độ nung tăng lên 700°C thì hiệu suất giảm (58,70%). Khi tiếp tục nâng nhiệt độ nung lên 800 – 1000°C thì hiệu suất thu nhận HA giảm dần còn 56,90%, sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).



Hình 3.13. Ảnh SEM của HA thu được từ xương cá Tra nung ở (a) 600°C, (b) 700°C, (c) 800°C, (d) 900°C và (e) 1000°C.

Hiện tượng này có thể được lý giải, khi nung xương cá Tra ở 600°C vẫn chưa đốt cháy và loại bỏ hết phần hữu cơ như protein, lipid trong xương cá. Khi nâng nhiệt độ nung lên 700 – 1000°C thì các phần hữu cơ trong xương cá Tra bị đốt cháy, loại bỏ hoàn toàn, hơn nữa nhiệt độ nung cao, sẽ làm cho HA bị mất nước triệt để, giảm khối lượng nên hiệu suất thu hồi HA giảm dần.

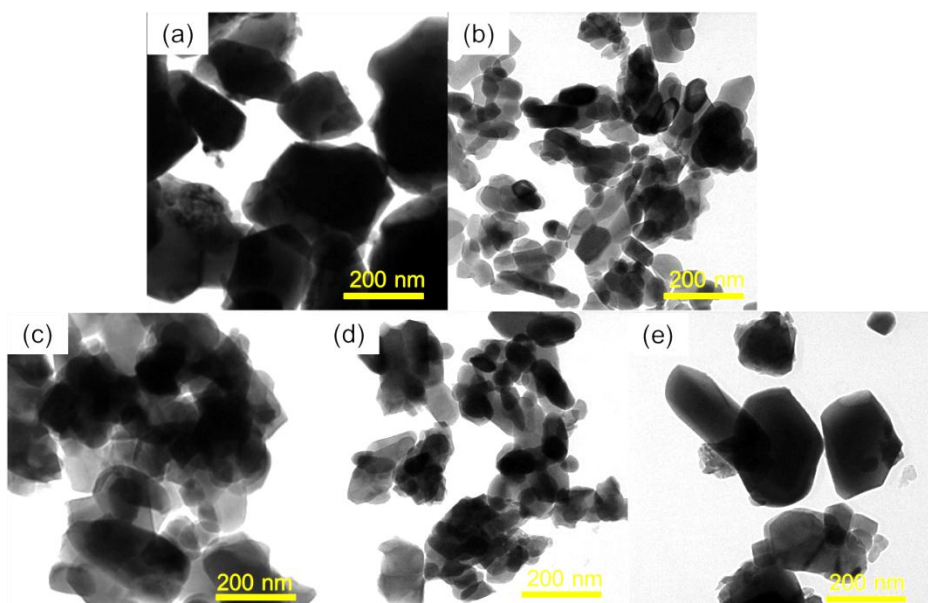
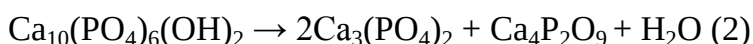
Hình 3.13 trình bày hình thái của HA ở các nhiệt độ nung khác nhau. Rõ ràng rằng, HA tất cả các mẫu có kích thước 30 – 300 nm và có độ xốp cao. Đây là tính chất rất hữu ích để làm vật liệu cấy ghép cho chỉnh hình và nha khoa [42], chất hấp thụ kim loại nặng [52]. Nhưng, kích thước hạt HA không đồng nhất (30 – 300 nm) và bị kết tụ lại khi nung ở 600°C. Khi nung ở nhiệt độ 700°C, trong 3 giờ, hạt HA nhỏ hơn và đồng đều hơn (50 – 70 nm). Điều này có thể giải thích rằng các hợp chất hữu cơ bị loại bỏ ra khỏi HA khi nung ở nhiệt độ > 600°C [118]. Tuy nhiên, hạt HA sẽ lớn hơn khi nung ở 900 – 1000°C (100 – 200 nm).

Hiện tượng này có thể được giải thích do sự phá hủy 1 phần do nhiệt của hydroxyapatite thành tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) và tetracalcium phosphate ($\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$) ở 850 – 900°C theo 2 giai đoạn sau [115]:

Giai đoạn 1: Khử nước

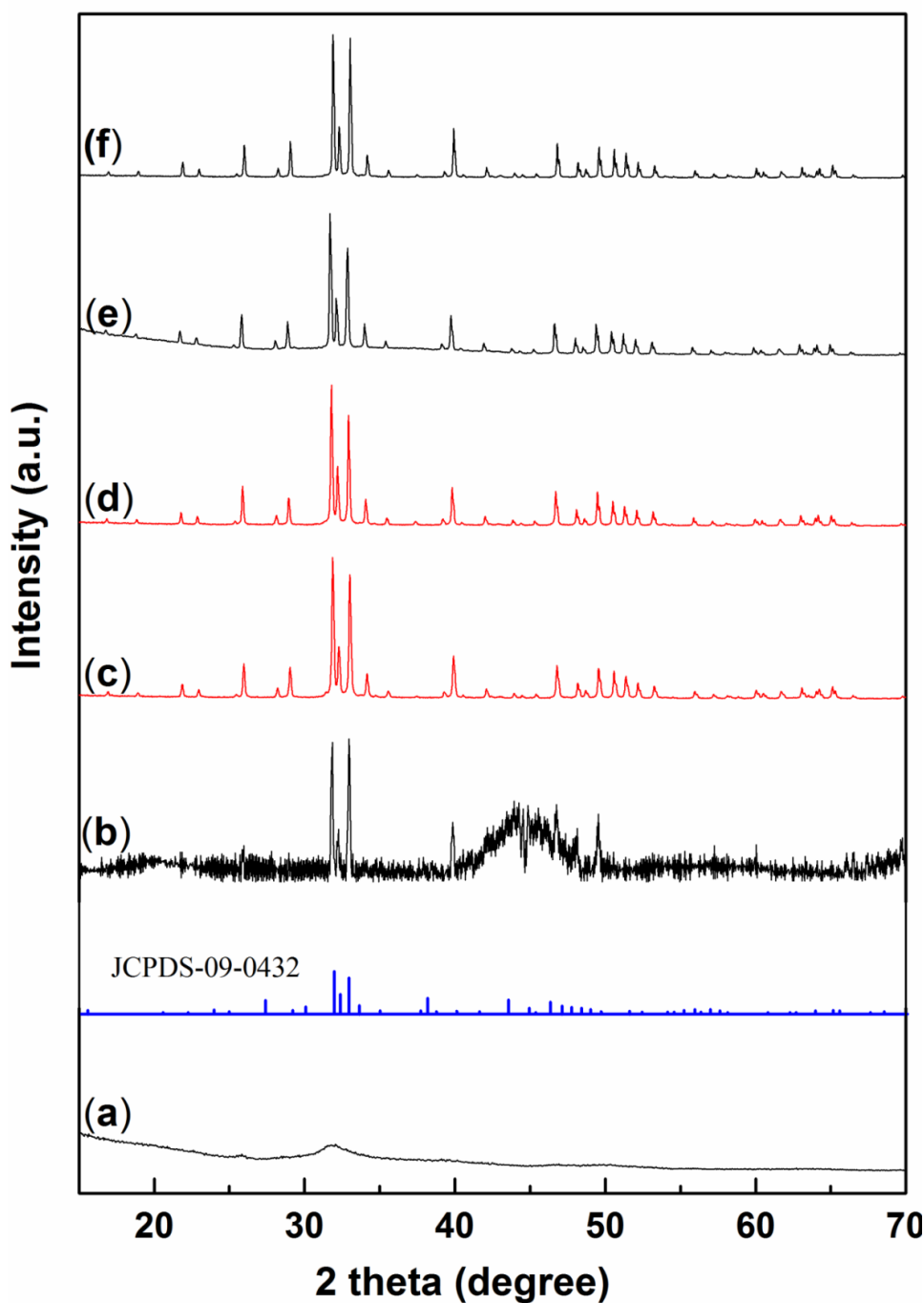


Giai đoạn 2: Phân hủy



Hình 3.14. Ảnh TEM của HA thu được từ xương cá Tra nung ở (a) 600°C, (b) 700°C, (c) 800°C, (d) 900°C và (e) 1000°C.

Kích thước trung bình của hạt HA tăng lên khi nhiệt độ nung tăng. Điều này được nhìn thấy tương tự trong ảnh SEM (Hình 3.13). Khi mẫu được nung ở 600°C, kích thước hạt HA khoảng 70 nm. Kích thước hạt sẽ tăng lên khi nhiệt độ nung tăng lên đến 800°C (khoảng 160 nm) và 1000°C (khoảng 350 nm). Hiện tượng này có thể là do sự hợp nhất của các hạt và hình thành các hạt HA lớn hơn ở nhiệt độ cao [118]. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến hình dạng và kích thước hạt cũng được thể hiện rõ trong ảnh TEM, Hình 3.14.



Hình 3.15. Phổ XRD của (a) xương cá Tra, HA (b) 600°C, (c) 700°C, (d) 800°C, (e) 900°C, (f) 1000°C trong 2 giờ và HA chuẩn.

Hình 3.15 trình bày phổ XRD của mẫu xương cá thô, các mẫu HA thu được trong điều kiện nung với nhiệt độ khác nhau trong khoảng 600 – 1000°C và HA chuẩn JCPDS-09-0432. Kết quả cho thấy, mẫu xương cá thô có tính chất vô định hình và không thấy xuất hiện peak đặc trưng của HA. Điều này có thể giải thích do phần HA trong xương cá thô được bao bọc bởi lớp hữu cơ chiếm hơn 50%.

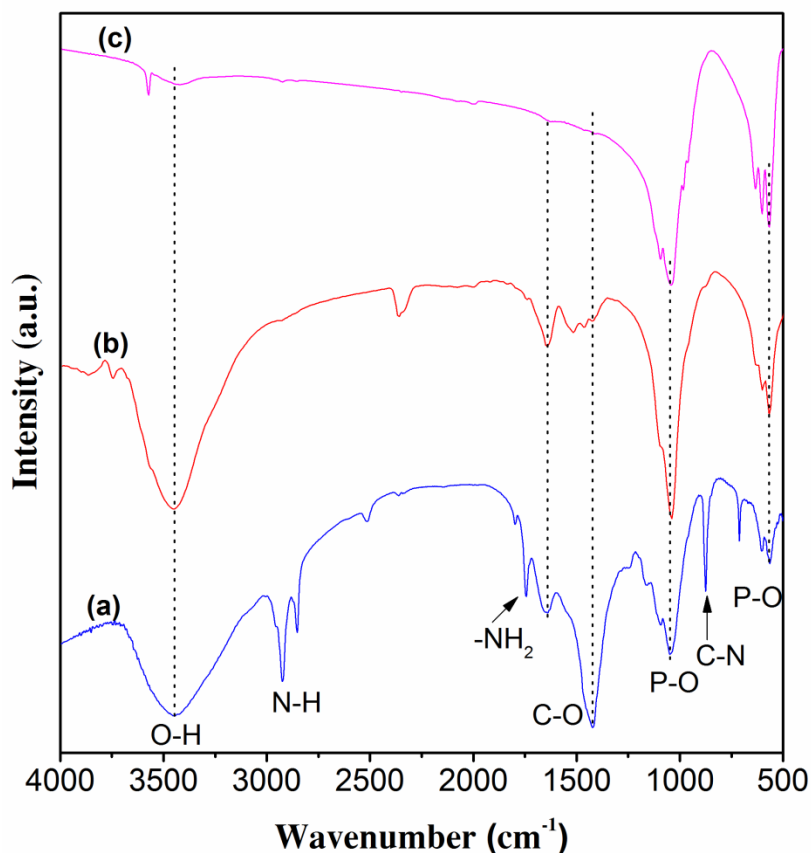
Khi nung ở 600°C, lượng hữu cơ trên bị phân hủy đáng kể và bắt đầu xuất hiện các peak đặc trưng của HA tại 2θ 32°, 40° và 50°. Tuy nhiên, vẫn còn tồn tại một peak rộng đặc trưng cho dạng vô định hình ở 45° chứng tỏ phần hữu cơ chưa bị phân hủy hoàn toàn. Các sản phẩm được nung từ 700 – 1000°C đều cho phổ XRD với các peak đặc trưng của HA, không còn peak của phần hữu cơ. Tuy nhiên, cường độ của các peak có sự khác nhau giữa sản phẩm nung ở 700 – 800°C so với 900 – 1000°C. Điều này là do sự phân hủy của HA thành dạng β -HA ở trên 900°C [36].

Khi nhiệt độ nung tăng lên 700, 800 và 900°C (Hình 3.15c, d, e), có hình thành các peak sắc nhọn, điều này cho thấy các chất hữu cơ đã bị loại bỏ và HA thu nhận có cấu trúc tinh thể cao. Tất cả các peak của mẫu HA được sắp xếp tương ứng với HA chuẩn JCPDS (xem ở hình 3.15). Hơn nữa, Khi nung ở 900°C, không có xuất hiện thêm peak mới, điều này chứng tỏ HA có độ tinh khiết cao [150]. Ở các nghiên cứu trước, HA ở nhiệt độ cao sẽ chuyển thành β – tricalcium phosphate (β – TCP) [112]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, sinh ra peak cho β – TCP khi nung đến 1000°C. Hiện tượng này cũng được tìm thấy trong HA từ xương cá sheelavati (*roho labio*) khi nung đến 1000°C [151].

Hình 3.16 biểu diễn phổ hồng ngoại FTIR của xương cá nguyên liệu và HA nung. Xương cá khô có chứa 02 thành phần gồm có hạt HA và sợi collagen [42]. Điều này chứng tỏ rằng khi loại bỏ collagen, nguyên liệu xương cá và mẫu HA nung ở 700°C được đo bằng phổ FT-IR (Hình 3.16).

Quan sát Hình 3.16 có thể thấy, Phổ FTIR của xương cá thô khác biệt rất nhiều so với xương cá đã nung. Phổ FTIR của HA, có 3 dãy băng thông bước sóng chính phụ thuộc vào sự có mặt của 3 nhóm chức như nhóm phosphate (PO_4^{3-}), hydroxyl (OH^-) và carbonate (CO_3^{2-}). Độ rộng của phổ ở bước sóng 3438 cm^{-1} là nhóm OH^- và có sự hấp thụ nước. 4 peak có phổ 564, 712, 871 và 1040 cm^{-1} là đặc trưng của nhóm PO_4^{3-} . Nhóm carbonate (CO_3^{2-}) xuất hiện bởi khí CO_2 từ không khí xâm nhập vào mẫu trong quá trình nung được đưa ra ở các bước sóng 1646 cm^{-1} và

1744 cm^{-1} . Phổ FTIR ở nghiên cứu này cũng phù hợp với phổ HA ở các nghiên cứu được báo cáo trước đó [111,158].



Hình 3.16. Phổ FTIR (a) xương cá Tra, HA (b) 700°C và (c) 900°C trong 2 giờ.

3.6.4. Ảnh hưởng của thời gian nung đến các đặc tính của HA

Thời gian nung có ảnh hưởng lớn đến quá trình đốt cháy để loại bỏ phần hữu cơ trong xương cá thô. Ngoài ra, thời gian nung còn ảnh hưởng đến hình thái, kích thước và cấu trúc tinh thể của hạt HA, độ xốp, kích thước hạt của sản phẩm HA [42]. Khi thời gian nung quá ngắn, không đủ thời gian để đốt cháy các phần hữu cơ, sản phẩm HA thu nhận còn lẫn phần hữu cơ nên có độ tinh khiết không cao. Nếu thời gian nung kéo dài sẽ làm mất nước triệt để, sản phẩm HA bị phân hủy, hiệu suất thu hồi thấp, kích thước hạt HA lớn, độ xốp giảm, năng lượng tiêu tốn lớn, chi phí sản xuất tăng lên, hiệu quả kinh tế thấp. Do vậy cần phải xác định thời gian nung thích hợp để thu nhận sản phẩm HA có chất lượng và hiệu quả tốt nhất. Kết quả ảnh hưởng của thời gian nung đến màu sắc, trạng thái và hiệu suất thu hồi HA cá Tra được trình bày ở Bảng 3.11.

Khi nung các mẫu HA ở cùng một chế độ nhiệt độ nung 700°C và tốc độ gia nhiệt 3°C/phút với các thời gian nung khác nhau sẽ thu nhận HA có màu sắc, trạng thái và hiệu suất thu hồi khác nhau. Ở thời gian 1 giờ nung cả mẫu HA thu nhận từ xương

cá Tra có màu xanh xám, điều này là do có sự tồn tại của Cu^{2+} trong HA. Khi kéo dài thời gian nung đến 2 giờ thì mẫu HA thu nhận mất màu xanh, màu của sản phẩm HA chuyển sang màu trắng sữa, điều này là do khi thời gian nung kéo dài sẽ làm mất đi hoàn toàn Cu^{2+} trong HA. Nếu tiếp tục kéo dài thời gian nung đến 4 - 5 giờ thì HA thu nhận có màu trắng ngà. Về trạng thái của HA, mẫu HA đều ở trạng thái giữ nguyên hình dạng ban đầu, ở thời gian 1 giờ mẫu có trạng thái hơi cứng, và độ xốp tăng lên ở các thời gian kéo dài.



Hình 3.17. HA thu nhận từ xương cá Tra ở mẫu 1 (1 giờ), mẫu 2 (2 giờ), mẫu 3 (3 giờ), mẫu 4 (4 giờ), mẫu 5 (5 giờ).

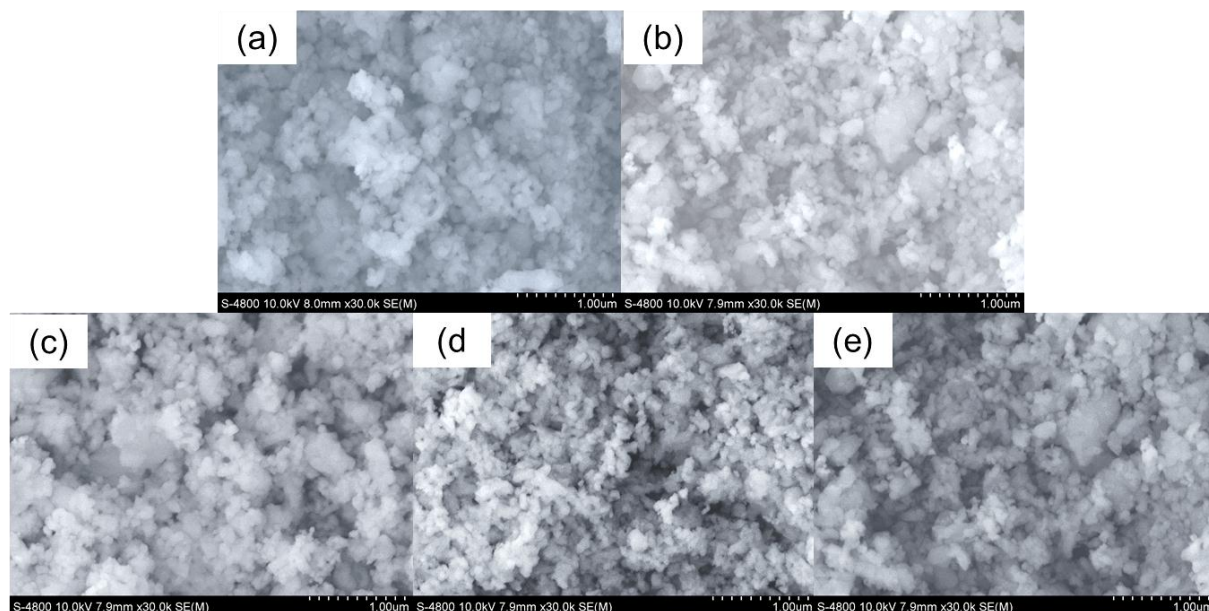
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của thời gian nung đến tính chất sản phẩm HA

Thời gian nung (giờ)	Tính chất sản phẩm HA		Hiệu suất thu hồi (%)
	Màu sắc	Trạng thái	
1	Xanh xám	Hơi cứng	$57,20^a \pm 0,85$
2	Trắng sữa	Xốp, mịn	$56,70^{ab} \pm 0,85$
3	Trắng sữa	Xốp, mịn	$56,30^{ab} \pm 0,67$
4	Trắng ngà	Xốp, mịn	$55,80^{ab} \pm 0,87$
5	Trắng ngà	Xốp, mịn	$55,50^{ab} \pm 0,92$

Bảng 3.11 cho thấy, hiệu suất thu hồi HA cá Tra sẽ giảm dần từ 57,20% xuống còn 55,50% khi thời gian nung từ 1 – 5 giờ, sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Cụ thể, khi tiến hành tăng thời gian nung lên từ 1 – 2 giờ thì hiệu suất thu hồi HA giảm từ 57,20% còn 56,70%, nếu tiếp tục kéo dài thời gian nung lên 3 – 5 giờ thì hiệu suất thu hồi HA giảm còn 55,50%. Quá trình này được lý giải, khi thời gian càng kéo dài thì các phần hữu cơ trong xương cá Tra bị đốt cháy, loại bỏ hoàn toàn, hơn nữa thời gian dài, sẽ làm cho HA bị mất nước triệt để, giảm khối lượng nên hiệu suất thu hồi HA giảm dần.

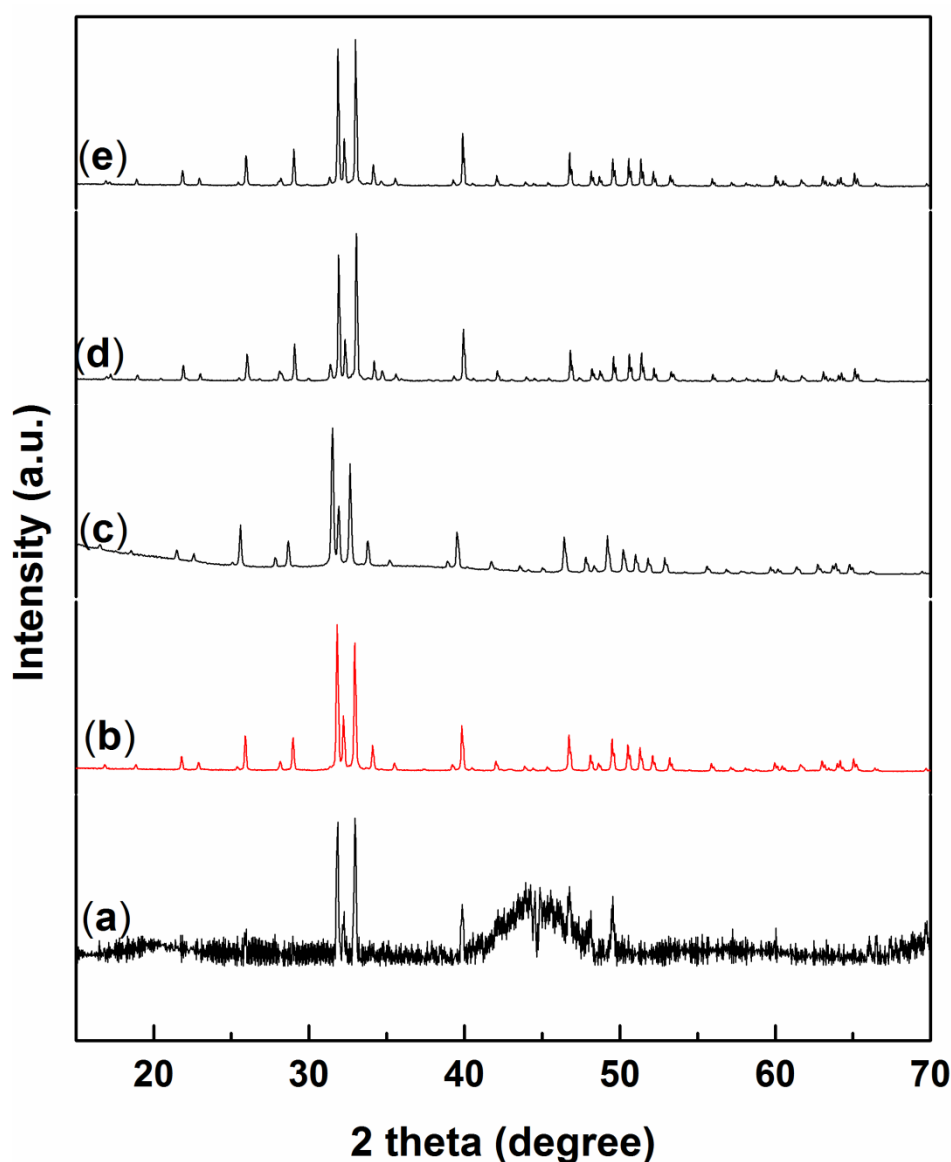
Hình 3.18 trình bày hình thái của HA qua phân tích SEM ở các thời gian nung khác nhau. Rõ ràng rằng, HA tất cả các mẫu có kích thước trong khoảng 300 nm và có

độ xốp cao. Nhưng, kích thước hạt HA không đồng nhất (30 – 300 nm) và bị kết tụ lại khi nung ở 1 giờ. Khi thời gian nung tăng lên 2 giờ, hạt HA nhỏ hơn và đồng đều hơn (50 – 70 nm). Điều này có thể giải thích rằng các hợp chất hữu cơ bị loại bỏ ra khỏi HA khi nung ở thời gian > 2 giờ. Tuy nhiên, hạt HA sẽ lớn hơn khi nung ở thời gian kéo dài 4 đến 5 giờ (100 – 200 nm).



Hình 3.18. Ảnh SEM của HA thu được từ xương cá Tra nung ở (a) 1 giờ, (b) 2 giờ, (c) 3 giờ, (d) 4 giờ và (e) 5 giờ.

Tiếp tục phân tích cấu trúc tinh thể của hạt HA qua phân tích XRD. Hình 3.19 trình bày phổ XRD của mẫu xương cá thô và các mẫu HA thu được trong điều kiện nung với thời gian khác nhau trong khoảng 1 – 5 giờ. Kết quả cho thấy, mẫu xương cá thô có tính chất vô định hình và không thấy xuất hiện peak đặc trưng của HA. Điều này có thể giải thích do phần HA trong xương cá thô được bao bọc bởi lớp hữu cơ chiếm hơn 50%. Khi nung ở 1 giờ, lượng hữu cơ trên bị phân hủy đáng kể và bắt đầu xuất hiện các peak đặc trưng của HA tại góc 2θ 32° , 40° và 50° . Tuy nhiên, vẫn còn tồn tại một peak rộng đặc trưng cho dạng vô định hình ở 45° chứng tỏ phần hữu cơ chưa bị phân hủy hoàn toàn. Các sản phẩm được nung từ 2 – 5 giờ đều cho phổ XRD với các peak đặc trưng của HA, không còn peak của phần hữu cơ. Tuy nhiên, cường độ của các peak có sự khác nhau giữa sản phẩm nung ở 2 giờ so với nung ở 3 – 5 giờ. Điều này là do sự phân hủy của HA thành dạng β -HA ở trên 2 giờ [36].



Hình 3.19. Phổ XRD của HA thu được ở các thời gian nung (a) 1 giờ, (b) 2 giờ, (c) 3 giờ, (d) 4 giờ và (e) 5 giờ

3.6.5. Ảnh hưởng của tốc độ nâng nhiệt nung đến HA thu nhận.

Tốc độ gia nhiệt nung có ảnh hưởng lớn đến quá trình đốt cháy để loại bỏ phần hữu cơ trong xương cá thô. Ngoài ra còn ảnh hưởng đến hình thái, kích thước và cấu trúc tinh thể của hạt HA, độ xốp, kích thước hạt của sản phẩm HA [42]. Nếu tốc độ nung lớn sẽ làm bay hơi nước trên bề mặt sản phẩm HA lớn, tạo màng cứng trên bề mặt ngăn cản sự di chuyển nước từ bên trong ra bề mặt sản phẩm, sản phẩm khô không đều, ảnh hưởng đến màu sắc sản phẩm HA. Ngoài ra, tốc độ lớn HA sẽ bị phân hủy chuyển thành β -HA [35], hiệu suất thu hồi thấp, hạt HA có kích lớn, độ xốp giảm. Do vậy cần phải xác định tốc độ gia nhiệt nung thích hợp để thu nhận sản phẩm HA có màu sắc, chất lượng và hiệu quả tốt nhất. Ảnh hưởng của tốc độ gia nhiệt nung đến màu sắc và trạng thái HA cá Tra được trình bày ở Bảng 3.12.

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của tốc độ gia nhiệt nung đến tính chất sản phẩm HA

Tốc độ nung (°C/phút)	Tính chất của HA		Hiệu suất thu hồi (%)
	Màu sắc	Trạng thái	
3	Trắng sữa	Xốp, mịn	57,10 ^a ± 0,80
5	Trắng sữa	Xốp, mịn	55,60 ^b ± 0,74
7	Trắng ngà	Xốp, mịn	55,30 ^b ± 0,68
10	Trắng ngà	Xốp, mịn	55,10 ^b ± 0,75

Khi nung các mẫu HA ở cùng một chế độ nhiệt độ nung 700°C, thời gian nung 2 giờ với các tốc độ gia nhiệt khác nhau 3°C/phút, 5°C/phút, 7°C/phút và 10°C/phút sẽ thu nhận HA có màu sắc, trạng thái và hiệu suất thu hồi khác nhau.

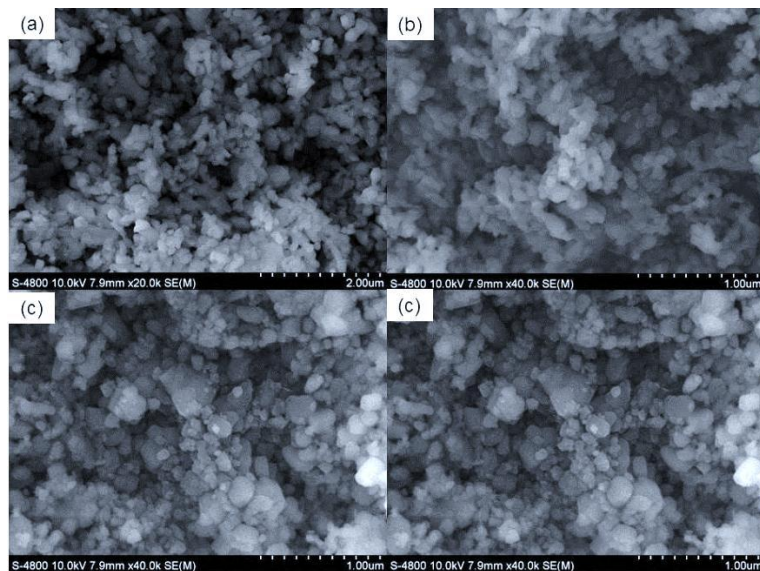
Ở tốc độ gia nhiệt nung 3°C/phút cả mẫu HA thu nhận từ xương cá Tra có màu trắng sữa. Khi nâng tốc độ gia nhiệt nung từ 5°C/phút mẫu HA thu nhận chuyển sang màu trắng ngà. Điều này là được giải thích, khi tốc độ gia nhiệt quá lớn (>3°C/phút) sẽ làm cho quá trình mất nước trong HA xảy ra sâu sắc, hơn nữa tốc độ gia nhiệt lớn sẽ xảy ra hiện tượng cháy bề mặt làm cho sản phẩm HA có màu trắng ngà. Về trạng thái của HA, tất cả mẫu HA đều ở trạng thái giữ nguyên hình dạng ban đầu, mẫu đều có độ xốp, mịn.

Từ Bảng 3.12 có thể thấy, hiệu suất thu hồi HA cá Tra sẽ giảm dần từ 57,10 % còn 55,10% khi tăng tốc độ gia nhiệt nung từ 3°C/phút đến 10°C/phút, sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Hiệu suất thu hồi của HA ở tốc độ gia nhiệt 3°C/phút là cao nhất 57,1 %, khi tăng tốc độ gia nhiệt lên 5°C/phút, 7°C/phút và 10°C/phút thì hiệu suất thu hồi HA giảm còn 55,10%. Điều này được giải thích, khi tốc độ gia nhiệt càng lớn thì quá trình nung sự mất nước diễn ra càng mạnh mẽ làm giảm khối lượng HA và hiệu suất thu hồi HA giảm.

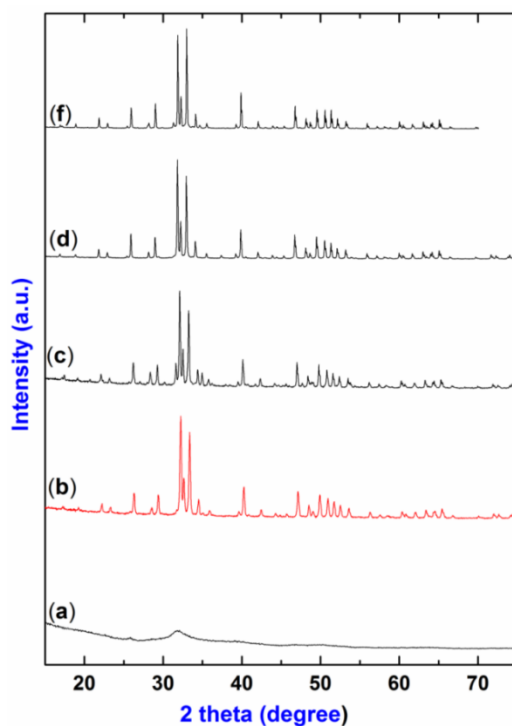


Hình 3.20. HA cá Tra thu nhận ở các tốc độ gia nhiệt nung, mẫu 1 (3°C/phút), mẫu 2 (5°C/phút), mẫu 3 (7°C/phút) và mẫu 4 (10°C/phút).

Hình 3.21 trình bày hình thái của HA qua phân tích SEM ở các tốc độ gia nhiệt nung khác nhau. Rõ ràng rằng, HA tất cả các mẫu có kích thước trong khoảng 30 - 300 nm và có độ xốp cao. Nhưng, kích thước hạt HA không đồng nhất và bị kết tụ lại khi nung ở tốc độ gia nhiệt nung $> 3^{\circ}\text{C}/\text{phút}$. Điều này có thể giải thích rằng khi tốc độ gia nhiệt nung lớn 5, 7 và $10^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ thì nước trong sản phẩm HA chỉ thoát ra trên bề mặt còn bên trong không thoát ra kịp.



Hình 3.21. Ảnh SEM của HA thu được từ xương cá Tra nung ở tốc độ gia nhiệt (a) $3^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, (b) $5^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, (c) $7^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ và (d) $10^{\circ}\text{C}/\text{phút}$.



Hình 3.22. Phổ XRD của (a) xương cá thô và HA thu được ở các tốc độ gia nhiệt (b) $3^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, (c) $5^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, (d) $7^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ và (e) $10^{\circ}\text{C}/\text{phút}$

Hình 3.22 trình bày kết quả phân tích độ rắn cấu trúc tinh thể hạt HA bằng phổ XRD của mẫu xương cá thô và các mẫu HA thu được trong điều kiện nung với tốc độ gia nhiệt khác nhau ở 3, 5, 7 và 10°C/phút. Kết quả cho thấy, mẫu xương cá thô có tính chất vô định hình và không thấy xuất hiện peak đặc trưng của HA. Điều này có thể giải thích do phần HA trong xương cá thô được bao bọc bởi lớp hữu cơ chiếm hơn 50%. Khi nung ở 3, 5, 7 và 10°C/phút, lượng hữu cơ trên bị phân hủy và điều cho phổ XRD với các peak đặc trưng của HA, không còn peak của phần hữu cơ.

Như vậy, khi xử lý nhiệt bằng cách nung xương cá Tra thô ở điều kiện: nhiệt độ 700°C, tốc độ gia nhiệt đến nhiệt độ nung 3°C/phút, thời gian nung 2 giờ, sản phẩm HA thu nhận từ xương cá Tra có kích thước nhỏ nhất 50-70nm, đồng nhất và có độ xốp cao do đó giúp cho tôm thẻ chân trắng 20 - 55 ngày tuổi có thể dễ dàng hấp thu.

Sản phẩm HA chứa chủ yếu là Ca và P. Đây là các nguyên tố đa lượng quan trọng trong thức ăn tôm. Trong sản phẩm HA thu nhận còn có các nguyên tố vi lượng như Na, K, Mg, Zn, Al. Các nguyên tố vi lượng này không tìm thấy trong các sản phẩm HA tổng hợp bằng phương pháp hóa học. Hơn nữa, các nguyên tố Cd, Hg và Pb không được tìm thấy trong mẫu HA (thấp hơn ngưỡng phát hiện ICP-MS), điều này cho thấy HA được sản xuất có độ tinh khiết cao, rất an toàn và có nhiều tiềm năng ứng dụng trong thức ăn tôm.

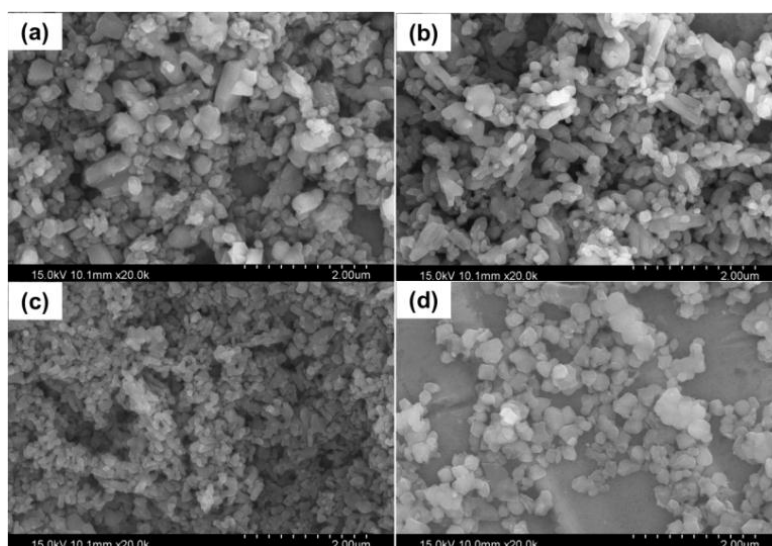
Ngoài ra, Sản phẩm HA thu được từ nguồn tự nhiên (xương cá) và qua xử lý ở nhiệt độ cao (700°C) có độ tương thích sinh học cao, an toàn khi sử dụng làm thức ăn cho tôm.

3.6.6. Một số phân tích và so sánh với HA từ nguồn khác

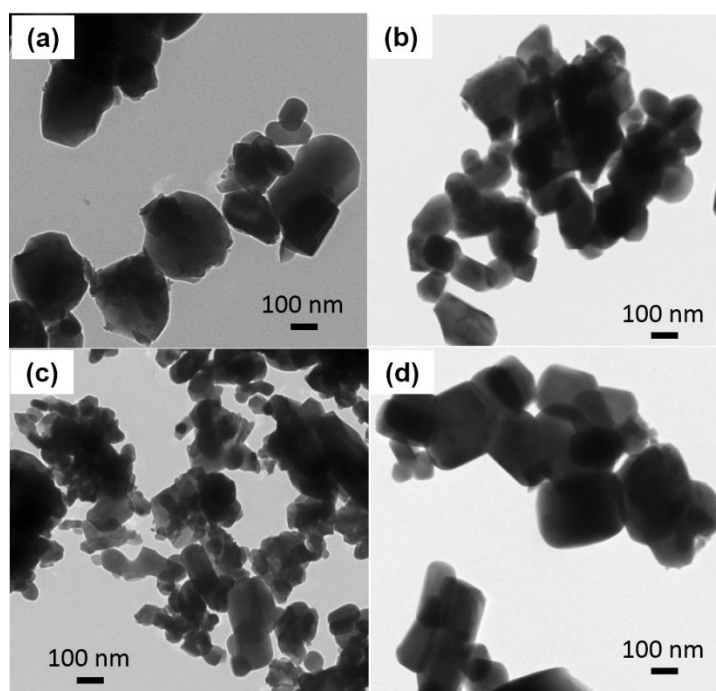
Sản phẩm HA thu nhận được đánh giá, đo đạc về màu sắc, thành phần hóa học, hình dạng, kích thước, độ kết tinh, độ xốp để làm cơ sở đề xuất các ứng dụng sản phẩm HA cho phù hợp với các lĩnh vực. Đồng thời, cũng tiến hành so sánh các kết quả đánh giá HA từ xương cá Tra với HA thu nhận từ các loại xương cá rô phi, xương cá chẽm, xương cá ngừ.

Hình thái, kích thước hạt HA từ xương các loại cá Tra, rô phi, chẽm, ngừ khi nung ở 700°C bằng kính hiển vi điện tử quét SEM và kính hiển vi điện tử truyền qua TM, kết quả được trình bày trên Hình 3.23 & 3.24.

Mẫu HA thu nhận từ xương cá chẽm và cá Tra có kích thước nhỏ nhất 50-70nm và đồng nhất, nhưng các hạt HA từ cá Tra có sự trộn lẫn các hạt lớn và nhỏ. HA từ cá rô phi và xương cá ngừ đồng nhất và kích thước khoảng 150nm.



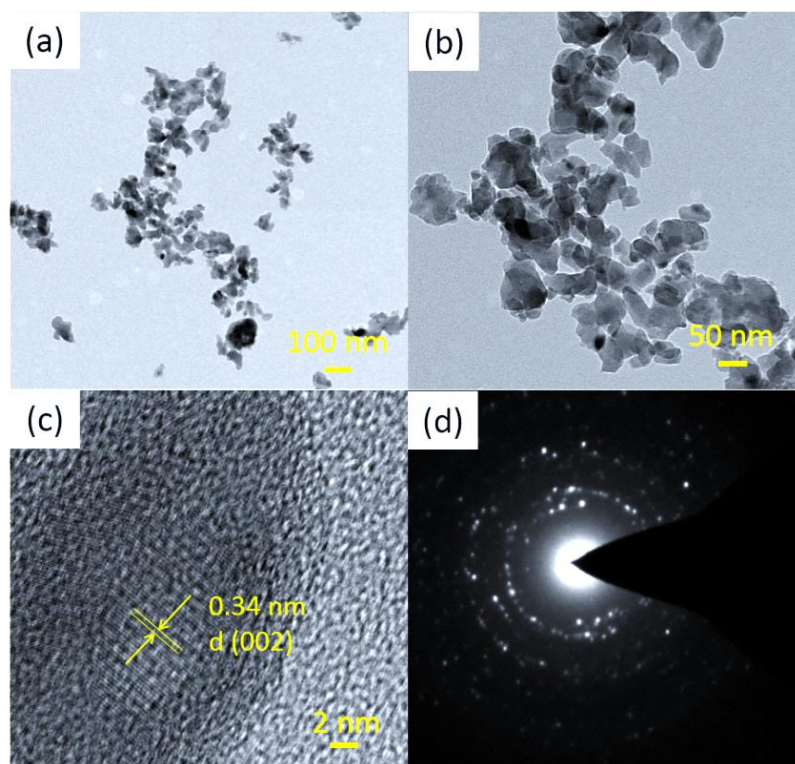
Hình 3.23. Ảnh SEM của HA thu được ở 700°C từ xương (a) cá Tra, (b) cá Rô phi, (c) cá Chêm và (d) cá Ngừ



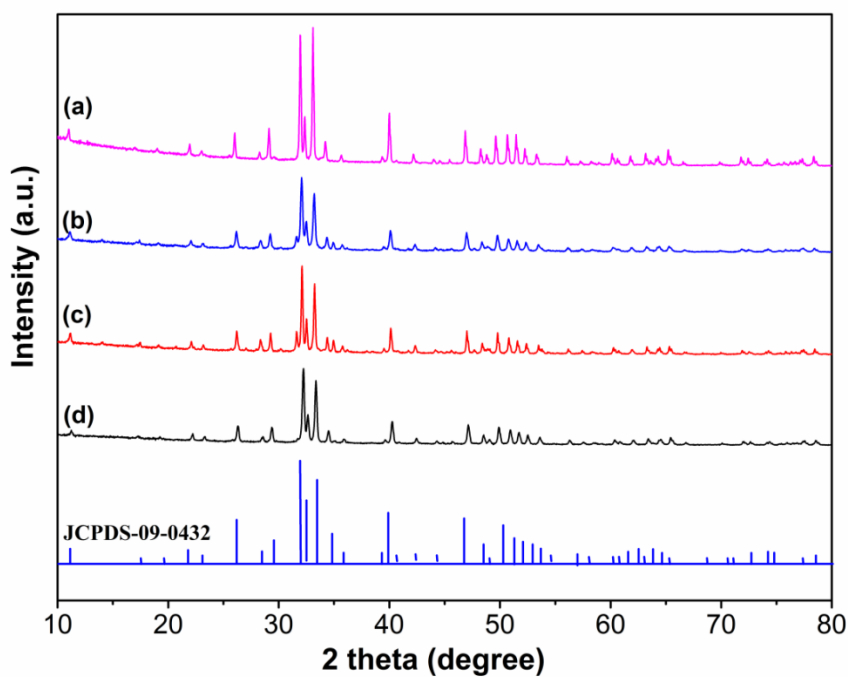
Hình 3.24. Ảnh TEM của HA thu được ở 700°C từ xương (a) cá Tra, (b) cá Rô phi, (c) cá Chêm và (d) cá ngừ.

Tiếp tục phân tích hình thái, kích thước hạt HA từ xương cá Tra khi nung ở 700°C bằng kính hiển vi điện tử quét với độ phân giải cao, kết quả được trình bày trên Hình 3.23. Hạt HA có kích thước 50 – 70 nm, xốp (Hình 3.25a & 3.25). Một vài hạt kích thước lớn là do sự tập hợp của rất nhiều hạt kích thước nhỏ. Cấu trúc nano HA cho thấy bề mặt vật liệu từ ảnh TEM có độ phân giải cao (Hình 3.25c). Khoảng cách giữa các hạt liên kề khoảng 0,34 nm, khoảng cách này bằng với khoảng cách HA (220) tiêu chuẩn (Hình 3.25c) [30].

Vùng mẫu nhiễu xạ electron được trình bày gồm các vòng nhiễu xạ được xác định rõ, điều này cho thấy các đặc điểm đa tinh thể của chúng (hình 3.25d).



Hình 3.25. Ảnh (a,b) TEM, (c) HRTEM và (d) mẫu SAED của HA thu được từ xương cá Tra ở 700°C với các độ phóng đại khác nhau.



Hình 3.26. Phổ XRD của xương (a) cá Tra, (b) cá rô phi, (c) cá Chẽm, (d) cá Ngừ và HA chuẩn JCPDS-09-0432

Hình 3.26 trình bày phổ XRD của mẫu HA thu nhận từ xương các loại cá thô: cá Tra, cá rô phi, cá chẻm và cá ngừ trong điều kiện nung 700°C, tốc độ gia nhiệt 3°C/phút, thời gian nung 2 giờ và HA chuẩn JCPDS-09-0432.

Kết quả cho thấy, sản phẩm HA thu nhận từ các mẫu xương cá thô đều cho phổ XRD có xuất hiện các peak đặc trưng của HA tại góc 2θ 32°, 40° và 50°, không có các peak tạp và trùng với các peak HA chuẩn JCPDS-09-0432. Tuy nhiên, cường độ của các peak có sự khác nhau giữa sản phẩm HA các loại xương cá khác nhau.

Bột HA được phân tích thành phần các nguyên tố kim loại. Kết quả phân tích thành phần nguyên tố và tỷ lệ phân tử Ca/P của bột HA từ xương cá Tra và các loại xương cá khác được trình bày trong Bảng 3.13 & 3.14.

Theo kết quả từ Bảng 3.14, thành phần nguyên tố chính trong mẫu HA là canxi (khoảng 302903 - 356538 (mg/kg)) và photpho (khoảng 165539 - 195900 (mg/kg)), tương ứng HA cá Tra, cá chẻm. Ngoài ra trong sản phẩm HA thu nhận còn có các nguyên tố natri (4439,30), kali (963,73), magiê (2,03), kẽm (138,69) và nhôm (0,35) (mg/kg). Giá trị trung bình tỷ lệ phân tử Ca/P khoảng 1,83, tỷ lệ này cao hơn so với tỷ lệ chuẩn phân tử Ca/P trong xương người là 1,67. Sự khác nhau này có thể là quá trình nung xương cá làm phá hủy HA để chuyển thành canxi oxít (CaO) hoặc β -tricalcium phosphate (β -TCP; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), kết quả là làm tăng tỷ lệ phân tử Ca/P [28,42,100]. Hàm lượng các nguyên tố Mg, Na và K trong các loại xương cá và quá trình nung xương cá có thể làm ảnh hưởng đến tỷ lệ Ca/P [94]. Hiện tượng này cũng được công bố bởi các báo cáo trước [43,75,163].

Bảng 3.13. Thành phần nguyên tố của HA xương cá

Nguồn HA		Hàm lượng						Ca/P	Tham khảo
		Ca	P	Na	K	Mg	Zn		
Cá ngừ	(%)	42,3	17,3	0,39	0,01	0,22	-	1,89	[42]
Cá cò kiếm	(%)	41,8	17,5	0,51	0,02	0,40	-	1,84	
Cá sông Braxin	g/100 g	37,1	18,1	0,70	1,01	0,55	0,88	1,59	[50]
Cá ngừ	Nguyên tố /mmol.g ⁻¹	9,4	6,2	0,71	0,06	0,02	<0,001	1,53	[80]
Cá cam		9,3	6,2	0,66	0,10	0,15	<0,001	1,51	
Cá ngừ		9,4	6,1	0,67	0,04	0,13	<0,001	1,63	
Cá song		9,03	6,3	0,59	0,11	0,21	<0,001	1,42	

Ngoài ra, ta có thể nhìn thấy trong Bảng 3.14, có nhiều vết nguyên tố được tìm thấy trong tất cả các mẫu HA, gồm Na, K, Mg, Zn và Al. Hiện tượng này cũng được tìm thấy trong một số HA từ các loại xương cá khác được trình bày trong bảng 3.15. Sự hiện diện của các vết kim loại này trong mẫu HA có thể ảnh hưởng trực tiếp đến một số phản ứng sinh hóa liên quan đến quá trình Trao đổi chất trong xương [25], đặc biệt là sử dụng HA cho quá trình tái tạo xương [107]. Thực tế, sự hiện diện của các ion Na^+ và Mg^{2+} có thể tăng cường sự phát triển của xương và răng, trong khi đó nếu thiếu chúng sẽ là nguyên nhân làm xương dễ bị gãy vỡ [26]. Điều rất đặc biệt là, ở Bảng 3.14 cho thấy, các nguyên tố các di mi (Cd), thủy ngân (Hg) và chì (Pb) không được tìm thấy trong mẫu HA (thấp hơn ngưỡng phát hiện ICP-MS), điều này cho thấy HA được sản xuất có độ tinh khiết cao, rất an toàn và có nhiều tiềm năng ứng dụng trong các lĩnh vực thực phẩm, y dược và chăn nuôi.

Bảng 3.15 trình bày kết quả phân tích XRF của HA từ xương cá Tra và các loại xương cá khác được nung ở 700°C trong thời gian nung 2 giờ. Hai ôxít kim loại, CaO (55,80 wt.%) và P_2O_5 (35,60 wt.%), đây là thành phần chính được tìm thấy trong tất cả các mẫu HA, điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích thành phần kim loại được trình bày ở bảng 3.14 và phụ thuộc vào loại cá khác nhau. Hơn nữa, tỷ lệ phần trăm ôxít kim loại của các nguyên tố khác như Na, Mg, Al và Sr cũng có trong tất cả bột HA. Tỷ lệ phân tử Ca/P của mẫu HA được tính toán từ kết quả XRF khoảng 1,80. Giá trị này rất phù hợp với kết quả phân tích theo ICP-MS đã được mô tả ở trên.

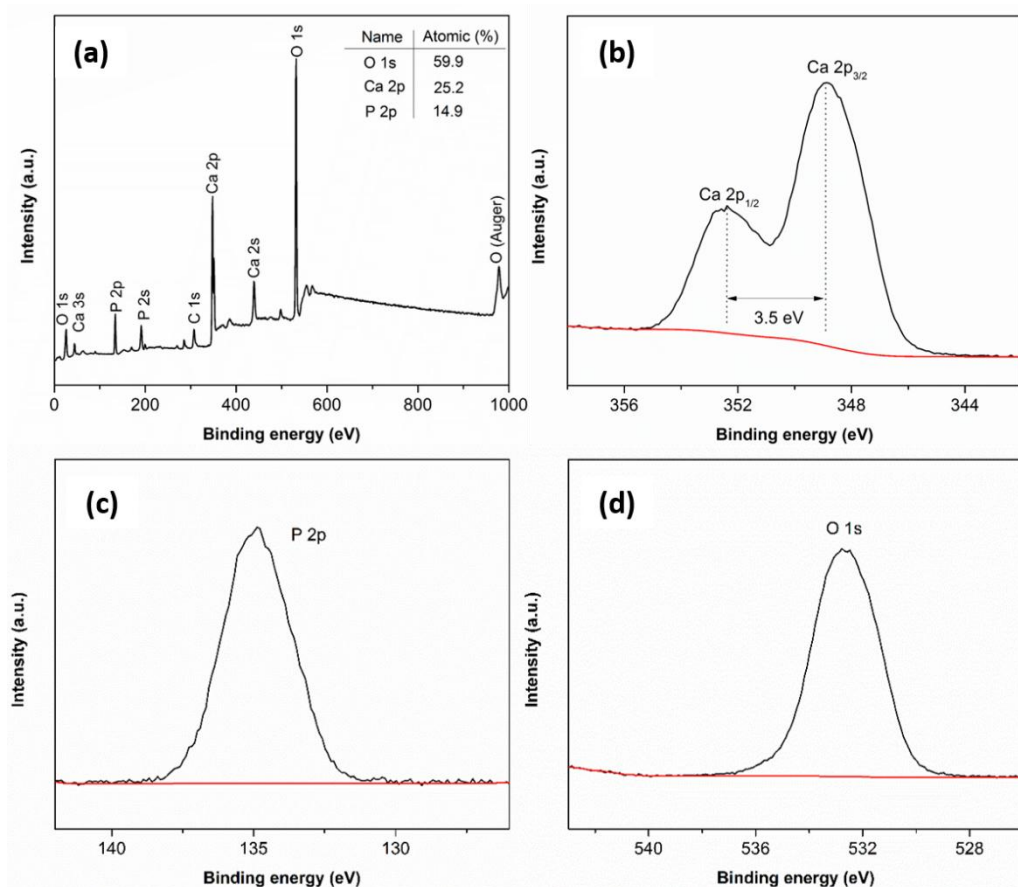
Hàm lượng nguyên tố khoáng chính canxi, photpho và ôxít của chúng trong sản phẩm HA thu hồi từ xương cá Tra chiếm hơn 90%, đây là nguồn cung cấp chất khoáng rất tiềm năng để bổ sung vào thức ăn tôm thẻ chân trắng 20 – 55 ngày tuổi.

Diện tích bề mặt, thể tích lỗ và kích thước lỗ trung bình của tất cả mẫu HA được nung ở 700°C trong thời gian 2 giờ, với tốc độ nâng nhiệt $3^\circ\text{C}/\text{phút}$ được trình bày trong Bảng 3.17 và Hình 3.28. Giá trị diện tích bề mặt của sản phẩm HA thu nhận từ xương cá rô phi có giá trị lớn nhất ($32,38 \text{ m}^2/\text{g}^{-1}$) gần đạt đến giá trị của HA thương mại ($40,39 \text{ m}^2/\text{g}^{-1}$), trong khi đó, HA thu nhận từ xương cá Tra ($2,87 \text{ m}^2/\text{g}^{-1}$), cao hơn so với HA thu nhận từ xương cá ngừ ($1,65 \text{ m}^2/\text{g}^{-1}$).

Ngoài ra, thành phần nguyên tố trong sản phẩm HA từ xương cá Tra được nung ở 700°C trong 2 giờ được đo bằng phổ XPS (Hình 3.27). Phổ XPS tổng cung cấp

thông tin về thành phần các nguyên tố có trong mẫu. Trong khi, trạng thái oxy hóa của các nguyên tố phát hiện được trong phổ có độ phân giải cao.

Hình 3.27a cho thấy sự xuất hiện của các nguyên tố chính có trong HA gồm Ca, P, O. Nguyên tố một đỉnh nhỏ C xuất hiện do bụi hydrocarbon thường xuất hiện trong phổ XPS. Phần trăm nguyên tử của các nguyên tố là 25.2% (Ca), 14.9 (P), 59.9 (O). Tỷ lệ Ca/P của sản phẩm HA là 1,72. Đây là tỷ lệ khá gần như trong răng và xương người (1,67). Phổ XPS độ phân giải cao cho thấy nguyên tử Ca và O tồn tại dưới dạng hóa trị II (CaO) và P tồn tại ở dạng hóa trị IV.



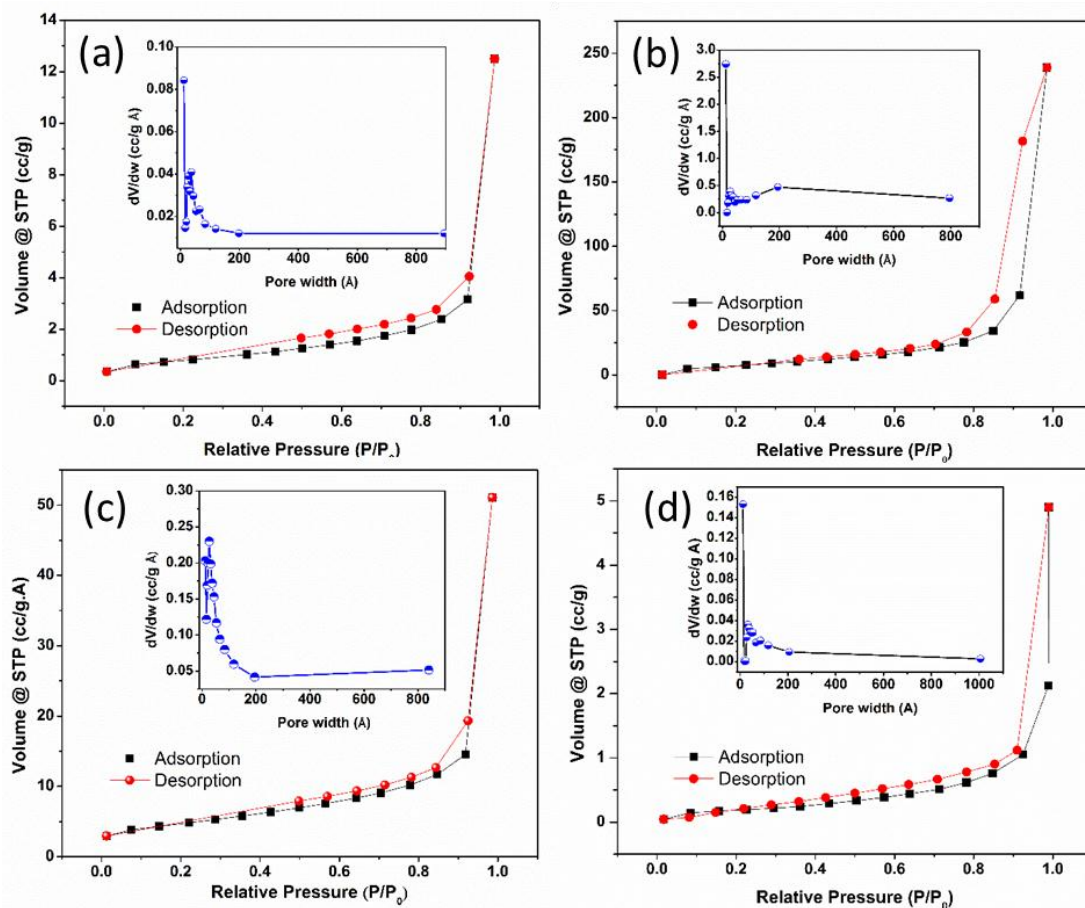
Hình 3.27. (a) Phổ XPS tổng của HA và phổ XPS phân giải cao của (b) Ca 2p, (c) P 2p và (d) O 1s.

Bảng 3.14. Kết quả thành phần nguyên tố của HA từ xương cá thô

Nguồn HA	Hàm lượng (ppm)							Hàm lượng (ppb)				Ca/P
	Ca	P	Na	K	Mg	Zn	Al	Pb	Hg	Cd	As	
Cá Tra	302903	165539	4439,3	963,7	2,03	138,7	0,4	KPH	KPH	KPH	34,60	1,83
Cá rô Phi	318928	177182	19044,7	506,04	1,69	172,8	-	KPH	KPH	KPH	672,50	1,80
Cá Chêm	356538	195900	8640,3	1306,4	1,01	86,3	-	KPH	KPH	KPH	395,46	1,82
Cá Ngừ	321673	176339	6076,8	1705,2	0,96	110,9	-	KPH	KPH	KPH	194,31	1,82

Bảng 3.15. Thành phần ôxit kim loại của HA từ xương cá thô.

Nguồn HA	Hàm lượng (wt.%)										
	CaO	P ₂ O ₅	MgO	Na ₂ O	K ₂ O	SrO	Al ₂ O ₃	SiO ₂	Fe ₂ O ₃	CuO	ZnO
Cá Tra	55,80	35,60	2,13	5,65	0,18	0,08	0,35	0,07	0,08	0,02	0,02
Cá rô Phi	55,53	31,72	1,72	10,24	0,00	0,11	0,38	0,26	0,00	0,01	0,01
Cá Chêm	47,08	30,63	1,28	20,43	0,03	0,18	0,28	0,04	0,00	0,03	0,01
Cá Ngừ	56,47	33,59	1,61	7,57	0,13	0,14	0,38	0,00	0,00	0,06	0,02



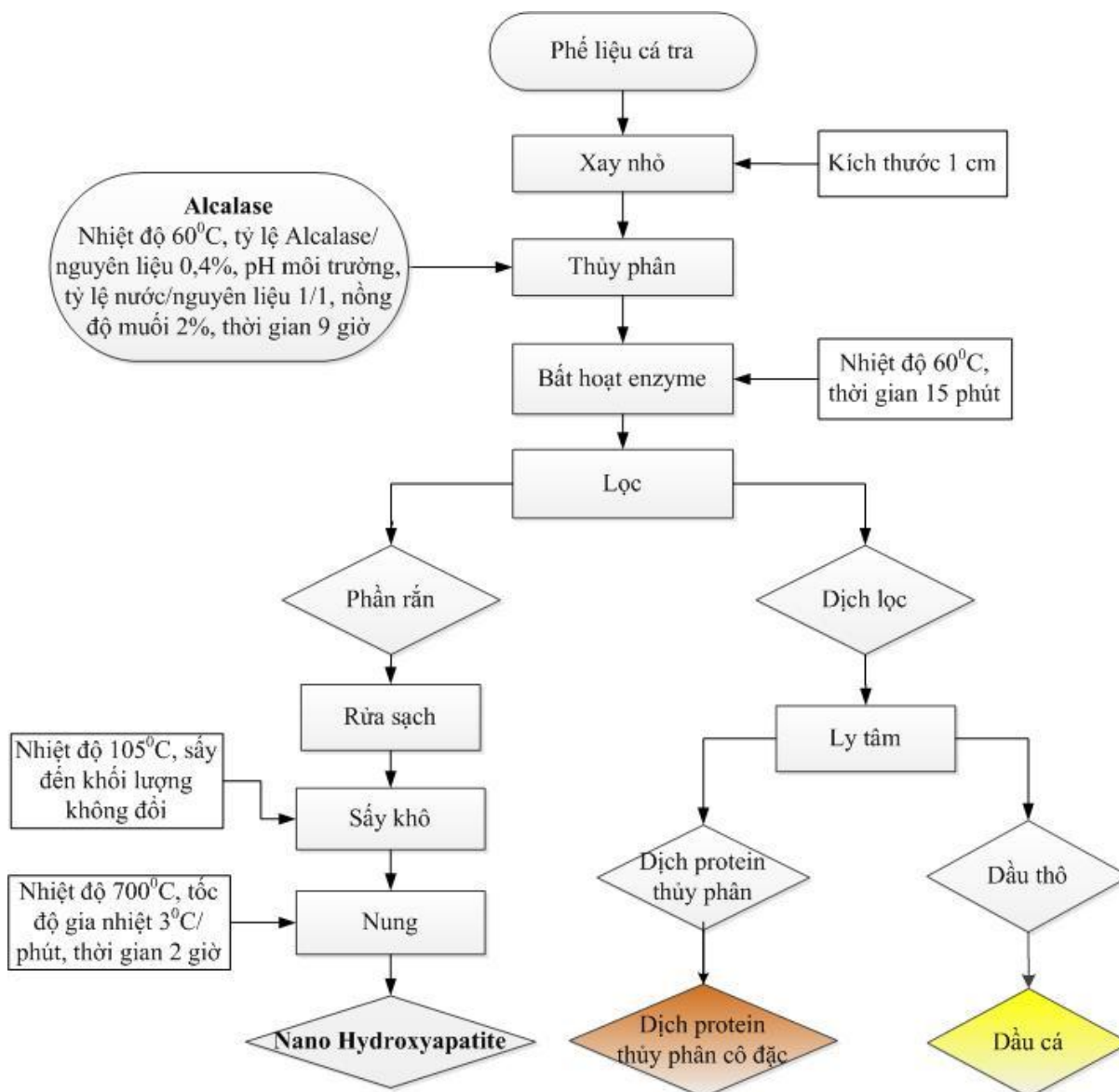
Hình 3.28. Đồ thị hấp và giải hấp của HA thu được từ xương (a) cá Tra, (b) cá rô phi, (c) cá Chêm, (d) cá Ngừ.

HA từ xương cá Tra có thể tích lỗ xốp của hạt HA ($0,020 \text{ m}^3/\text{g}$). Trong khi, HA từ xương cá rô phi ($0,39 \text{ m}^3/\text{g}$), thấp nhất là HA cá ngừ ($0,008 \text{ m}^3/\text{g}$). Kích cỡ lỗ xốp trung bình của hạt HA cá chêm có giá trị cao nhất là $2,7 \text{ nm}$ và HA từ cá Tra, cá rô phi, cá ngừ có giá trị khoảng $1,2 \text{ nm}$. Như vậy, các giá trị diện tích bề mặt, thể tích lỗ và kích thước lỗ trung bình của HA phụ thuộc nhiều vào nguồn nguyên liệu.

Bảng 3.16. Diện tích bề mặt của HA từ xương cá Tra và một số loại cá khác

Nguồn HA	Diện tích bề mặt (m^2/g)	Thể tích lỗ xốp (m^3/g)	Kích cỡ lỗ xốp trung bình (nm)
Cá Tra	2,87	0,020	1,20
Cá Rô Phi	32,38	0,390	1,20
Cá Chêm	16,49	0,079	2,70
Cá Ngừ	1,65	0,008	1,30
HA thương mại	40,39	0,07	7,72

3.7. Đề xuất quy trình sản xuất hydroxyapatite dạng nano từ xương cá Tra



Hình 3.29. Sơ đồ quy trình thu nhận hydroxyapatite từ phế liệu cá Tra.

Từ kết quả nghiên cứu các thông số thích hợp ở các công đoạn như: tiền xử lý nguyên liệu và nung thu được trong quá trình thực hiện nghiên cứu, đề xuất quy trình thu nhận hydroxyapatite kích thước nano từ phế liệu cá Tra ở qui mô phòng thí nghiệm. Quy trình thu nhận HA được trình bày ở sơ đồ Hình 3.29. Từ sơ đồ qui mô phòng thí nghiệm là cơ sở để tiến hành sản xuất thử nghiệm ở qui mô lớn hơn.

Cho một lượng phế liệu cá Tra xay nhỏ kích thước 1cm vào bể thủy phân chứa nước cất với tỷ lệ mẫu/nước 1/1, khuấy trộn đều phế liệu trong 5 phút. Thêm vào enzyme alcalase với hàm lượng 0,4% so với khối lượng nguyên liệu, khuấy trộn đều. Thực hiện quá trình thủy phân ở 60°C trong 9 giờ. Khi quá trình thủy phân kết thúc, tiến hành bất hoạt enzyme ở 95°C, thời gian 15 phút. Sau đó, phân tách riêng phần

lông và phần rắn. Phần lông được ly tâm ở 15000 vòng/phút để tách lớp dầu phía trên và dịch protein thủy phân ở dưới bình thủy phân. Phần rắn (chủ yếu là xương cá) được rửa sạch 3 lần bằng nước nóng và sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi, thu nhận xương cá thô. Xương cá thô được nung ở 700°C trong lò nung (Dongwan Scientific Co. A/S. 051245 – 7521) với tốc độ nâng nhiệt 3°C/phút, trong 2 giờ. Sau đó làm mát mẫu đến nhiệt độ phòng, sản phẩm thu nhận được nghiền nhỏ và đánh giá các tính chất.

3.8. Nghiên cứu hiệu quả việc thử nghiệm bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy phân và hydroxyapatite từ phế liệu cá Tra vào thức ăn tôm thẻ chân trắng 20 – 55 ngày tuổi

Trong quá trình nuôi tôm thử nghiệm, môi trường nước nuôi tôm, gồm các chỉ tiêu hóa lý: nhiệt độ, pH môi trường, hàm lượng oxi hòa tan (DO), Độ kiềm, NO_2^- , NH_4^+ và chỉ tiêu vi sinh vật: tổng số vi sinh vật hiếu khí, vi khuẩn vibrio có ảnh hưởng rất lớn đến tỷ lệ sống, tốc độ tăng trưởng và năng suất của quá trình nuôi tôm. Do vậy, các thông số môi trường nuôi phải luôn luôn được theo dõi và kiểm soát sao cho các chúng nằm trong khoảng thích hợp nhất để môi trường nuôi tôm không bị nhiễm bẩn, tôm không bị dịch bệnh, tôm sinh trưởng và phát triển tốt từ lúc thả nuôi tôm cho đến khi kết thúc quá trình nuôi, đạt được tỷ lệ sống, tốc độ tăng trưởng và năng suất tôm cao nhất mong muốn. Do đó, khi bổ sung hỗn hợp sản phẩm dịch protein và HA từ phế liệu cá Tra vào thức ăn tôm thương mại dạng viên cũng phải được đánh giá ảnh hưởng của thức ăn bổ sung đến môi trường nuôi tôm thực nghiệm

3.8.1. Ảnh hưởng của hỗn hợp bổ sung đến các chỉ tiêu hóa lý môi trường nuôi

Thu nhận và thực hiện xử lý kết quả thí nghiệm thấy rằng, điều kiện môi trường nuôi ở tất cả các nghiệm thức nằm trong khoảng thích hợp cho sự tăng trưởng và phát triển của tôm thẻ chân trắng. Kết quả đo các thông số môi trường nuôi được trình bày ở Bảng 3.17.

Cụ thể, nhiệt độ trung bình buổi sáng và buổi chiều ở 05 nghiệm thức thí nghiệm chênh lệch không nhiều, nhiệt độ vào buổi sáng dao động từ 29,4°C đến 29,7°C và buổi chiều từ 30,1°C đến 30,6°C (Bảng 3.17). Tôm thẻ chân trắng phát triển tốt trong môi trường nhiệt độ khoảng 27 - 31°C [29,53,63]. Như vậy, với kết quả nhiệt độ đo được này thích hợp cho sự phát triển của tôm thẻ chân trắng. Tương tự, kết quả pH đo được trong thời gian thí nghiệm của các nghiệm thức dao động nhẹ, buổi sáng từ 7,55 đến 8,05 và buổi chiều từ 7,75 đến 8,15. Theo các công bố trước đây [5,29,101] cho rằng pH thích

hợp cho sinh trưởng của tôm từ 7,5 - 8,5 và với kết quả pH đo được đều nằm trong giới hạn cho phát triển của tôm thẻ chân trắng nuôi thử nghiệm.

Hàm lượng DO trong tất cả các nghiệm thức, ở tất cả các giai đoạn nuôi thử nghiệm tôm 5,5 mg/L. Hàm lượng DO thích hợp cho tôm thẻ chân trắng lớn hơn 5 mg/L [47]. Kết quả hàm lượng DO thu được cũng phù hợp cho môi trường nuôi tôm.

Tương tự, độ kiềm thích hợp cho tăng trưởng và phát triển của tôm thẻ chân trắng là từ 100-120 mgCaCO₃/L [16]. Với kết quả đo được độ kiềm trong thời gian thí nghiệm dao động từ 103,3 mgCaCO₃/L đến 105,8 mgCaCO₃/L phù hợp cho tôm phát triển tốt.

Trong tất cả các nghiệm thức, ở tất cả các giai đoạn nuôi thử nghiệm tôm, hàm lượng NO₂⁻ trung bình ở các nghiệm thức dao động từ 0,30 mg/L đến 0,55 mg/L (Bảng 3.16), nghiệm thức không bổ sung hỗn hợp dịch protein và HA có hàm lượng nitrite cao nhất 0,55 mg/L và thấp nhất ở nghiệm thức bổ sung hỗn hợp dịch protein và HA là 0,40 mg/L. Trong khi đó, hàm lượng NO₂⁻ < 1 mg/L nằm trong khoảng thích hợp cho sự phát triển cho tôm thẻ chân trắng [146].

Từ các kết quả thu được ở trên nhận thấy: các yếu tố hóa lý môi trường nước nuôi tôm đều nằm trong khoảng thích hợp cho sự phát triển của tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi với việc bổ sung hỗn hợp FPH và HA từ phế liệu cá Tra vào thức ăn không làm thay đổi chất lượng nước nuôi tôm.

Bảng 3.17. Các chỉ tiêu môi trường của các nghiệm thức nuôi tôm

Chỉ tiêu		Hỗn hợp FPH và HA bổ sung vào thức ăn tôm (%)				
		0	1	3	5	7
Nhiệt độ (°C)	Sáng	29,5	29,5	29,4	29,7	29,6
	Chiều	30,1	30,5	30,6	30,6	30,5
pH	Sáng	7,55	7,75	7,75	8,05	8,00
	Chiều	7,75	7,75	7,95	8,15	8,05
(DO) (mg/L)		5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Độ kiềm (mgCaCO ₃ /L)		103,3 ± 0,85	105,2 ± 0,92	105,8 ± 1,17	105,5 ± 1,09	107,5 ± 1,22
NO ₂ ⁻ (mg/L)		0,55 ± 0,09	0,42 ± 0,04	0,32 ± 0,06	0,30 ± 0,07	0,32 ± 0,09
NH ₄ ⁺ (mg/L)		0,23 ± 0,07	0,33 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,31 ± 0,04	0,29 ± 0,04

Như vậy, việc bổ sung hỗn hợp dịch protein và HA không ảnh hưởng đáng kể đến các tính chất hóa – lý của môi trường nước nuôi tôm.

3.8.2. Ảnh hưởng của hỗn hợp bổ sung đến các chỉ tiêu vi sinh vật môi trường nước nuôi tôm

3.8.2.1. Tổng số vi khuẩn

Kết quả lấy mẫu và phân tích tổng số vi khuẩn trong môi trường nuôi thử nghiệm tôm thẻ chân trắng của các nghiệm thức được trình bày ở bảng 3.18. Mật độ tổng vi khuẩn giữa các nghiệm thức trong quá trình nuôi thử nghiệm có sự biến động ở từng giai đoạn nuôi tôm và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Sau 8 ngày nuôi dưỡng tôm (tôm 20 ngày tuổi), mật độ tổng vi khuẩn khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) và nằm trong khoảng $4,0 - 4,8 \times 10^3$ CFU/mL (Bảng 3.17). Đến ngày nuôi tôm thứ 15 (tôm 27 ngày tuổi), mật độ tổng vi khuẩn ở nghiệm thức 1 lớn nhất khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với 4 nghiệm thức còn lại, mật độ tổng vi khuẩn ở nghiệm thức 5 nhỏ nhất khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với nghiệm thức 4 nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức 1,2,3. Kết quả phân tích tổng vi khuẩn sau 22 ngày nuôi (tôm 34 ngày tuổi), cho thấy nghiệm thức 1 có mật số vi khuẩn lớn nhất khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên, khi nuôi thử nghiệm tôm đến ngày thứ 36 (tôm 48 ngày tuổi) thì mật độ tổng vi khuẩn ở 5 nghiệm thức tăng lên rõ rệt trong khoảng $41,3 - 43,8 \times 10^3$ CFU/mL. Trong nước sạch, mật độ vi khuẩn tổng nhỏ hơn 10^3 CFU/mL, nếu mật độ tổng vi khuẩn vượt 10^7 CFU/mL sẽ có hại cho tôm nuôi [31]. Như vậy, mật độ vi khuẩn tổng của cả 5 nghiệm thức đều nằm trong khoảng thích hợp cho tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi phát triển. Khi tiếp tục nuôi thử nghiệm tôm đến ngày thứ 43 (tôm 55 ngày tuổi) thì mật độ tổng vi khuẩn ở 5 nghiệm thức giảm xuống rõ rệt trong khoảng $8,1 - 9,5 \times 10^3$ CFU/mL

Bảng 3.18. Mật độ tổng vi khuẩn trong môi trường nước ở các nghiệm thức (CFU/mL)

Giai đoạn (ngày)	Mật độ tổng vi khuẩn (CFU/mL)				
	0	1	3	5	7
20	$4,8^a \pm 0,34$	$4,5^b \pm 0,23$	$4,3^{bc} \pm 0,31$	$4,0^{bc} \pm 0,28$	$4,0^{bc} \pm 0,27$
27	$12,9^a \pm 1,54$	$7,6^b \pm 0,74$	$7,2^b \pm 0,87$	$6,4^b \pm 0,63$	$6,6^b \pm 0,88$
34	$14,4^a \pm 1,81$	$9,6^b \pm 1,31$	$8,5^b \pm 1,11$	$7,6^b \pm 1,08$	$7,8^b \pm 1,12$
41	$25,5^a \pm 2,43$	$23,7^{ab} \pm 2,28$	$21,4^{abc} \pm 2,03$	$20,7^{abc} \pm 2,32$	$20,5^{abc} \pm 2,38$
48	$42,0^a \pm 3,95$	$43,8^a \pm 3,34$	$42,3^a \pm 3,55$	$41,1^a \pm 3,26$	$41,3^a \pm 2,98$

55	9,5 ^b ± 0,94	8,9 ^b ± 0,79	8,3 ^b ± 0,86	8,0 ^b ± 0,93	8,1 ^b ± 0,98
----	-------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------

Ghi chú: các giá trị ở hàng ngang có ký hiệu chữ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

3.8.2.2. Tổng số vi khuẩn vibrio

Kết quả lấy mẫu và phân tích tổng số vi khuẩn vibrio trong môi trường nuôi thử nghiệm tôm thẻ chân trắng của các nghiệm thức được trình bày ở bảng 3.19. Mật độ tổng vi khuẩn vibrio giữa các nghiệm thức trong quá trình nuôi thử nghiệm có sự biến động và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các giai đoạn nuôi tôm

Sau khi nuôi tôm thử nghiệm 8 ngày (tôm 20 ngày tuổi), nghiệm thức 1 có mật độ Vibrio cao nhất $0,14 \times 10^3$ CFU/mL và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức 3, 4, 5, nhưng không khác biệt với nghiệm thức 2. Sau 15 ngày nuôi (tôm 27 ngày tuổi), mật độ vi khuẩn vibrio giữa các nghiệm thức 1, 2, 3 khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), cao nhất ở nghiệm thức 1 với mật độ $0,58 \times 10^3$ CFU/mL, nhưng không khác biệt giữa nghiệm thức 4 và 5. Khi nuôi thử nghiệm tôm đến ngày thứ 36 (PL-48) thì mật độ tổng vi khuẩn vibrio ở 5 nghiệm thức tăng lên rõ rệt trong khoảng $2,57 - 3,81 \times 10^3$ CFU/mL và chiếm tỷ lệ 6,3 – 9,1 % so với tổng số vi khuẩn trong môi trường nuôi tôm.

Bảng 3.19. Mật độ tổng vi khuẩn vibrio trong môi trường nước các nghiệm thức (CFU/mL)
Đơn vị tính: 10^3 CFU/mL

Giai đoạn tôm (ngày)	Mật độ vi khuẩn vibrio (CFU/mL)				
	0	1	3	5	7
20	0,14 ^a ± 0,04	0,12 ^b ± 0,04	0,08 ^{ab} ± 0,01	0,06 ^c ± 0,01	0,06 ^c ± 0,01
27	0,58 ^a ± 0,06	0,46 ^b ± 0,05	0,35 ^c ± 0,04	0,33 ^c ± 0,03	0,32 ^c ± 0,03
34	0,72 ^a ± 0,08	0,57 ^b ± 0,06	0,43 ^c ± 0,06	0,39 ^c ± 0,05	0,39 ^c ± 0,05
41	2,74 ^a ± 0,28	2,17 ^b ± 0,19	1,86 ^{bc} ± 0,15	1,62 ^{bcd} ± 0,15	1,76 ^{bcd} ± 0,21
48	3,81 ^a ± 0,42	2,83 ^b ± 0,31	2,78 ^b ± 0,29	2,57 ^b ± 0,31	2,64 ^b ± 0,19
55	0,12 ^a ± 0,02	0,12 ^a ± 0,03	0,10 ^a ± 0,01	0,09 ^b ± 0,01	0,09 ^c ± 0,01

Ghi chú: các giá trị ở hàng ngang có ký hiệu chữ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

Kết quả phân tích ở lần cuối thí nghiệm (tôm 55 ngày tuổi) cho thấy nghiệm thức 4 và nghiệm thức 5 có mật độ vibrio thấp nhất là $0,09 \times 10^3$ CFU/mL, khác biệt có ý nghĩa thống kê

($p < 0,05$) so với nghiệm thức 1, 2 (Bảng 3.19). Mật độ vi khuẩn *Vibrio* nhỏ hơn $6,5 \times 10^3$ CFU/ml trong môi trường nuôi chưa gây ảnh hưởng đến tôm nuôi [12].

Với các kết quả thu được như trên có thể thấy, hỗn hợp dịch protein thủy phân và hydroxyapatite từ phế liệu cá Tra bổ sung vào thức ăn tôm thẻ chân trắng 20 – 55 ngày tuổi không ảnh hưởng đáng kể đến mật vi sinh vật gây bệnh trong môi trường nước nuôi tôm, nước nuôi tôm không bị ô nhiễm, tôm không bị dịch bệnh trong quá trình nuôi thử nghiệm.

3.8.3. Ảnh hưởng của hỗn hợp bổ sung đến tốc độ tăng trưởng của tôm

Để đánh giá tốc độ tăng trưởng tôm trong thời gian nuôi thử nghiệm, tiến hành thu ngẫu nhiên 20 mẫu tôm (20 cá thể tôm), đo chiều dài tổng ở các giai đoạn 12 ngày tuổi bằng kính hiển vi có trục vi thị kính. Đối với tôm các giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi đo chiều dài tổng và khối lượng thân tôm bằng thước đo có thang đo 0,1mm và cân tiểu li với độ chính xác 1 mg. Kết quả thí nghiệm là kết quả giá trị trung bình của 20 mẫu tôm đánh giá.

3.8.3.1. Sự tăng trưởng về khối lượng của tôm thẻ chân trắng (g)

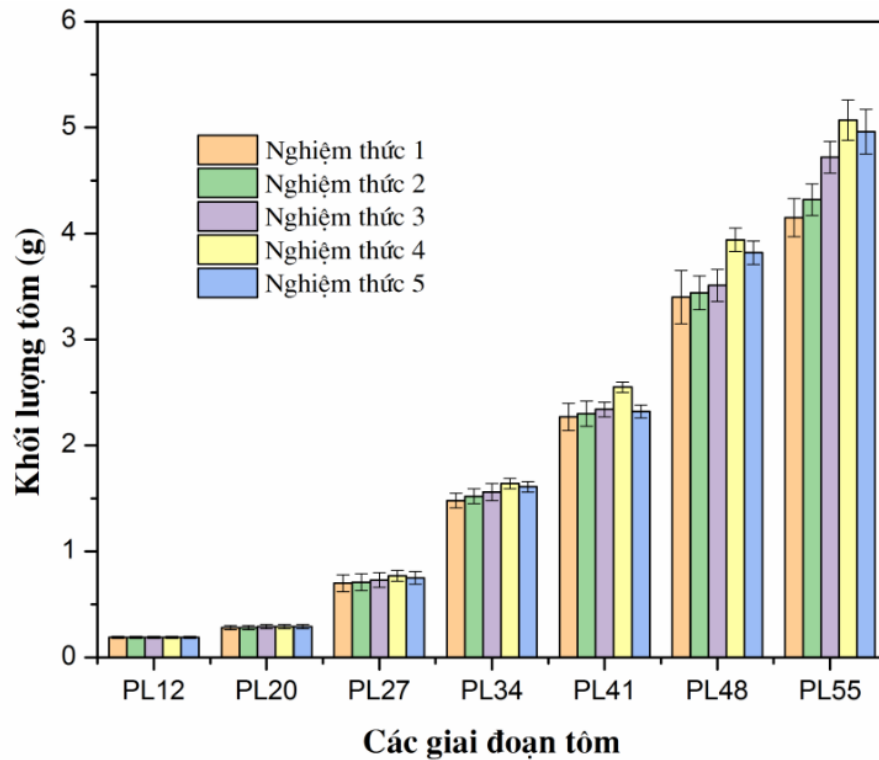
Kết quả tốc độ tăng trưởng của tôm theo khối lượng tôm tăng lên của các tỷ lệ bổ sung hỗn hợp FPH và HA vào thức ăn tôm được trình bày ở Bảng 3.20.

Sau 2 tuần nuôi thử nghiệm, ở giai đoạn tôm thẻ chân trắng từ 12 – 27 ngày tuổi, khối lượng tôm tăng lên hàng tuần của 5 nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), khối lượng tăng lên từ 0,24 g/tuần đến 0,44 g/tuần. Ở các giai đoạn tôm từ 34 – 55 ngày tuổi sự tăng trưởng khối lượng tôm nhanh hơn và tăng đều ở 5 nghiệm thức nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), khối lượng tăng lên từ 0,82 g/tuần đến 1,20 g/tuần tương ứng. Khối lượng tôm tăng lên hàng tuần cũng phù hợp với các công bố trước đây [29,34,101,146].

Tuy nhiên một điều thú vị là, khối lượng tôm tăng lên ở nghiệm thức 4 (5% hỗn hợp dịch protein thủy phân và HA) nhanh hơn, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức 1, 2, 3 (đồ thị hình 3.28).

Nhìn chung, dịch protein thủy phân với mạch ngắn và khối lượng phân tử nhỏ, axit amin cao, sẽ thúc đẩy sự hấp thụ dinh dưỡng tốt [73]. Nghiên cứu trước đây cho thấy tôm *L. vannamei* có hệ suất tiêu hóa, hấp thụ axit amin thiết yếu và năng lượng cao hơn từ sản phẩm dịch protein thủy phân của phụ phẩm gia cầm, thúc đẩy tôm tăng trưởng của tôm [147]. Tôm *L. vannamei* cũng có hệ suất tiêu hóa, hấp thụ axit amin thiết yếu và năng lượng cao hơn từ sản phẩm dịch protein thủy phân của phế liệu cá

Tra. Hiệu suất tiêu hóa, hấp thụ axit amin thiết yếu cao hơn từ dịch protein thủy phân có thể là nhân tố cần thiết để nâng cao sự tăng khối lượng của tôm *L. vannamei* [147]. Điều này cũng khuyến cáo cho việc thử nghiệm bổ sung hỗn hợp FPH và HA để cân bằng axit amin hoặc các thành phần khác trong thức ăn, làm cho tôm *L. vannamei* phát triển nhanh hơn [91].



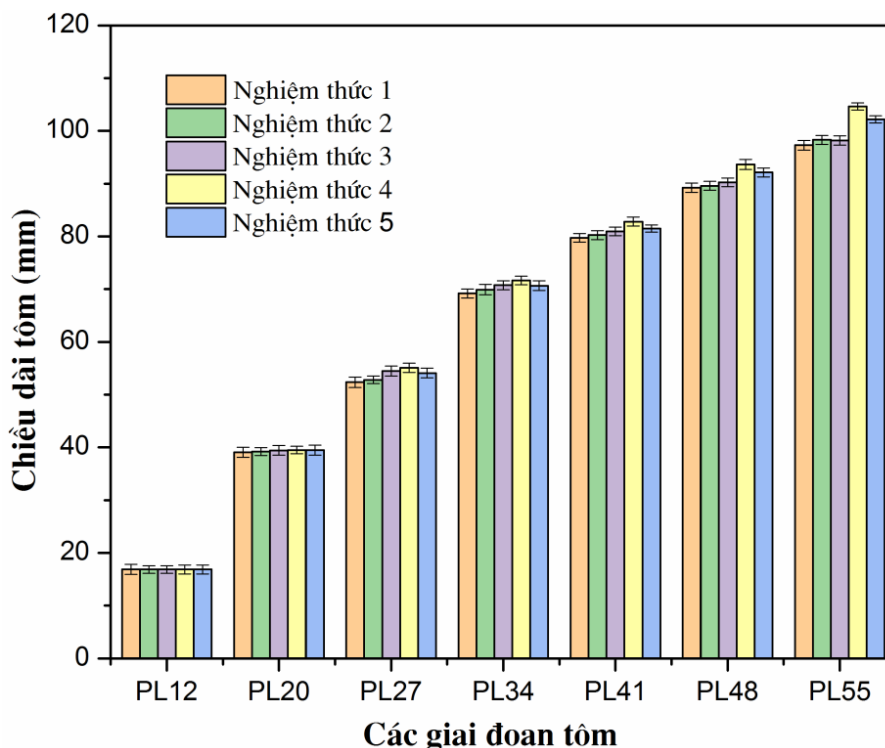
Hình 3.28. Đồ thị tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng theo khối lượng tôm của 5 nghiệm thức nuôi tôm

3.8.3.2. Sự tăng trưởng về chiều dài tôm thẻ chân trắng (mm)

Ở một yếu tố tăng trưởng khác là chiều dài của tôm. Kết quả chiều dài tôm của các tỷ lệ bổ sung hỗn hợp FPH và HA vào thức ăn tôm được trình bày ở Bảng 3.20.

Trong giai đoạn 02 tuần nuôi thử nghiệm tôm thẻ chân trắng từ 12 – 27 ngày tuổi, chiều dài tổng của tôm ở 5 nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), chiều dài là 16,85 mm; 39,50 mm và 55,10 mm tương ứng, điều này cũng phù hợp với sự tăng trưởng về khối lượng tôm. Ở các giai đoạn này, sự tăng trưởng chiều dài tương đối đồng đều ở 5 nghiệm thức, chiều dài tổng của tôm là từ 16,85 mm đến 39,10; 39,20; 39,45; 39,50 mm và 52,35; 52,80; 54,50; 55,10 mm tương ứng. Xu hướng tăng trưởng chiều dài của tôm này cũng đã được công bố [19]. Tiếp đó chiều dài tổng của tôm tăng trưởng nhanh hơn ở giai đoạn tôm 34 ngày tuổi, tuy nhiên chiều dài tổng của tôm ở nghiệm thức này khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$),

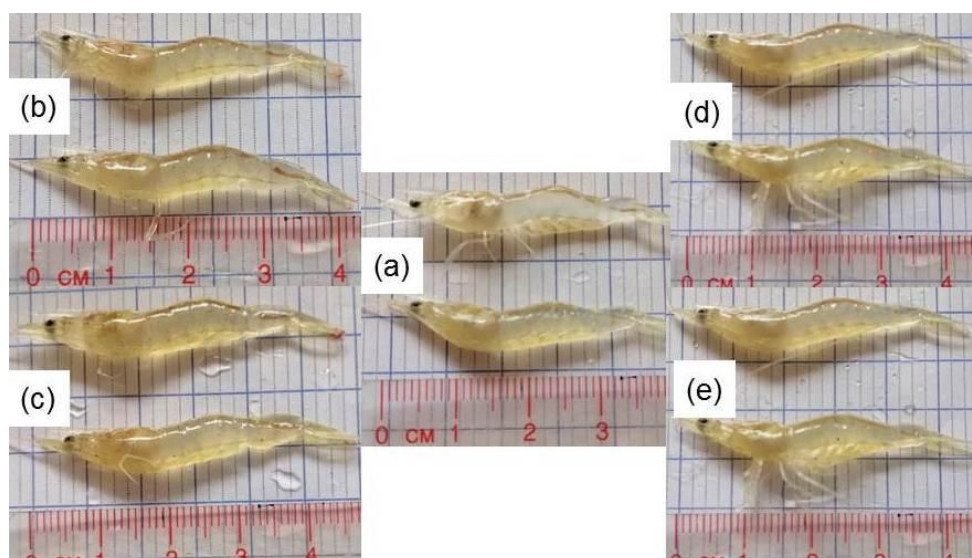
chiều dài tổng của tôm là 69,20; 69,90; 70,75, 71,65 và 71,65 mm tương ứng. Sau đó chiều dài tổng của tôm tăng trưởng chậm lại ở giai đoạn 41 – 55 ngày tuổi ở các nghiệm thức 1, 2, 3 nhưng vẫn tăng trưởng nhanh ở nghiệm thức 4, chiều dài tổng của tôm là 79,75; 80,25; 80,95; 82,80; 81,50 mm và 97,28; 98,30; 98,22; 104,65; 102,18 mm tương ứng (đồ thị hình 3.29).



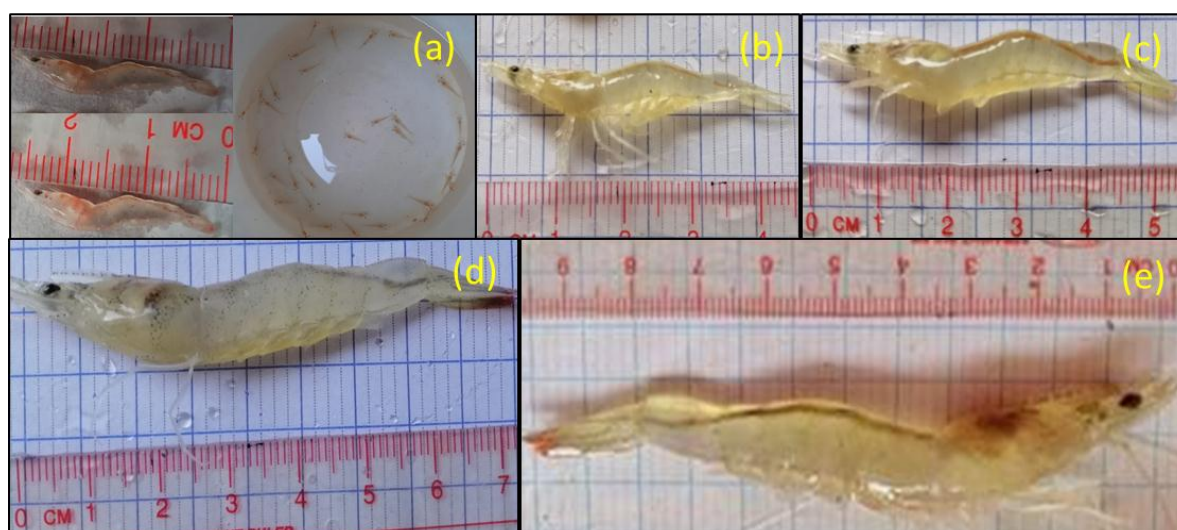
Hình 3.29. Đồ thị tăng trưởng tôm thẻ chân trắng theo chiều dài tôm 5 nghiệm thức.

Giai đoạn tôm từ 12 – 34 ngày tuổi, tổng chiều dài tôm lớn nhất ở nghiệm thức 4 và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với với các nghiệm thức 1, 2, 3, 5. Nhưng đến giai đoạn tôm từ 41 – 55 ngày tuổi, tổng chiều dài tôm lớn nhất cũng là nghiệm thức 4, chiều dài là 82,80 mm và 104,65 mm tương ứng và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với với các nghiệm thức 1, 2, 3 nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với với các nghiệm thức 5. Sự khác biệt về chiều dài tổng của tôm ở nghiệm thức 4 cũng phù hợp với sự khác biệt về khối lượng tôm tăng lên hàng tuần của nghiệm thứ 4 so với các nghiệm thứ 1, 2, 3, 5.

Kết quả của nghiên cứu này tương tự với các nghiên cứu đã được công bố trước đây. Chiều dài trung bình của tôm 15 ngày tuổi ương theo quy trình thay nước được công bố bởi [17] là 11,1 mm và [5] là 12 mm.



Hình 3.30. Tôm thẻ chân trắng 27 ngày tuổi của 5 nghiệm thức (a) NT1, (b) NT2, (c) NT3, (d) NT4 và (e) NT5.



Hình 3.31. Tôm thẻ chân trắng của nghiệm thức 4 ở các giai đoạn (a) 20 ngày tuổi, (b) 27 ngày tuổi, (c) 34 ngày tuổi, (d) 41 ngày tuổi và (e) 55 ngày tuổi.

Bảng 3.20. Khối lượng và chiều dài tôm ở các giai đoạn nuôi thử nghiệm

Giai đoạn (ngày)	Hỗn hợp FPH và HA bổ sung vào thức ăn tôm (%)									
	Khối lượng thân tôm (g)					Chiều dài thân tôm (mm)				
	0	1	3	5	7	0	1	3	5	7
12		0,19 ± 0,001						16,85 ± 0,60		
20	0,28 ^a ± 0,02	0,28 ^a ± 0,02	0,29 ^a ± 0,02	0,29 ^a ± 0,02	0,29 ^a ± 0,02	39,10 ^a ± 0,60	39,20 ^a ± 0,43	39,45 ^a ± 0,41	39,50 ^a ± 0,42	39,50 ^a ± 0,40
27	0,70 ^b ± 0,08	0,71 ^b ± 0,07	0,73 ^b ± 0,07	0,77 ^b ± 0,05	0,75 ^b ± 0,06	52,35 ^b ± 0,57	52,80 ^b ± 0,71	54,50 ^{bc} ± 0,95	55,10 ^{bc} ± 0,90	54,10 ^{abc} ± 0,92
34	1,48 ^a ± 0,07	1,52 ^{ab} ± 0,07	1,56 ^{ab} ± 0,08	1,64 ^b ± 0,05	1,61 ^b ± 0,05	69,20 ^a ± 0,85	69,90 ^a ± 0,38	70,75 ^{bc} ± 0,53	71,65 ^{bc} ± 0,53	70,65 ^{abc} ± 0,52
41	2,27 ^a ± 0,13	2,30 ^b ± 0,12	2,34 ^b ± 0,07	2,55 ^b ± 0,05	2,32 ^b ± 0,06	79,75 ^a ± 0,81	80,25 ^{ab} ± 0,68	80,95 ^{abc} ± 0,41	82,80 ^{abcd} ± 0,57	81,50 ^e ± 0,51
48	3,40 ^b ± 0,25	3,44 ^b ± 0,16	3,51 ^b ± 0,15	3,94 ^a ± 0,11	3,82 ^a ± 0,11	89,25 ^a ± 0,87	89,60 ^a ± 0,86	90,25 ^a ± 0,84	93,65 ^b ± 0,55	92,15 ^c ± 0,62
55	4,15 ^a ± 0,18	4,32 ^a ± 0,15	4,72 ^b ± 0,15	5,07 ^{bc} ± 0,19	4,96 ^c ± 0,21	97,28 ^a ± 0,89	98,30 ^a ± 0,86	98,22 ^a ± 0,88	104,65 ^b ± 0,65	102,18 ^c ± 0,68

Ghi chú: các giá trị ở hàng ngang có ký hiệu khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.8.3.3. Ảnh hưởng của hỗn hợp FPH và HA bổ sung vào thức ăn tôm đến tỷ lệ sống và năng suất của tôm 55 ngày tuổi

Kết quả tỷ lệ sống và năng suất của tôm sau khi kết thúc thí nghiệm 55 ngày nuôi tôm được trình bày ở Bảng 3.21.

Bảng 3.21. Tỷ lệ sống và năng suất của tôm 55 ngày tuổi ở các nghiệm thức

Chỉ tiêu	Hỗn hợp FPH và HA bổ sung vào thức ăn tôm (%)				
	0	1	3	5	7
Tỷ lệ sống (%)	98,30 ^a ± 0,96	98,40 ^a ± 0,79	97,50 ^a ± 0,60	97,30 ^a ± 0,72	96,50 ^a ± 0,96
Năng suất (kg/m²)	2,45 ^a ± 0,06	2,70 ^a ± 0,11	2,95 ^a ± 0,10	3,55 ^b ± 0,08	3,50 ^b ± 0,08

Ghi chú: các giá trị ở hàng ngang có ký hiệu chữ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Thực hiện xử lý thống kê kết quả thu được cho thấy tỷ lệ sống của tôm giai đoạn 55 ngày tuổi ở nghiệm thức 2 cao nhất (98,36%) kế đến là nghiệm thức 1 (98,33%), nghiệm thức 3,4,5 có tỷ lệ sống gần bằng nhau ~ 97,00%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Kết quả tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng cũng được công bố, tỷ lệ sống của tôm 34 – 35 ngày tuổi là 98,1 ± 2,9 % với mật độ thả nuôi 1760 con/m³ [34], tỷ lệ sống của tôm 81 ngày tuổi là 86,25 % với mật độ thả nuôi 37,5 con/m³ [29]. Từ các kết quả trên thấy rằng, tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng 55 ngày tuổi ở các nghiệm thức thí nghiệm đều cao hơn kết quả nghiên cứu [29] nhưng thấp hơn so với kết quả của [34]. Điều này có thể luận giải do thời gian thí nghiệm khác nhau, ngoài ra do mật độ thả nuôi giống post khác nhau.

Năng suất của tôm 55 ngày tuổi cao nhất là ở nghiệm thức 4 (3,52 kg/m²), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức 1,2,3, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với nghiệm thức 5 (3,47 kg/m²). Năng suất của tôm 55 ngày tuổi thấp nhất ở nghiệm thức 1 (2,45 kg/m²). Kết quả trên cho thấy, các nghiệm thức bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy phân và HA 5% trong quá trình nuôi

thử nghiệm tôm thẻ chân trắng cho năng suất và tỷ lệ sống cao hơn so với nghiệm thức không bổ sung. Điều này cho thấy, khi bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy phân và HA với các tỷ lệ khác nhau ở các thời điểm khác nhau sẽ ảnh hưởng đến năng suất của tôm. Có thể là do hỗn hợp dịch protein thủy phân và HA bổ sung trong thức ăn phù hợp cho sự phát triển của tôm và trong thời gian bổ sung ngắn ít làm cho môi trường nuôi dẫn đến năng suất của các nghiệm thức này cao hơn so với nghiệm thức không bổ sung hỗn hợp.

Như vậy, hỗn hợp dịch protein thủy phân và hydroxyapatite thu nhận từ phế liệu cá Tra khi bổ sung với lượng 5% vào thức ăn cho tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi thì các chỉ tiêu hóa-lý của môi trường nuôi không bị ảnh hưởng, tổng số vi khuẩn hiếu khí và vi khuẩn vibrio trong môi trường nước ở mức kiểm soát, tôm không có dấu hiệu bị dịch bệnh. Tôm tăng trưởng khối lượng thân tôm 0,97g và chiều dài 7,37 mm so với tôm nuôi không bổ sung.

3.8.3.4. Đánh giá chất lượng tôm nuôi 55 ngày tuổi

Đánh giá chất lượng vỏ tôm thẻ 55 ngày tuổi là rất quan trọng sau khi thu hoạch tôm, nhằm phân hạng chất lượng nguyên liệu tôm, đồng thời cũng nhằm lựa chọn dụng cụ chứa, phương pháp vận chuyển thích hợp, không làm dập nát, ảnh hưởng đến chất lượng tôm.

Sau khi gây sốc tôm 55 ngày tuổi bằng formol sau 30 phút cho 100 con tôm 55 ngày tuổi thu mẫu ngẫu nhiên tất cả các nghiệm thức đều có tỷ lệ tôm sống đạt 100%, tôm khỏe mạnh, có chất lượng tốt. kết quả này phù hợp với tiêu chuẩn quốc gia về chất lượng tôm [22]. Ngoài ra, kết quả đánh giá độ rắn và cấu trúc hình dạng bề mặt vỏ tôm 55 ngày tuổi được xác định bằng nhiễu xạ tia X (XRD) và bằng kính hiển vi điện tử (SEM). Kết quả thu được như sau:

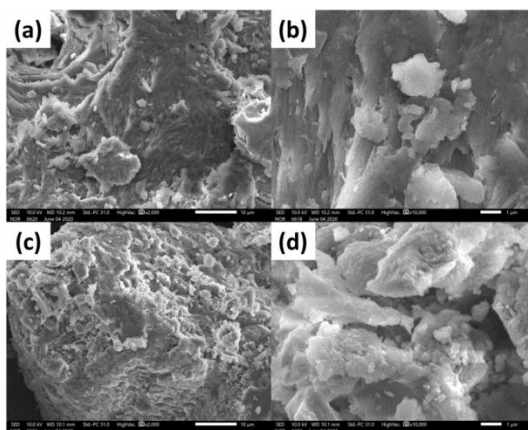
a. Độ rắn cấu trúc vỏ tôm

Ảnh hưởng của chất bổ sung được đánh giá bởi hình thái và cấu trúc bề mặt khác nhau của vỏ tôm có bổ sung và không bổ sung hỗn hợp dịch FPH và HA. Hình 3.32 cho thấy ảnh SEM của vỏ tôm vẫn còn tồn tại thịt tôm ở cả nghiệm thức không bổ sung (Nghiệm thức 1) và nghiệm thức có bổ sung (Nghiệm thức 4). Hình thái bề mặt của cả 2 mẫu vỏ tôm ở các độ phóng đại khác nhau vẫn còn sự hiện diện của các lớp polyme vô định hình (chitin và protein) và các hạt khoáng. Tuy nhiên, có nhiều hạt khoáng hơn được nhìn thấy rõ ràng trong mẫu vỏ tôm ở nghiệm thức 4 (Hình. 3.32c và

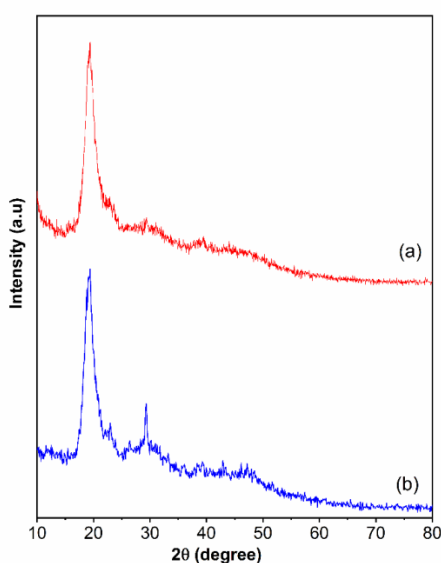
3.32d). Hiện tượng này có thể là do có sự góp mặt của các hạt khoáng từ nguồn HA được bổ sung vào thức ăn tôm ở nghiệm thức 4 mà được xem như là nguồn canxi để hình thành khoáng trong vỏ tôm. Sự khác nhau về cấu trúc vỏ tôm cũng được nhìn thấy qua đánh giá bằng nhiễu xạ tia X, XRD.

b. Cấu trúc bề mặt, hình dạng và kích thước vỏ tôm

Phổ XRD của vỏ tôm thu nhận từ nghiệm thức 1 và nghiệm thức 4 được biểu diễn ở hình 3.33. Cả 2 mẫu cho thấy có sự xuất hiện của một peak cao ở góc 2θ 20° , peak này là do có sự hiện diện của mạng tinh thể chitin trong vỏ tôm. Bên cạnh đó, có một peak đặc trưng xuất hiện ở góc $2\theta \approx 30^\circ$ trong vỏ tôm ở nghiệm thức 4, điều này là do có sự hiện diện của một hàm lượng lớn CaCO_3 trong vỏ tôm [52]. Điều này cũng được tìm thấy phù hợp với kết quả SEM.

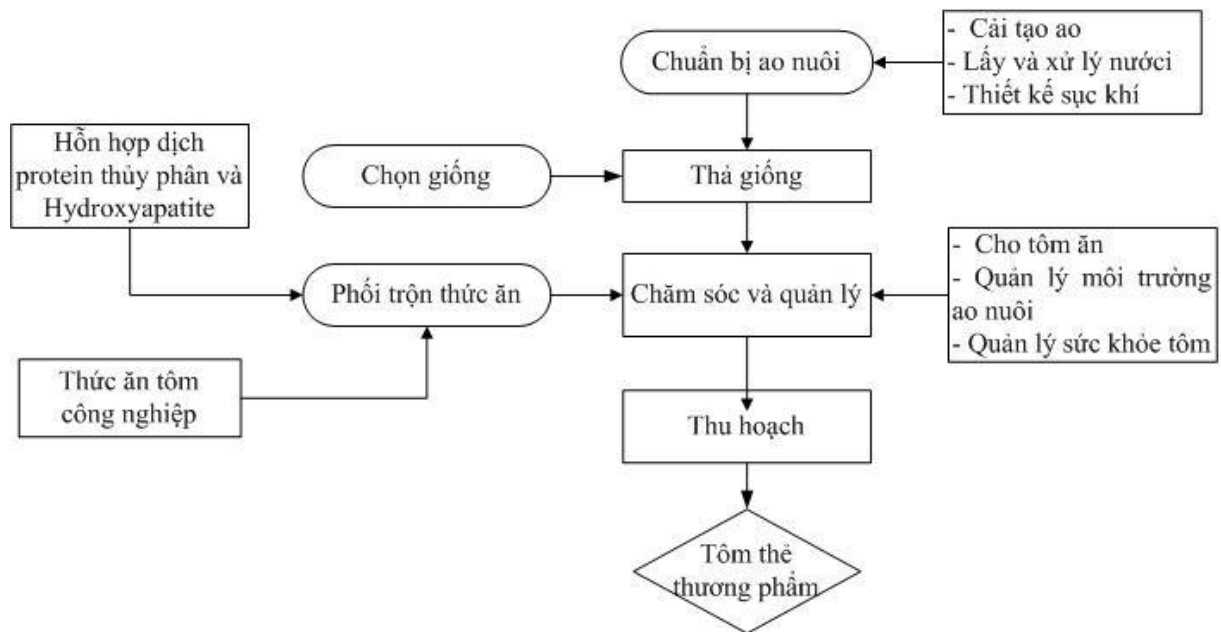


Hình 3.32. Ảnh SEM với độ phóng đại khác nhau của vỏ tôm thẻ chân trắng post 55 (a,b) nghiệm thức 1, (c,d) nghiệm thức 4.



Hình 3.33. Phổ XRD của vỏ tôm 55 (a) nghiệm thức 1, (b) nghiệm thức 4.

3.9. Đề xuất qui trình nuôi tôm thẻ chân trắng 20 – 55 ngày tuổi có bổ sung hỗn hợp dịch FPH và HA từ phế liệu cá Tra.



Hình 3.34. Qui trình nuôi tôm thẻ chân trắng 20 – 55 ngày tuổi có bổ sung hỗn hợp dịch FPH và HA từ phế liệu cá Tra

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu của Luận án, xin rút ra một số kết luận như sau:

1. Xây dựng được qui trình thu dịch protein thủy phân từ phế liệu cá Tra bằng enzyme Alcalase và Lipase. Giai đoạn 1, thủy phân bằng enzyme alcalase với: tỷ lệ nước/nguyên liệu 1:1, nồng độ muối 2%, hàm lượng Alcalase 0,4% so với khối lượng nguyên liệu, nhiệt độ 60°C, thời gian 9 giờ. Giai đoạn 2, thủy phân bằng enzyme lipase với: tỷ lệ Lipase/nguyên liệu 0,03%, nhiệt độ 60°C, thời gian 2 giờ. Dịch protein thủy phân có DH 35%, MW < 1000 Da, đạm tổng 33,2%, lipid tổng 1,93%, đạm axit amin 420,16 mg/g protein.
2. Xây dựng thành công qui trình thu nhận HA từ xương cá Tra bằng phương pháp xử lý nhiệt ở nhiệt độ 700°C, tốc độ gia nhiệt 3°C/phút, thời gian 2 giờ. Hydroxyapatite có kích thước 50 – 70 nm, tỷ lệ Ca/P 1,83, diện tích bề mặt 2,87 m²/g, thể tích lỗ xốp 0,02 m³/g, kích thước lỗ xốp trung bình 1,2 nm) và hàm lượng kim loại nặng (Pb, Hg, Cd) không phát hiện.
3. Bước đầu bổ sung 5 % hỗn hợp dịch protein thủy phân và hydroxyapatite (bổ sung HA với nồng độ 50 ppm vào dịch protein thủy phân) vào thức ăn viên đã làm tăng trưởng khối lượng thân tôm 0,97g và chiều dài 7,37 mm cho tôm thẻ chân trắng giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi so với tôm nuôi không bổ sung. Hỗn hợp dịch bổ sung không làm ảnh hưởng đến môi trường nước nuôi tôm.

Kiến nghị

1. Cần có các nghiên cứu, đánh giá, điều chỉnh phù hợp các thông số quá trình và tính toán hiệu quả kinh tế trước khi triển khai ở quy mô lớn.
2. Cần đánh giá về vai trò của các thông số công nghệ, các tính chất kỹ thuật của dịch protein thủy phân và hydroxyapatite đến sự sinh trưởng, phát triển của tôm.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

Danh mục các báo cáo Hội nghị, Hội thảo:

1. **Pham Viet Nam**, Nguyen Van Hoa, Trang Sĩ Trung. Biological hydroxyapatite nanomaterial extracted from fish bones. *Proceedings of First International Conference on Material, Machines and Methods for Sustainable Development*, Danang 5/2018.
2. **Pham Việt Nam**, Nguyễn Văn Hòa, Trang Sĩ Trung. Thu nhận hydroxyapatite có kích thước nano từ xương cá sử dụng phương pháp enzyme và xử lý nhiệt. *Kỷ yếu Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc*, Hà Nội 10/2018.
3. **Pham Viet Nam**, Nguyen Van Hoa, Tran Thi Lan Anh, Trang Si Trung, Recovery of bioactive components from catfish (*Pangasius Hypophthalmus*) by-products towards zero waste processing, *Proceedings of Vietnam – Japan Science and Technology Symposium*, Hanoi 2019.

Danh mục các bài báo khoa học trong nước, quốc tế:

1. **Pham Viet Nam**, Nguyen Van Hoa, Tran Thi Lan Anh, Trang Si Trung (2020). Towards zero-waste recovery of bioactive compounds from Tra fish (*pangasius hypophthalmus*) by-products using an enzymatic method. *Waste and Biomass Valorization*, 11 (8) 4195-4206.
2. **Pham Viet Nam**, Nguyen Van Hoa, Trang Si Trung (2019). Properties of hydroxyapatites prepared from different fish bones: a comparative study. *Ceramics International*, 45 (16) 20141-20147.
3. Nguyễn Lê Bá Quảng, **Pham Việt Nam**, Phạm Anh Đạt, Nguyễn Văn Hòa (2018). Thu nhận và xác định tính chất của hydroxyapatite kích thước nano từ xương cá: (1) phương pháp xử lý nhiệt. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Số 3, tr. 53 – 60.
4. **Pham Viet Nam**, Tran Vy Hich, Nguyen Van Hoa, Dinh Van Khuong, Trang Si Trung (10/2020). Improved growth of juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) supplemented by Tra-fish protein hydrolysate and hydroxyapatite mixture. *Aquaculture Research* (Under Review).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Trần Kiều Anh, Nguyễn Hà Trung, Nguyễn Khánh Hoàng Việt, Nguyễn Thị Hồng Loan, Phạm Kiên Cường (2017), “Nghiên cứu các điều kiện thủy phân phụ phẩm cá hồi (*Salmo salar*) nhằm thu nhận peptit mạch ngắn có hoạt tính chống ô xi hóa”, *Tạp chí Khoa học Tự nhiên và Công nghệ - ĐHQGHN*, Tập 33, Số 1S, tr. 7-13.
2. Trần Thị Lan Anh (2017), “Nghiên cứu sản xuất dịch đậm thủy phân cô đặc từ phụ phẩm cá Tra phi lê bằng enzyme alcalase”, Luận án tốt nghiệp Thạc sỹ, Trường Đại học Nha Trang.
3. Lê Thị Duyên, Đỗ Thị Hải, Nguyễn Viết Hùng, Nguyễn Thu Phương, Cao Thị Hồng, Đinh Thị Mai Thanh (2016), “Nghiên cứu khả năng xử lý flo trong nước của nanocomposithydroxyapatite/chitosan tổng hợp bằng phương pháp kết tủa hóa học”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ ISSN: 0866-708X*, tập 53, số 6A, tr.58.
4. Nguyễn Thị Hạnh (2015), “Nghiên cứu tổng hợp hydroxyapatite pha tạp bạc bằng phương pháp phản ứng pha rắn”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 53 (4C), tr.220 - 227.
5. Trần Ngọc Hải, Châu Tài Tảo và Nguyễn Thanh Phương (2017), “*Giáo trình Kỹ thuật sản xuất giống và nuôi giáp xác*”, Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, 211 Trang.
6. Nguyễn Thị Hiền (2003), “*Thông tin Khoa Học Công Nghệ - Kinh Tế Thủy Sản*”, NXB Nông Nghiệp.
7. Nguyễn Văn Hòa, Nguyễn Công Minh, Phạm Anh Đạt (2018), “Thu nhận và xác định tính chất của hydroxyapatite kích thước nano từ xương cá: sử dụng enzyme cho quá trình tiền xử lý”, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Số 2/2018, tr.39 – 45.
8. Nguyễn Văn Hòa, Trần Thị Hoàng Quyên, Trần Quang Ngọc (2014), “Hydroxyaptite từ phế phẩm rắn của cá: vấn đề Trao đổi”, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Số 4, tr. 209 – 214.
9. Nguyễn Thị Mỹ Hương (2013), “Thu hồi protein và lipit từ đầu cá ngừ bằng enzyme protease công nghiệp”, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản* - Trường Đại học Nha Trang, tập 11, số 8, tr. 1150-1158.
10. Đào Quốc Hương, Phạm Thị Sao (2010), “Nghiên cứu chế tạo gốm xốp hydroxyapatite từ vỏ trứng bằng phản ứng thủy nhiệt”, *Tạp chí Hóa học*, 48 (4A), tr. 455 – 459.

11. Nguyễn Văn Hưởng (2011), “*Khảo sát quá trình tách và một số đặc trưng của canxi hydroxyapatite từ xương động vật*”, Luận văn ThS Chuyên ngành: Hóa vô cơ, Khoa Hóa học, Trường Đại học Quốc gia Hà Nội.
12. Phạm Thị Tuyết Ngân, Trần Thị Kiều Trang và Trương Quốc Phú (2008), “Biến động mật độ vi khuẩn trong ao nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*) ghép với cá rô phi đỏ ở Sóc Trăng”. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, số chuyên đề Thủy sản quyển 1, tr 187-194.
13. Trần Thị Hồng Nghi, Lê Thanh Hùng và Trương Quang Bình (2011), “Nghiên cứu ứng dụng enzyme protease từ vi khuẩn (*Bacillus subtilis*) để thủy phân phụ phẩm cá Tra”, *Khoa Thủy sản - Trường Đại học Nông Lâm TP HCM*, tr. 448–457.
14. Nguyễn Lê Bá Quảng, Phạm Viết Nam, Phạm Anh Đạt, Nguyễn Văn Hòa (2018), “Thu nhận và xác định tính chất của hydroxyapatite kích thước nano từ xương cá: (1) phương pháp xử lý nhiệt”, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Số 3, 2018, tr. 53 – 60.
15. Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam (Vasep), "Bản tin tuần Thương mại Thủy sản số 1 - 2020"
16. Châu Tài Tảo (2015), “Ảnh hưởng của độ kiềm lên tăng trưởng, tỷ lệ sống và chất lượng của ấu trùng và hậu ấu trùng tôm sú (*Penaeus monodon*)”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, số 23, tr. 97-102.
17. Châu Tài Tảo, Huỳnh Hàn Châu và Nguyễn Thanh Phương (2006), “Ảnh hưởng của chế độ thay nước lên sinh trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng tôm sú (*Penaeus monodon*)”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số đặc biệt chuyên đề Thủy sản, tr 268–274.
18. Châu Tài Tảo, Trần Ngọc Hải và Nguyễn Thanh Phương (2016), “Ảnh hưởng của bổ sung chất khoáng lên tăng trưởng, tỷ lệ sống, chất lượng của ấu trùng và hậu ấu trùng tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*)”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học, 47, tr. 38-44.
19. Châu Tài Tảo, Lý Văn Khánh và Trần Ngọc Hải (2018), “Nghiên cứu ương ấu trùng tôm sú (*penaeus monodon*) bằng công nghệ biofloc từ nguồn carbohydrate ri đường bổ sung ở các giai đoạn khác nhau”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Tập 54, số chuyên đề Thủy sản, tr 27–34.

20. Đỗ Thị Thanh Thủy, Nguyễn Anh Tuấn (2013), “Nghiên cứu chế độ thủy phân thu dịch đậm hòa tan giàu a xít amin từ protein cá tạp”, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản* Trường Đại học Nha Trang, Số 4, tr. 138-143.
21. Trang Sy Trung, Nguyễn Thị Mỹ hương, Phạm Thị Đan Phượng, Nguyễn Văn Hòa and Nguyễn Thị Hằng Phương (2016), "*Thu nhận protein, chất màu từ phế liệu thủy sản và ứng dụng*" NXB Nông Nghiệp, 177 Trang.
22. TCVN-10325 : 2014, "Thức ăn hỗn hợp cho tôm thẻ chân trắng," Bộ Khoa học và Công nghệ, Xuất bản lần 1, Hà Nội, 2014.
23. TCVN - 8398 : 2012 (2012), "Tôm biển - Tôm sú giống - Yêu cầu kỹ thuật" Bộ Khoa học và Công nghệ, Hà Nội, 2012.
24. Bùi Xuân Vương (2017), “Tổng hợp và đánh giá thực nghiệm *in vitro* vật liệu hydroxyapatite trong môi trường giả dịch thể người SBF” *Tạp chí khoa học: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* - Trường Đại học Sư phạm Tp Hồ Chí Minh, Tập 14, Số 3, tr. 39-46.

Tiếng Anh

25. Adler – Nissen J (1986), *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, Elsevier Science Ltd, 451 pp.
26. Akram M., Ahmed R., Shakir I., Ibrahim W. A. W. and Hussain, R. (2014), “Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources”, *Journal of Materials Science*, 49, pp. 1461-1475.
27. Akiyama, D. M., W.G. Dominy, and A.L. Lawrence. (1991), “Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry: Revised”, pages 80-98 in D.M, Akiyama and R.K.H. Tan, editors, *Proceedings of the Aquaculture and Feed Processing and Nutrition Workshop*. Singapore, Republic of Singapore.
28. Agnieszka S.K. and Zbigniewk W. (2012), “The influence of calcination parameters on free calcium oxide content in natural hydroxyapatite”, *Ceramics International*, 38, pp. 641–647.
29. Amaya, E. A., Davis, D. A. and Rouse, D. B. (2007), “Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions”, *Aquaculture*, 262, pp. 393–401.

30. Amer W., Abdelouahdi K., Ramananarivo H. R., Zahouily M., Fihri A., Djessas K. and Solhy A. (2013), "Microwave-assisted synthesis of mesoporous nano-hydroxyapatite using surfactant templates", *CrystEngComm*, 16, pp. 543–549.
31. Amiza M.A., Nurul Ashikin S. and Faazaz A. L. (2011), "Optimization of enzymatic protein hydrolysis from silver catfish (*Pangasius* sp.) frame", *International Food Research Journal* 18, pp. 775-781.
32. Anderson, I. (1993), "*The veterinary approach to marine prawns. In: Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine*", Editor Brown L., pp. 271-296.
33. Aspino S.I., Horna S.J. and Eijssink V.G.H. (2005), "Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera", *Process Biochemistry*, 40, pp. 1957–1966.
34. Araneda M., Pérez E. P. and Gasca-Leyva E. (2008), "White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: condition state based on length and weight," *Aquaculture*, 283, 13-18.
35. Arnesen J. A. and Gildberg A. (2006), "Extraction of muscle proteins and gelatine from cod head", *Process Biochemistry*, 41, pp. 697–700.
36. Bahrololoom M., Javidi M., Javadpour S. and Ma J. (2009), "Characterisation of natural hydroxyapatite extracted from bovine cortical bone ash", *Journal of Ceramic Processing Research*, 10, pp. 129–138.
37. Balamurugan A., Michel J., Fauré J., Benhayoune H., Wortham L., Sockalingum G., Banchet V., Bouthors S., Laurent-maquin D. and Balossier G. (2006), "Synthesis and Structural analysis of sol gel derived stoichiometric monophasic hydroxyapatite", *Ceramics – Silikáty*, 50(1), pp. 27-31.
38. Barakat N. A. M., Khil M. S., Omran A. M., Sheikh F. A. And Kim H. Y. (2009), "Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods", *Journal of Materials Processing Technology*, 209, pp. 3408–3415.
39. Batista I. (1999), "Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extraction", *Euro Food Research Technology*, 210, pp. 84–89.
40. Best S.M., Porter A.E., Thian E.S. and Huang J. (2008), "Bioceramics: Past, present and for the future", *Journal of the European Ceramic Society*, 28, pp. 1319–1327.
41. Blackwood D. J. and Seah K. H. W. (2009), "Electrochemical cathodic deposition of hydroxyapatite: Improvements in adhesion and crystallinity", *Materials Science and Engineering C*, 29 (4), pp. 1233-1238.

42. Boutinguiza M., Pou J., Comesaña R., Lusquiños F., de Carlos A. and León B. (2012), “Biological hydroxyapatite obtained from fish bones”, *Materials Science and Engineering C*, 32, pp. 478–486.
43. Bouyer E., Gitzhofer F. and Boulos MI. (2000), “Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 11, pp. 523-531.
44. Brendel T., Engel A. and Rossel C. (1992), “Hydroxyapatite coatings by a polymeric route”, *Journal of Materials Science: Materials in medicine*, 3, pp. 175 -179.
45. Boyd, C. E. (1998), “*Water quality for pond aquaculture*”, Department of Fisheries and Allied, Aquaculture Auburn University, Alabama 36849 USA.
46. Cao L. Y, Zhang C. B. and Huang J. F. (2005), “Synthesis of hydroxyapatite nanoparticles in ultrasonic precipitation”, *Ceramics Internatioal*, 31, pp. 1041–1044.
47. Chanratchakool, P. (2003), “Advice on aquatic animal health care: Problems in *Penaeus monodon* culture in low salinity areas”, *Aquaculture Asia*, 8(1), pp. 54-56.
48. Chen D. Z., Tang C. Y., Chan K. C., Tsui C. P. and Yu P. H. F. (2007), “Dynamic mechanical properties and in vitro bioactivity of PHBHV/HA nanocomposite”, *Composites Science and Technology*, 67(7–8), pp. 1617-1626.
49. Cho J. S. and Kang Y. C. (2008), “Nano-sized hydroxyapatite powders prepared by flame spray pyrolysis”, *Journal of Alloys and Compounds*, 464, pp. 282–287.
50. Coelho T.M., Nogueira E.S., Weinand W.R., Lima W.M., Steimacher A., Medina A.N., Baesso M.L., Bento A.C. (2007), “Thermal properties of natural nanostructured hydroxyapatite extracted from fish bone waste”, *Journal of Applied Physics*, 101, pp. 84701-84706.
51. Cuzon, G., Guillaume, J., 1997. Energy and protein/energy ratio. Book on Crustacea Nutrition. IWGCN. WAS, LSU, Baton Rouge, Louisiana, USA, pp. 51–70.
52. Dabiri S. M. H., Rezaie A. A., Moghimi M. and Rezaie H. (2018), “Extraction of hydroxyapatite from fish bones and its application in nickel adsorption”, *BioNanoScience*, 8, pp. 823–834.
53. Davis, A. D. and Arnold, C. R. (1998), “The design, management and production of a recirculating raceway system for the production of marine shrimp”, *Aquacultural Engineering*, 17, pp. 193–211.

54. Davis D. A., Lawrence A. L. and Gatlin III D. (1993), "Dietary copper requirement of *Penaeus vannamei*," *Nippon Suisan Gakkaishi* . 59, 117-122.
55. Dekkers E., Raghavan S., Kristinsson H. G. and Marshall M. R. (2011), "Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates", *Food Chemistry*, 124, pp. 640–645.
56. Dent C. E. (1980), "Calcium metabolism in bone disease: effects of treatment with microcrystalline calcium hydroxyapatite compound and dihydrotachysterol", *Journal of the Royal Society of Medicine*, 73 (11), pp. 780-785.
57. Diniz F.M. and Martin A. M. (1998), "Influence of process variables on the hydrolysis of shark muscle protein", *Food Science Technology International*. 4, pp. 91–98.
58. Dong F.M., Fairgrieve W.T., Skonberg D. I. and Rasco B. A. (1993), "Preparation and nutrient analyses of lactic acid bacterial ensiled salmon viscera", *Aquaculture*, 109, 1993, pp. 351-366.
59. Dorozhkin S. V. (2010), "Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates", *Acta Biomaterialia*, 6 (3), pp. 715-734.
60. Dos Santos S. D., Martins V. G., Salas-Mellado M., Prentice C. (2011), "Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes". *Food Bioprocess Technology*, 4, pp. 1399–1406.
61. Dumay, J., Allery, M., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen. P., Carbonneau M.E., Bergé, J.P., (2009), "Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) heads with Protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89 (9), pp. 1599 - 1606.
62. Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., Bergé, J.P. (2006), "Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases", *Process Biochemistry*, 41, pp. 2327 - 2332.
63. Esparza-Leal H. M., Ponce-Palafox J. T., Valenzuela-Quinónez W., Arredondo-Figueroa J. L. and García-Ulloa Gómez M. (2010), "Effects of Density on Growth and Survival of Juvenile Pacific White Shrimp, *Penaeus vannamei*, Reared in Low salinity Well Water," *Journal of the World Aquaculture Society*, 41, 648-654.

64. Fara A. N. K. A., Mohd A. B. Y. and Hasan Z. A. (2015), "Preparation and characterization of biological hydroxyapatite (HAp) obtained from tilapia fish bone". *Advanced Materials Research*, 1087, pp. 152-156.
65. Fara A. N. K. A., Pragash G. and Abdullah H. Z (2015), "Effect of calcination on the properties of hydroxyapatite from tilapiafish bones", *Advanced Materials Research*, 1125, pp. 474 – 478.
66. Furukawa T., Matsusue Y., Yasunaga T., Nakagawa Y. and Okada Y. (2000), "Histomorphometric study on high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures", *Journal of Biomedical Materials Research*, 50 (3), pp. 410-419.
67. Fik M. and Surowka K. (1986), "Preparation and properties of protein concentrate from broiler chicken heads", *Journal of the Sciene of Food and Agricultural*, 37, 445 – 454.
68. Fonseca, R. A. S., Silva, C. M., Fernandes G. R. and Prentice C. (2016), "Enzymatic hydrolysis of cobia (*Rachycentron canadum*) meat and wastes using different microbial enzymes", *International Food Research Journal* 23 (1), pp. 152-160.
69. Habibovic P., Kruyt M. C., Juhl M. V., Clyens S. and Martinetti R. (2008), "Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes", *Journal of Orthopaedic Research*, 26 (10), pp. 1363-1370.
70. Hashimoto Y., Taki T. and Sato T. (2009), "Sorption of dissolved lead from shooting range soils using hydroxyapatite amendments synthesized from industrial byproducts as affected by varying pH conditions", *Journal of Environmental Management*, 90 (5), pp. 1782-1789.
71. Herpandi A. R., Nadiah W. A. W., Febrianto N. A. and Huda N. (2017), "Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Skipjack Tuna By-Product Using Protamex®: A Response Surface Approach", *Journal of Fundamental and Applied Sciences* 9 (2S), pp. 845-860.
72. Herpandi H.N., Rosma A. and Wan Nadiah W.A. (2012), "Degree of hydrolysis and free tryptophan content of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) protein hydrolysates produced with different type of industrial proteases", *International Food Research Journal*, 19 (3), pp. 863 - 867.

73. Hou Y., Wu Z., Dai Z., Wang G. and Wu G. (2017), "Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance", *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8 (1), pp. 1-13.
74. Huong T. M. N., Sylla K. S. B., Randriamahatody Z., Donnay-Moreno C., Moreau J., Luyen T. T. and Bergé J. P. (2010), "Enzymatic Hydrolysis of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) By-Products Using Protamex Protease", *Food Technology Biotechnology*, 49 (1), pp. 48–55.
75. Huys, G. (2002). Preservation of bacteria using commercial cry preservation systems. Standard Operation Procedure, Asia resist.
76. Gasga J. R. and Pastenes E. S. (2005), "Determination of the Point and Space Groups for Hydroxyapatite by Computer Simulation of CBED Electron Diffraction Patterns", *Revista Mexicana de Física*, 51(5), pp. 525-529.
77. Ghaly A. E., Ramakrishnan V. V., Brooks M. S., Budge S. M. and Dave D. (2013), "Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review", *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 5(4), pp. 107-129.
78. González-Félix M., Lawrence A., Gatlin III D. and Perez-Velazquez M. (2003), "Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: I. Effect of dietary linoleic and linolenic acids at different concentrations and ratios on juvenile shrimp growth, survival and fatty acid composition", *Aquaculture Nutrition*, 9, 105-113.
79. Goto T. and Sasaki K. (2016), "Synthesis of morphologically controlled hydroxyapatite from fish bone by urea-assisted hydrothermal treatment and its Sr²⁺ sorption capacity", *Powder Technology*, 292, pp. 314–322.
80. Goto T. and Sasaki K. (2014), "Effects of trace elements in fish bones on crystal characteristics of hydroxyapatite obtained by calcination," *Ceramics International*, 40, 10777-10785.
81. Gu Y. W., Khor K. A. and Cheang P. (2004), "Bone-like apatite layer formation on hydroxyapatite prepared by spark plasma sintering (SPS)", *Biomaterials*, 25 (18), pp. 4127-4134.

82. Guerard F., Guimas L. and Binet A. (2002), "Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19–20, pp. 489-498.
83. Guo G., Sun Y., Wang Z. and Guo, H. (2005), "Preparation of hydroxyapatite nanoparticles by reverse microemulsion". *Ceramics International*, 31, pp. 869–872.
84. Idowu A. T., Benjakul S., Sinthusamran S., Sookchoo P. and Kishimura H. (2018), "Protein hydrolysate from salmon frames: Production, characteristics and antioxidative activity", *Journal of Food Biochemistry*, e12734, DOI. org/10.1111/jfbc.12734
85. Iijima M., Moriwaki Y., Yamaguchi R, and Kuboki Y. (1997), "Effect of Solution pH on the Calcium Phosphates Formation and Ionic Diffusion on and through the Collagenous Matrix", *Connective Tissue Research*, 36 (2), pp. 73-83.
86. Ideia, P., Pinto, J., Ferreira, R., Figueiredo, L., Spínola, V., & Castilho, P. C. (2020), "Fish processing industry residues: A review of valuable products extraction and characterization methods", *Waste and Biomass Valorization*, 11 (7), 3223-3246.
87. IFFO-International Fishmeal and Fish Oil Organisation (2017), "Statistical Yearbook".
88. Ishak N. H. and Sarbon N. M. (2018), "A review of protein hydrolysates and bioactive peptides deriving from wastes generated by fish processing", *Food Bioprocessing Technology*, 11, pp. 2-16,
89. Ivankovic H., Gallego Æ. G., Ferrer Æ E., Tkalec S., Orlic Æ. and Ivankovic M. (2009), "Preparation of highly porous hydroxyapatite from cuttlefish bone", *Journal Material Sciences*, 20, pp. 1039–1046.
90. Jee S. S., Kasinath R. K., DiMasi E., Kim Y.-Y. and Gower L. (2011), "Oriented hydroxyapatite in turkey tendon mineralized via the polyme-induced liquidprecursor (PILP) process", *CrystEngComm*, 13(6), pp. 2077-2083.
91. Jin Y., Liu F.J., Liu Y.J. and Tian L.X. (2019), "Dietary phenylalanine requirement of the juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water", *Journal of Shellfish Research*, 38 (1), pp. 35-41.
92. Joo L.O. and Daniel C.N.C. (1999), "Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: A review", *Biomedical engineering*, 28, pp. 1–41.

93. Kandyliari, A., Mallouchos, A., Papandroulakis, N., Golla, J. P., Lam, T. T., Sakellari, A. and Kapsokefalou, M. (2020), "Nutrient composition and fatty acid and protein profiles of selected fish by-products", *Foods*, 9 (2), 190.
94. Kannan S. and Ferreira J. M. F. (2006), "Synthesis and thermal stability of hydroxyapatite- β -tricalcium phosphate composites with cosubstituted sodium, magnesium, and fluorine", *Chemistry of Materials*, 18, pp.198–203.
95. Kim J. Y., Seol Y. J., Park E. K., Kim S. Y. and Cho D. W. (2009), "Fabrication of a hydroxyapatite scaffold for bone tissue regeneration using microstereolithography and molding technology", *Microelectronic Engineering*, 86 (4–6), pp. 1443-1446.
96. Kojima Y., Kitazawa K. and Nishimiya N. (2012), "Synthesis of nano-sized hydroxyapatite by ultrasound irradiation", *Journal of Physics: Conference Series* 339, doi:10.1088/1742-6596/339/1/012001.
97. Kokubo T. and Takadama H. (2006), "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", *Biomaterials*, 27 (15), pp. 2907-2915.
98. Kongsri S., Janpradit K., Buapa K., Techawongstien S. and Chanthai S. (2013), "Nanocrystalline hydroxyapatite from fish scale waste: preparation, characterization and application for selenium adsorption in aqueous solution", *Chemical Engineering Journal*, 215–216, pp. 522–532.
99. Kristinsson H. G. and Rasco B. A. (2000), "Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties", *Food Science and Nutrition*, 40, pp. 43-81.
100. Krzysztof H., Mirosław M. B., Jadwiga B. M., Maria H., Włodzimierz M., Tomasz P., Anna P. and Jerzy Z. (2006), "Natural hydroxyapatite-its behaviour during heat treatment", *Journal of the European Ceramic Society*, 26, pp. 537–542.
101. Kureshy N. and Davis D. A. (2002), "Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*", *Aquaculture*, 204, 125-143.
- 102.** Labella R., Braden M. and Debt S. (1994), "Novel hydroxyapatite-based dental composites", *Biomaterials*, 15, pp. 1197-1200.
103. Le Gouic, A. V., Harnedy, P. A., FitzGerald, R. J., Mérillon, J. M., & Ramawat, K. G. (2018), "Bioactive peptides from fish protein by-products. Bioactive molecules in food", *Cham: Springer International Publishing*, 1-35.

104. Leonardo Trombelli A. S., Pramstraller M., Wikesjo Ulf M.E. and Farina R. (2010), "Single Flap Approach With and Without Guided Tissue Regeneration and a Hydroxyapatite Biomaterial in the Management of Intraosseous Periodontal Defects", *Journal of Periodontology*, 81 (9), pp. 1256-1263.
105. Li B., Guo B., Fan H. and Zhang X. (2008), "Preparation of nano-hydroxyapatite particles with different morphology and their response to highly malignant melanoma cells in vitro", *Applied Surface Science*, 255 (2), pp. 357-360.
106. Li E., Wang X., Chen K., Xu C., Qin J. G. and Chen L. (2017), "Physiological change and nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity" *Reviews in Aquaculture*, 9, 57-75.
107. Liam C.P., Christina J.N., Stuart R.K., Erik D.S., Samuel I.S. (2008), "Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel", *Chemical Reviews*, 108, pp. 4754–4783.
108. Liang C., Joseph M. M., James C. M. L. and Hao L. (2011), "The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells", *Nanotechnology*, 22(10), pp. 1057-1066.
109. Liaset M., Julshamn B. and Espe K. (2003), "Chemical composition and theretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex TM", *Process Biochemistry*, vol. 38, pp. 1747 – 1759.
110. Liu J., Li K., Wang H., Zhu M. and Yan H. (2004), "Rapid formation of hydroxyapatite nanostructures by microwave irradiation", *Chemical Physics Letters*, 396, pp. 429–432.
111. Luna-Zaragoza D., Romero-Guzmán E.T. and Reyes-Gutiérrez L.R. (2009), "Surface and physicochemical characterization of phosphates vivianite, $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_3$ and hydroxyapatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ", *Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering*, 8, pp. 591- 609.
112. Manafi S. A. and Joughehdoust S. (2009), "Synthesis of Hydroxyapatite Nanostructure by Hydrothermal Condition for Biomedical Application", *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences Spring*, 5(2), pp. 89-94.
113. Markovic M., Fowler B. O. and Tung M. S. (2004), "Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Material", *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol*, 109 (6), pp. 553-568.

114. Marini E., Ballanti P., Silvestrini G., Valdinucci F. and Bonucci E. (2004), “The presence of different growth factors does not influence bone response to hydroxyapatite: preliminary results”, *Journal of Orthopaedics and traumatology*, 5 (1), pp. 34-43.
115. Manalu J. L., Soegijono B. and Indrani D. J. (2016), “Study of mghydroxyapatite composite with various composition of hydroxyapatite which obtained from cow bones in simulation body fluid (SBF)”, *Asian Journal of Applied Sciences*, 3, pp. 810–816.
116. Manso M., Jimenez C., Morant C., Herrero P. and Martinez-Duart JM. (2000), “Electrodeposition of hydroxyapatite coatings in basic conditions”, *Biomaterials*, 21, pp. 1755 – 1761.
117. Minh N. P. and Harmoniz J. (2014), “Utilization of pangasius hypophthalmus by-product to produce protein hydrolysate using alcalase enzyme”, *Journal Of Harmonized Research in Applied Sciences*, 2 (3), pp. 250-256.
118. Monmaturapoj N. and Yatongchai C. (2010), “Effect of sintering on microstructure and properties of hydroxyapatite produced by different synthesizing methods”, *Journal of the Minerals Metals & Materials*, 20, pp. 53–61.
119. Mohammad A. W., Kumar A. G. and Basha R. K. (2015), “Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis Spp.*) scale gelatin”, *International Aquatic Research*, 7, pp. 27–39.
120. Motamedzadegan M., Davarniam A., Asadi B., Abedian G. and Ovissipour A. (2010), “Optimization of enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna *Thunnus albacares* viscera using Neutrase”, *Sari Agric. Sci. Nat. Resour. Univ. Sari*, vol. 2, pp. 173–181.
121. Mustafa N., Ibrahim M. H. I., Asmawi R. and Amin A. M. (2015), “Hydroxyapatite extracted from waste fish bones and scales via calcination method”, *Applied Mechanics and Materials*, 773-774, pp. 287–290.
122. Narasaraaju T. S. B. and Phebe D. E. (1996), “Some Physico-chemical Aspects of Hydroxyapatite”, *Journal of Materials Science*, 31, pp. 1-21.
123. Nurdiana H., Siti M. M. K. and Siti N. F. M (2008), “Optimization of protein extraction from freeze dried fish waste using response surface methodology (RSM)”. *International Journal Engineering Technololy*, 5 (1), pp. 48-56.

124. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry (2000), The Association of Official Analytical Chemistry, Washington, DC.
125. O'Hare P., Meenan B. J., Burke G. A., Byrne G. and Dowling D. (2010), "Biological responses to hydroxyapatite surfaces deposited via a co-incident microblasting technique", *Biomaterials*, 31 (3), pp. 515-522.
126. Ovissipour M., Taghiof M.A., Motamedzadegan R. B., Esmaeili Mo. A. (2009), "Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeon *Huso huso* using Alcalase", *International Aquatic Research*, 1, pp. 31 - 38.
127. Ovissipour M., Benjakul S., Safari R. and Motamedzadegan A. (2010), "Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna *Thunnus albacares* head using Alcalase and Protamex", *International Aquatic Research*, 2, pp. 87 - 95.
128. Ovissipour M., Kenari A. A., Motamedzadegan A. and Nazari R. M. (2012), "Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*)", *Food Bioprocess Technology*, 5, pp. 696–705.
129. Ozawa M. and Suzuki S. (2002), "Microstructural development of natural hydroxyapatite originated from fish-bone waste through heat treatment", *Journal of the American Ceramic Society*, 85, pp. 1315–1317.
130. Piccirillo C., Silva M. F., Pullar R. C., da Cruz I. B., Jorge R., Pintado M. M. E., Castro P. M .L. (2013), "Extraction and characterisation of apatite and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones", *Materials Science and Engineering C*, 33, pp. 103–110.
131. Pon-On W., Suntornsaratoon P., Charoenphandhu N., Thongbunchoo J., Krishnamra N. and Tang I. M. (2016), "Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material", *Materials Science and Engineering: C*, 62, 183-189.
132. Rabiee S. M., Moztafzadeh F. and Solati-Hashjin M. (2010), "Synthesis and characterization of hydroxyapatite cement", *Journal of Molecular Structure*, 969 (1–3), pp. 172-175.
133. Rabiei A., Blalock T., Thomas B., Cuomo J. and Yang Y. (2007), "Microstructure, mechanical properties, and biological response to functionally graded HA coatings", *Materials Science and Engineering C*, 27(3), pp. 529-533.

134. Ramakrishnan, V.V., Ghaly A.E., Brooks, M.S., Budge, S.M., (2013), "Extraction of proteins from mackerel fish processing waste using Alcalase enzyme", *Bioprocessing and Biotechniques*, 3 (2), pp. 1 - 9.
135. Ramírez, A. (2007), "*Salmon by-products protein*", FAO Fisheries Circular No. 1027
136. Roslan J., Yunos K. F. Md., Abdullah N. and Kamal S. M. M. (2014), "Characterization of Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-Product", *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2, pp. 312 – 319.
137. Rocha J. H. G., Lemos A. F., Agathopoulos S., Valério P., Kannan S., Oktar F. N., Ferreira J. M. F. (2005), "Scaffolds for bone restoration from cuttlefish", *Bone*, 37, pp. 850–857.
138. Rustad T. (2003), "Utilisation of marine by-products", *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry*, pp. 458-463.
139. Sadat-Shojai M., Khorasani M. T., Dinpanah-Khoshdargi E. and Jamshidi A., (2013), "Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures", *Acta Biomater*, 9 (8), pp. 7591-621.
140. Sahebian, S., Zebarjad, S. M., Sajjadi, S. A., Sherafat, Z. and Lazzeri. A. (2007), "Effect of both uncoated and coated calcium carbonate on fracture toughness of HDPE/CaCO₃ nanocomposites", *Journal of Applied Polymer Science*, 104, pp. 3688–3694.
141. Samocha, T. M., Lawrence, A. L., Collins, C. A., Castille, F. L., Bray, W. A., Davies, C. J., Lee, P. G. and Wood, G.F. (2004), "Production of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in high-density greenhouse enclosed raceways using low salinity groundwater", *Journal of Applied Aquaculture*, pp. 1-19.
142. Santos M. H., Oliveira M. d., Souza L. P. d. F., Mansur H. S. and Vasconcelos W. L. (2004), "Synthesis control and characterization of hydroxyapatite prepared by wet precipitation process", *Materials Research*, 7, pp. 625-630.
143. Sathivel J. B., Smiley S., Prinyawiwatkul S. and Peter W. (2005), "Functional and Nutritional Properties of Red Salmon (*Oncorhynchus nerka*) Enzymatic Hydrolysates", *Journal Food Sciences*, vol.70, pp. Nr.6.
144. See S. F., Hoo L. L. and Babji A. S. (2011), "Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon *Salmo salar*) skin by Alcalase", *International Food Research Journal* 18 (4), pp. 1359-1365.

145. Shearer K. D., Maage A., Opstvedt J. and Mundheim H. (1992), "Effects of high-ash diets on growth, feed efficiency, and zinc status of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*)", *Aquaculture*, 106, pp. 345-355.
146. Shi P., Liu M., Fan F., Yu C., Lu W. and Du M. (2018), "Characterization and biocompatibility with osteoblasts of natural hydroxyapatite originated from fish bone", *Materials Science and Engineering C*, 90, pp. 706-712.
147. Soares M., Rezende P.C., Corrêa N.M., Rocha J.S., Martin M.A., Andrade T.C., Fracalossi D.M. and do Nascimento Vieira F. (2020), "Protein hydrolysates from poultry by-product and swine liver as an alternative dietary protein source for the Pacific white shrimp", *Aquaculture Reports*, 17, 100344.
148. Souissi N., Bougatef A., Triki-Ellouz Y. and Nasri M. (2007), "Biochemical and functional properties of Sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates", *Food Technology Biotechnology*, 45 (2), pp. 187 - 194.
149. Šližytė R., Mozuraitytė R., Matínez-Alvarez O., Falch E., Fouchereau-Peron M. and Råustad T. (2009), "Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones", *Process Biochemistry*, 44, pp. 668 - 677.
150. Strietzel F. P., Reichart P. A. and Graf H. L. (2007), "Lateral alveolar ridge augmentation using a synthetic nano-crystalline hydroxyapatite bone substitution material (Ostim®). Preliminary clinical and histological results", *Clinical Oral Implants Research*, 18 (6), pp. 743-751.
151. Sunil B. R. and Jagannatham M. (2016), "Producing hydroxyapatite from fish bones by heat treatment", *Materials Letters*, 185, pp. 411–414.
152. Toppe J., Albrektsen S., Hope B. and Aksnes A. (2007), "Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species", *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 146, pp. 395–401.
153. Tanuja S., Viji P., Zynudheen A. and Joshy C. (2012), "Composition, functional properties and antioxidative activity of hydrolysates prepared from the frame meat of Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)", *Egyptian Journal of Biology*, 14, 27-35.

154. Undeland I., Kelleher D. S. and Hultin O. H. (2002), "Recovery of Functional Proteins from Herring (*Clupea harengus*) Light Muscle by an Acid or Alkaline Solubilization Process", *Journal Agriculture Food Chemistry*, 50, pp. 7371–7379.
155. Uskokovic V. and Uskokovic D. P. (2011), "Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 96(1), pp. 152-191.
156. Van Wyk P. and Institution H. B. O. (1999), "Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems", *Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems*, 125-139.
157. Vázquez José A., Maria Blanco, Massa A. E., Amado I. R. and Pérez-Martín R. I. (2017), "Production of Fish Protein Hydrolysates from *Scyliorhinus canicula* Discards with Antihypertensive and Antioxidant Activities by Enzymatic Hydrolysis and Mathematical Optimization Using Response Surface Methodology", *Marine Drugs*, 15, 306.
158. Venkatesan J., Qian Z. J., Ryu B. M., Kumar N. A., Kim S. K. (2011), "Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted-chitosan–natural hydroxyapatite composite for bone tissue engineering", *Carbohydrate Polymers*, 83, pp. 569 –577.
159. Wang L. and Nancollas G. H. (2009), "Pathways to biomineralization and biodegradation of calcium phosphates: the thermodynamic and kinetic controls", *Dalton Transactions*, 15 (15), pp. 2665-2672.
160. Wang Y., Liu L. and Guo S. (2010), "Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro", *Polyme Degradation and Stability*, 95 (2), pp. 207- 213.
161. Wu H.C., Chen H.M. and Shiau C.Y. (2003), "Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*)", *Food Research International* 36, pp. 949–957.
162. Ye Q., Ohsaki K., Li K., Li D. J. and Zhu C. S. (2001), "Histological reaction to hydroxyapatite in the middle ear of rats", *Auris Nasus Larynx*, 28 (2), pp. 131-136.

163. Younesi M., Javadpour S. and Bahrololoom M.E. (2011), "Effect of heat treatment temperature on chemical compositions of extracted hydroxyapatite from bovine bone ash", *Journal of Materials Engineering and Performance*, 20 (8), pp. 1484–1490.
164. Zamora-Sillero J., Kütter M. T., Tesser M. B., Monserrat J. M. and Prentice C, (2018), "Effect of dietary common carp by-product protein hydrolysates on antioxidant status in different organs of zebrafish (*Danio rerio*)", *Aquaculture Nutrition*, DOI: 10.1111/anu.12835.
165. Zamora-Sillero J., Gharsallaoui A. and Prentice C. (2018), "Peptides from fish by-product protein hydrolysates and its functional properties: An overview," *Marine Biotechnology*, 20, 118-130.

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1 - PHỤ LỤC CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH

Phụ lục 1.1. Xác định hàm lượng ẩm trong nguyên liệu và trong sản phẩm.....	-3-
Phụ lục 1.2. Xác định hàm lượng khoáng trong nguyên liệu và trong sản phẩm.....	-3-
Phụ lục 1.3. Xác định hàm lượng lipít theo phương pháp Floch.....	-4-
Phụ lục 1.4. Xác định chỉ số peroxide trong dầu thô.....	-5-
Phụ lục 1.5. Xác định tổng vi sinh vật hiếu khí	-6-
Phụ lục 1.6. Xác định độ thủy phân bằng phương pháp DNFB.....	-7-

Phụ lục 1.1. Xác định hàm lượng ẩm trong nguyên liệu và trong sản phẩm

Nguyên lý:

Hàm lượng ẩm trong phế liệu cá và sản phẩm thu nhận được xác định bằng phương pháp cân trọng lượng, theo đó mẫu được sấy ở 105°C đến trọng lượng không đổi, sử dụng số liệu chênh lệch về khối lượng trước và sau sấy để tính hàm lượng ẩm của mẫu.

Tiến hành:

Cân 3 – 5 g mẫu vào cốc sấy sau đó sấy ở 105°C đến khi khối lượng cốc sấy + mẫu giữa 2 lần cân không thay đổi. Hàm lượng ẩm được tính theo công thức:

$$M(\%) = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó:

M: Hàm lượng ẩm của mẫu, W_1 : Khối lượng cốc sấy.

W_2 : Khối lượng cốc + mẫu trước khi sấy.

W_3 : Khối lượng cốc + mẫu sau khi sấy.

Phụ lục 1.2. Xác định hàm lượng khoáng trong nguyên liệu và trong sản phẩm

Nguyên lý:

Hàm lượng khoáng trong mẫu phế liệu cá và trong sản phẩm thu nhận được xác định bằng phương pháp nung ở 650°C, theo đó mẫu sau khi sấy được nung ở 650°C trong 24h, sử dụng số liệu chênh lệch về khối lượng trước và sau nung để suy ra hàm lượng khoáng của mẫu.

Tiến hành:

Sau khi xác định hàm lượng ẩm, cốc mẫu tiếp tục được nung ở 650°C trong 24h, mẫu sau nung được làm nguội trong bình hút ẩm và cân để xác định khối lượng W_4 . Hàm lượng khoáng được xác định theo công thức sau:

$$A(\%) = \frac{W_4 - W_1}{W_2 - W_1} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó:

A: Hàm lượng khoáng của mẫu, W_1 : Khối lượng cốc sấy.

W_2 : Khối lượng cốc + mẫu trước khi sấy.

W_4 : Khối lượng cốc + mẫu sau khi nung.

Phụ lục 1.3. Xác định hàm lượng lipít theo phương pháp Folch

Nguyên lý:

Dùng hỗn hợp dung môi Chloroform: Methanol với tỉ lệ 2:1 để hoà tan tất cả chất béo trong mẫu, tách lớp và chiết qua phễu lọc nhiều lần. Sau khi làm bay hơi hết dung môi, cân chất béo còn lại và tính ra hàm lượng lipít trong 100g mẫu.

Tiến hành:

Tách lipít từ mẫu:

Cân 1g mẫu vào ống thủy tinh vial. Cho thêm 600 mL nước cất, 5mL Methanol, 10mL Chloroform và 200 μ L BHT. Ngâm mẫu trong dung môi khoảng 10 phút. Đồng hoá mẫu bằng máy trong 1 phút. Đổ vào ống xilanh có lót tấm giấy lọc GF/C ở dưới đáy cho dịch mẫu chảy xuống hết hoàn toàn. Cho thêm 5mL Methanol và 10mL Chloroform vào vial và đồng hóa mẫu trong 20 giây. Đổ dung dịch này vào xilanh cho mẫu được lọc hết hoàn toàn. Cho thêm 7,5mL NaCl 0,9% vào phễu chiết chứa dịch mẫu. Đảo trộn ngược phễu chiết nhiều lần và giữ ở 5°C/4h để dịch mẫu phân chia thành 2 lớp.

Chiết rút dung dịch lipít:

Tách lớp dưới (chứa lipít hoà tan trong dung môi) cho chảy vào phễu chiết thể tích 50mL. Loại bỏ lớp dịch phía trên. Xác định thể tích chiết ở trên (V_{dm}). Cho thêm 5mL CH₃OH 50% vào mỗi mẫu trong phễu chiết 100mL. Đảo trộn ngược phễu chiết nhiều lần. Cho phân chia tách thành 2 lớp và lắng qua đêm ở 5°C.

Định lượng lipít:

Lớp dưới được rút chảy xuống bình cầu 100mL. Cô quay chân không làm bay hơi dung môi trong bình cầu ở 37°C đến khi còn lại thể tích khoảng 1mL. Hòa tan mẫu lại ngay lập tức bằng một lượng thể tích nhỏ Chloroform (chỉ cho phép tiếp xúc rất nhỏ lượng mẫu đã làm khô với không khí). Chuyển mẫu qua bình định mức 5mL, tráng rửa bình cầu nhiều lần và định mức bằng Chloroform vừa đủ 5mL. Sau khi xử lý xong, dung dịch này được mang đi xác định hàm lượng lipít tổng. Dung dịch này có thể lưu giữ trong tủ đông -20°C.

Xác định hàm lượng lipít tổng:

Lấy chính xác 2mL dung dịch mẫu đã xử lý, cho vào một ống thủy tinh có nắp 4mL đã được sấy chân không và cân với lượng không đổi. Làm khô bằng khí nitơ. Cho vào tủ sấy chân không đến khối lượng không đổi, áp suất 65-70 psi trong 1 giờ.

Tính kết quả:

Lipít tổng số (%) tính theo công thức:

$$X_L(\%) = \frac{(m_1 - m_0) * V_{dm}}{m * T * V_m} * 100$$

Trong đó:

X_L : Hàm lượng lipít tổng số tính theo trọng lượng khô của mẫu.

m_1 : Trọng lượng cân ống vial và mẫu sau sấy (g).

m_0 : Trọng lượng cân ống vial khối lượng không đổi (g).

m : Trọng lượng cân mẫu (g).

V_{dm} : Thể tích định mức sau xử lý (mL).

V_m : Thể tích mẫu sau xử lý lấy để sấy (mL)

T : Thành phần khô của mẫu, $T = (100 - W)/100$.

W : Độ ẩm của mẫu (%)

Phụ lục 1.4. Xác định chỉ số peroxide trong dầu thô**Nguyên lý:**

Mẫu được hòa tan trong isooctan và acid acetic rồi bổ sung kali iodua. Iot được giải phóng bởi các peroxit được xác định bằng chuẩn độ với dung dịch natri thiosulfat.

Tiến hành:

Cho 5,0 g mẫu và lấy 50 mL diethyl ete vào bình tam giác, đậy nắp bình, lắc bình trong vòng 2 phút để hòa tan phần chất béo có trong mẫu. Tiến hành lọc để loại bỏ phần chất rắn và thu phần dung dịch đã hòa tan chất béo. Đun cách thủy để diethyl ete có trong dung dịch bay hơi. Phần chất béo còn lại trong bình cho thêm 30 mL acid acetic và 20 mL isooctan. Đậy nắp, lắc bình trong vòng 2 phút để hòa tan phần chất béo. Thêm 0,5 mL dung dịch kali iodua bão hòa. Đậy bình nón và dùng máy khuấy từ để trộn mà không tạo dòng xoáy, hoặc lắc trộn bằng tay mà không để lẫn bọt khí trong 1 phút. Mở bình nón, thêm ngay 50 mL nước đã loại khoáng, tráng rửa nút thủy tinh mài và lắc bình. Chuẩn độ ngay lượng iot giải phóng bằng dung dịch chuẩn natri thiosulfat 0,01 N đến màu vàng cam rồi vàng nhạt và sau khi thêm 0,5 mL dung dịch tinh bột thì chuyển từ màu tím đến không màu. Trong phép thử mẫu trắng, được thực hiện đồng thời với phép xác định, không sử dụng quá 0,1 mL dung dịch natri thiosulfat 0,01 N.

Tính kết quả:

Trị số peroxide (PV) được tính bằng công thức sau:

$$PV = \frac{(V - V_0) * C_{thio} * 1000}{m}$$

Trong đó:

V: là thể tích dung dịch natri thiosulfat 0,01 N chuẩn độ mẫu thử (mL).

V₀: là thể tích dung dịch natri thiosulfat 0,01 N chuẩn độ mẫu trắng (mL).

C_{thio}: là nồng độ của dung dịch chuẩn natri thiosulfat 0,01 N (mol/L).

M: là khối lượng mẫu thử (g).

Phụ lục 1.5. Xác định tổng vi sinh vật hiếu khí

Nguyên lý:

Tổng số vi sinh vật hiếu khí được tính dựa vào số lượng khuẩn lạc đếm được trên môi trường PCA sau 48h nuôi cấy ở 37°C.

Tiến hành:

Pha môi trường:

Cân chính xác 4.7g môi trường PCA cho vào bình tam giác, thêm 200mL nước cất, dùng nút bông không thấm dầy kín, giấy bao phủ lên để giữ chặt. Dùng lò microwave hoặc bếp điện hòa tan môi trường. Sau đó đưa vào nồi hấp tiệt trùng ở 121°C, 1atm trong 15 phút. Khi sử dụng làm nguội đến 40-50°C.

Đồng nhất và pha loãng mẫu:

Cho 10 g thực phẩm vào 90 mL NaCl 0.9% vô trùng vào bao PE vô trùng. Tiến hành đồng nhất bằng máy stomacher 30|| thu được nồng độ 10⁻¹. Chuẩn bị các ống nghiệm và pipet vô trùng. Dùng pipet 10mL vô trùng lấy 9 mL NaCl vô trùng vào các ống nghiệm. Dùng micropipet 1mL vô trùng lấy 1mL từ nồng độ 10⁻¹ đưa vào ống nghiệm thứ nhất. Tiến hành rung lắc ống nghiệm bằng máy rung ống nghiệm votex, được nồng độ 10⁻². Làm tương tự với các nồng độ kế tiếp.

Nuôi cấy dịch mẫu:

Dùng micropipet vô trùng lấy 1mL dịch mẫu cho vào đĩa, lấy 3 đĩa/nồng độ.

Chuẩn bị môi trường đã tiệt trùng, để nguội 45°C, đổ môi trường vào các đĩa đã chứa 1mL dịch mẫu. Xoay nhẹ đĩa theo vòng tròn nhằm trộn đều dịch mẫu với môi trường để thu được những khuẩn lạc tách rời. Khi môi trường đông lại, lật ngược đĩa, ủ trong tủ ủ ổn nhiệt. Thời gian ủ vi khuẩn hiếu khí 48h/37°C.

Tính kết quả:

Số lượng tế bào trong một gram mẫu được tính theo công thức sau đây:

$$N \left(\frac{CFU}{g} \right) = \frac{\sum C}{(n_1 * v_1 * d_1 + \dots + n_i * v_i * d_i)}$$

Trong đó:

N: số tế bào vi khuẩn trong 1g mẫu.

C: tổng số khuẩn lạc đếm được trên các hộp petri đã chọn.

n_i : số hộp petri cấy tại nồng độ pha loãng thứ i.

d_i : hệ số pha loãng tương ứng.

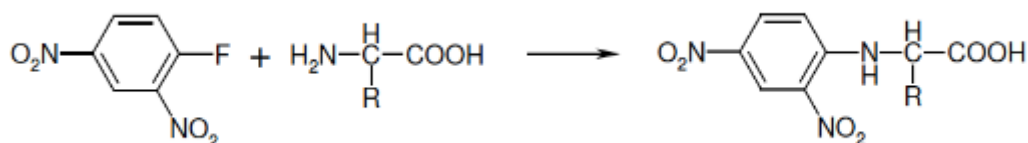
v_i : thể tích dịch mẫu cấy vào mỗi đĩa.

Phụ lục 1.6. Xác định độ thủy phân bằng phương pháp DNFB

Nguyên lý:

Độ thủy phân được xác định là tỉ số liên kết peptit bị cắt đứt và tổng số liên kết peptit trong một đơn vị khối lượng protein. Đối với mỗi liên kết peptit bị cắt đứt thì có một nhóm amin tự do (NH_2) được hình thành. Do đó, độ thủy phân được xác định thông qua việc định lượng amin tự do.

Nhóm amin tự do phản ứng với dinitrofluorobenzene (DNFB) tạo ra hợp chất dinitrophenyl có màu vàng. Độ hấp thụ sẽ được đo ở bước sóng 410nm bằng máy quang phổ UV – VIS.



Dụng cụ, thiết bị:

- Máy quang phổ.
- Máy ly tâm.
- Bể ổn nhiệt.
- Ống nghiệm.

Hóa chất:

- Natri tetraborat 2%.
- 1 – fluoro – 2,4 – dinitrobenzene (DNFB).
- DNFB / Ethanol (0,013/1 : v/v).
- HCl 10N.

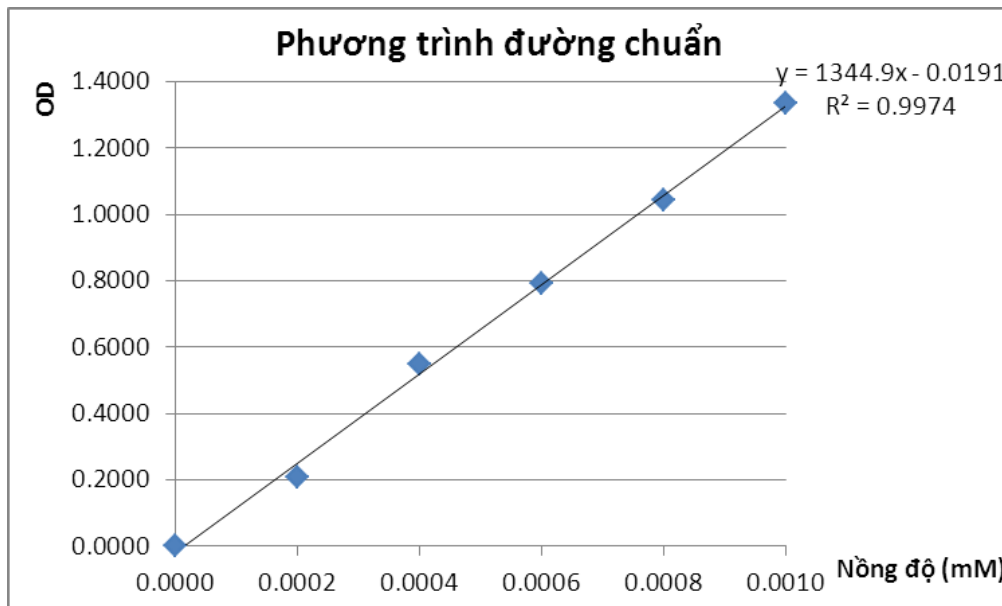
- Dung dịch chuẩn glycine 0,5mM, dung dịch được bảo quản ở 0°C.

Xây dựng đường chuẩn glycine:

- Dung dịch glycine 5mM: Cân 0,0375g glycine sau đó định mức lên 100mL bằng nước cất.
- Tiến hành hút vào các ống nghiệm với nồng độ tương ứng theo bảng. Mỗi nồng độ Cho thêm vào ống nghiệm 1 mL natri tetraborat 2%, sau đó lắc đều.
- Cho thêm 0,25 mL DNFB vào ống nghiệm, sau đó lắc đều.
- Đặt các ống nghiệm ở bể ổn nhiệt ở 60°C trong 10 phút.
- Làm nguội nhanh bằng nước.
- Cho thêm 2 mL HCl đậm đặc, sau đó lắc đều rồi đem đo ở bước sóng 410 nm

Bảng 3.1: Kết quả đo quang phổ UV – Vis

Nồng độ (mM)	0	0,0002	0,0004	0,0006	0,0008	0,001
Glycine 5mM (μl)	0	40	80	120	160	200
Nước (μl)	1000	960	920	880	840	800
OD	0	0,207	0,547	0,791	1,042	1,333



Tiến hành:

- Sau khi eppendorf đã ly tâm 5 phút 13000 vòng, dùng micropipet để hút 0,2 mL dịch thủy phân cho vào bình định mức 100mL (pha loãng 500 lần).

- Cho 1 mL dịch thủy phân đã pha loãng vào ống nghiệm. (Đối với mẫu trắng cho 1 mL nước cất vào ống nghiệm).
- Cho thêm vào ống nghiệm 1 mL natri tetraborat 2%, sau đó lắc đều.
- Cho thêm 0,25 mL DNFB vào ống nghiệm, sau đó lắc đều.
- Đặt các ống nghiệm ở bể ổn nhiệt ở 60⁰C trong 10 phút.
- Làm nguội nhanh bằng nước.
- Cho thêm 2 mL HCl 10N, sau đó lắc đều, để yên trong 10 phút.
- Đo ở bước sóng 410 nm.

Lưu ý: Sau khi cho thêm DNFB, bọc ống nghiệm bằng aluminum foil để tránh ánh sáng.

Tính kết quả:

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

$$DH = \frac{A \times 500}{P \times 8,6 \times 0,001} \times 100.$$

Trong đó:

- DH: Độ thủy phân (%).
- h: Số liên kết peptit bị đứt.
- h_{tot}: Tổng số liên kết peptit (P*8,6).
- A: Lượng amin tự do được hình thành trong quá trình thủy phân (mol/ml). Tính dựa vào phương trình đường chuẩn $A = \left(\frac{OD+0,0191}{1344,9} \right) \times 0,001$.
- 500: Hệ số pha loãng.
- 8,6: Số liên kết peptit trong 1g protein (*Helenice và Flaviamaria, 2006*).
- P: Hàm lượng protein trong 1g dịch thủy phân (g/g).

PHỤ LỤC 2 - PHỤ LỤC CÁC SỐ LIỆU

Phụ lục 2.1-1- Ảnh hưởng của phương pháp xử lý nguyên liệu đến DH dịch FPH...	-12-
Phụ lục 2.1-2- Ảnh hưởng của phương pháp xử lý nguyên liệu đến NR dịch FPH.....	-13-
Phụ lục 2.1-3- Ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu đến DH dịch FPH.....	-14-
Phụ lục 2.1-4- Ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu đến NR dịch FPH.....	-15-
Phụ lục 2.1-5- Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme alcalase đến DH dịch FPH.....	-16-
Phụ lục 2.1-6- Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme alcalase đến NR dịch FPH.....	-17-
Phụ lục 2.1-7- Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến DH dịch FPH.....	-18-
Phụ lục 2.1-8- Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến NR dịch FPH.....	-19-
Phụ lục 2.1-9- Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến DH dịch FPH.....	-20-
Phụ lục 2.1-10- Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến NR dịch FPH.....	-21-
Phụ lục 2.1-11- Ảnh hưởng của nồng độ muối bổ sung đến DH dịch FPH.....	-22-
Phụ lục 2.1-12- Ảnh hưởng của nồng độ muối bổ sung đến NR dịch FPH.....	-23-
Phụ lục 2.1-13- Ảnh hưởng của hàm lượng lipase đến NR dịch FPH.....	-24-
Phụ lục 2.1-14- Ảnh hưởng của hàm lượng lipase đến hàm lượng lipít dịch FPH....	-25-
Phụ lục 2.1-15- Ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng lipase đến NR dịch FPH.	-26-
Phụ lục 2.1-16 - Ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng lipase đến hàm lượng lipít còn lại trong dịch FPH.....	-27-
Phụ lục 2.2-1- Ảnh hưởng của nhiệt độ nung đến hiệu suất thu hồi HA.....	-28-
Phụ lục 2.2-2- Ảnh hưởng của thời gian nung đến hiệu suất thu hồi HA.....	-29-
Phụ lục 2.2-3- Ảnh hưởng của tốc độ gia nhiệt nung đến hiệu suất thu hồi HA.....	-30-
Phụ lục 2.3-1- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 20.....	-31-
Phụ lục 2.3-2- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 27.....	-32-
Phụ lục 2.3-3- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 34.....	-33-
Phụ lục 2.3-4- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 41.....	-34-

Phụ lục 2.3-5- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 48.....	-35-
Phụ lục 2.3-6- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 55.....	-36-
Phụ lục 2.3-7- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn trong môi trường nước nuôi tôm ở các giai đoạn từ post 20-post 55.....	-37-
Phụ lục 2.3-8- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số Vibrio trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 20.....	-39-
Phụ lục 2.3-9- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số Vibrio trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 27.....	-40-
Phụ lục 2.3-10- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số Vibrio trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 34.....	-41-
Phụ lục 2.3-11- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số Vibrio trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 41.....	-42-
Phụ lục 2.3-12- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số Vibrio trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 48.....	-43-
Phụ lục 2.3-13- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số Vibrio trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 55.....	-44-
Phụ lục 2.3-14- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số Vibrio trong môi trường nước nuôi tôm ở các giai đoạn từ post 20-post 55.....	-45-
Phụ lục 2.3-15- Ảnh hưởng của hỗn hợp bổ sung đến tỷ lệ sống của tôm 55 ngày tuổi ở 5 nghiệm thức.....	-47-
Phụ lục 2.3-16- Ảnh hưởng của hỗn hợp bổ sung đến năng suất tôm 55 ngày tuổi ở 5 nghiệm thức.....	-48-
Phụ lục 2.4-Thống kê hiệu quả sử dụng phế liệu cá Tra sau khi phi-lê.....	-49-

Phụ lục 2.1-1- Ảnh hưởng của phương pháp xử lý nguyên liệu đến DH dịch FPH

Group Statistics

DH	Phương pháp xử lý nguyên liệu	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
	1	3	27.3167	.12741	.07356
	2	3	28.6500	.15133	.08737

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
DH	Equal variances assumed	.131	.735	-11.674	4	.000	-1.33333	.11421	-1.65044	-1.01623
	Equal variances not assumed			-11.674	3.887	.000	-1.33333	.11421	-1.65410	-1.01257

Phụ lục 2.1-2- Ảnh hưởng của phương pháp xử lý nguyên liệu đến NR dịch FPH

Group Statistics

NR	Phương pháp xử lý nguyên liệu	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
	1	3	81.5700	.35384	.20429
	2	3	80.2333	.29297	.16915

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
NR	Equal variances assumed	.071	.803	5.040	4	.007	1.33667	.26523	.60028	2.07305
	Equal variances not assumed			5.040	3.865	.008	1.33667	.26523	.59007	2.08327

Phụ lục 2.1-3- Ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu đến DH dịch FHP

Descriptives

Kích cỡ nguyên liệu (g/con)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
500 - 700	3	31.6667	.98043	.56605	29.2312	34.1022	30.67
700 - 900	3	28.6500	1.04518	.60343	26.0536	31.2464	27.67
900 - 1100	3	24.1533	.95479	.55125	21.7815	26.5252	23.33
1100 - 1500	3	22.7200	1.08088	.62405	20.0349	25.4051	21.85
1500 - 2000	3	19.9167	1.13178	.65344	17.1052	22.7282	18.61
Total	15	25.4213	4.44597	1.14795	22.9592	27.8834	18.61

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	265.905	4	66.476	61.387	.000
Within Groups	10.829	10	1.083		
Total	276.734	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Kích cỡ nguyên liệu (g/con)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
500 - 900	3				31.6667
700 - 900	3			28.6500	
900 - 1100	3		24.1533		
1100 - 1500	3		22.7200		
1500 - 2000	3	19.9167			
Sig.		1.000	.123	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Phụ lục 2.1-4- Ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu đến DH dịch FHP

Descriptives

Cỡ nguyên liệu (g/con)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
500 – 700	3	82.3500	1.11946	.64632	79.5691	85.1309	81.47
700 – 900	3	80.7767	.85442	.49330	78.6542	82.8992	80.08
900 – 1100	3	78.2933	1.02080	.58936	75.7575	80.8291	77.43
1100 – 1500	3	75.3533	1.05121	.60691	72.7420	77.9647	74.14
1500 – 2000	3	72.4267	1.21167	.69956	69.4167	75.4366	71.18
Total	15	77.8400	3.82817	.98843	75.7200	79.9600	71.18

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	193.972	4	48.493	43.309	.000
Within Groups	11.197	10	1.120		
Total	205.169	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Kích cỡ nguyên liệu (g/con)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
500 - 700	3				82.3500
700 - 900	3				80.7767
900 - 1100	3			78.2933	
1100 - 1500	3		75.3533		
1500 - 2000	3	72.4267			
Sig.		1.000	1.000	1.000	.099

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Phụ lục 2.1-5- Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme alcalase đến DH dịch FPH

Descriptives

Hàm lượng enzyme (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	6.4833	.91468	.52809	4.2112	8.7555	5.52
0.1	3	20.5800	1.32525	.76514	17.2879	23.8721	19.79
0.2	3	23.9833	1.67255	.96565	19.8285	28.1382	22.09
0.3	3	24.9500	1.12054	.64694	22.1664	27.7336	23.85
0.4	3	30.6867	1.50151	.86690	26.9567	34.4166	29.60
0.5	3	30.1633	.90589	.52301	27.9130	32.4137	29.12
0.6	3	30.2500	1.43816	.83032	26.6774	33.8226	28.87
Total	21	23.8710	8.20612	1.79072	20.1356	27.6063	5.52

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1323.231	6	220.538	130.945	.000
Within Groups	23.579	14	1.684		
Total	1346.810	20			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hàm lượng enzyme (%)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	6.4833			
0.1	3		20.5800		
0.2	3			23.9833	
0.3	3			24.9500	
0.4	3				30.6867
0.5	3				30.1633
0.6	3				30.2500
Sig.		1.000	1.000	.377	.647

Phụ lục 2.1-6- Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme alcalase đến NR dịch FPH

Descriptives

Hàm lượng enzyme (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	37.2200	.91280	.52700	34.9525	39.4875	36.48
0.1	3	59.7233	1.04963	.60601	57.1159	62.3308	58.81
0.2	3	78.9767	1.34106	.77426	75.6453	82.3080	77.85
0.3	3	81.1600	.82177	.47445	79.1186	83.2014	80.43
0.4	3	82.2433	1.01933	.58851	79.7112	84.7755	81.44
0.5	3	81.3367	1.68586	.97333	77.1488	85.5246	79.39
0.6	3	78.8967	1.97348	1.13939	73.9943	83.7991	76.62
Total	21	71.3652	16.14579	3.52330	64.0158	78.7147	36.48

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5189.362	6	864.894	496.883	.000
Within Groups	24.369	14	1.741		
Total	5213.731	20			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hàm lượng enzyme (%)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	37.2200			
0.1	3		59.7233		
0.2	3			78.9767	
0.3	3			81.1600	81.1600
0.4	3				82.2433
0.5	3			81.3367	81.3367
0.6	3			78.8967	
Sig.		1.000	1.000	.054	.356

Phụ lục 2.1-7- Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến DH dịch FPH

Descriptives

Nhiệt độ (°C)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
45	3	24.0433	.40796	.23554	23.0299	25.0568	23.61
50	3	27.1100	.40632	.23459	26.1006	28.1194	26.65
55	3	29.3767	.92916	.53645	27.0685	31.6848	28.31
60	3	35.8333	.74467	.42994	33.9835	37.6832	35.28
65	3	35.0667	.87809	.50696	32.8854	37.2480	34.53
70	3	34.6667	.72418	.41810	32.8677	36.4656	34.19
Total	18	31.0161	4.63111	1.09156	28.7131	33.3191	23.61

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	358.513	5	71.703	141.292	.000
Within Groups	6.090	12	.507		
Total	364.603	17			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Nhiệt độ (°C)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
45	3	24.0433			
50	3		27.1100		
55	3			29.3767	
60	3				35.8333
65	3				35.0667
70	3				34.6667
Sig.		1.000	1.000	1.000	.080

Phụ lục 2.1-8- Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến NR dịch FPH

Descriptives

Nhiệt độ (°C)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
45	3	39.3867	.91904	.53061	37.1036	41.6697	38.33
50	3	55.2333	.86985	.50221	53.0725	57.3942	54.49
55	3	73.0900	.83451	.48180	71.0170	75.1630	72.31
60	3	74.1500	1.04843	.60531	71.5456	76.7544	72.99
65	3	73.1867	1.44684	.83533	69.5925	76.7808	71.52
70	3	73.1900	1.07531	.62083	70.5188	75.8612	71.97
Total	18	64.7061	13.53826	3.19100	57.9737	71.4385	38.33

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3102.542	5	620.508	560.152	.000
Within Groups	13.293	12	1.108		
Total	3115.835	17			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Nhiệt độ (°C)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
45	3	39.3867		
50	3		55.2333	
55	3			73.0900
60	3			74.1500
65	3			73.1867
70	3			73.1900
Sig.		1.000	1.000	.275

Phụ lục 2.1-9- Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến DH dịch FPH

Descriptives

Thời gian (giờ)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
3	3	26.1267	1.56858	.90562	22.2301	30.0232	25.01
6	3	35.0067	.39577	.22850	34.0235	35.9898	34.55
9	3	35.9700	.55678	.32146	34.5869	37.3531	35.37
12	3	34.7000	1.13873	.65744	31.8712	37.5288	33.77
15	3	34.4800	1.15169	.66493	31.6190	37.3410	33.68
Total	15	33.2567	3.83242	.98953	31.1343	35.3790	25.01

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	194.524	4	48.631	43.810	.000
Within Groups	11.100	10	1.110		
Total	205.624	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tessts)

Thời gian (giờ)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3	3	26.1267	
6	3		35.0067
9	3		35.9700
12	3		34.7000
15	3		34.4800
Sig.		1.000	.137

Phụ lục 2.1-10- Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến NR dịch FPH

Descriptives

Thời gian (giờ)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
3	3	53.7067	.67211	.38804	52.0371	55.3763	53.12
6	3	74.0867	1.09295	.63101	71.3716	76.8017	72.84
9	3	81.8800	.92666	.53501	79.5780	84.1820	80.86
12	3	74.9800	.85159	.49166	72.8645	77.0955	74.16
15	3	74.4133	.71933	.41530	72.6264	76.2002	73.59
Total	15	71.8133	9.85948	2.54571	66.3533	77.2733	53.12

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1353.435	4	338.359	451.434	.000
Within Groups	7.495	10	.750		
Total	1360.930	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tessts)

Thời gian (giờ)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
3	3	53.7067		
6	3		74.0867	
9	3			81.8800
12	3		74.9800	
15	3		74.4133	
Sig.		1.000	.255	1.000

Phụ lục 2.1-11- Ảnh hưởng của nồng độ muối bổ sung đến DH dịch FPH

Descriptives

Nồng độ muối bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	29.4300	.75359	.43509	27.5580	31.3020	28.56
1	3	29.7833	1.04711	.60455	27.1822	32.3845	28.70
2	3	31.2767	1.10947	.64056	28.5206	34.0328	30.05
3	3	29.2933	.98083	.56628	26.8568	31.7299	28.17
4	3	22.1000	1.01489	.58595	19.5789	24.6211	21.00
5	3	17.3467	.87460	.50495	15.1740	19.5193	16.34
Total	18	26.5383	5.26175	1.24021	23.9217	29.1549	16.34

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	459.357	5	91.871	97.524	.000
Within Groups	11.304	12	.942		
Total	470.662	17			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Nồng độ muối bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3			29.4300	
1	3			29.7833	29.7833
2	3				31.2767
3	3			29.2933	
4	3		22.1000		
5	3	17.3467			
Sig.		1.000	1.000	.568	.084

Phụ lục 2.1-12- Ảnh hưởng của nồng độ muối bổ sung đến NR dịch FPH

Descriptives

Nồng độ muối bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	77.4500	.79618	.45967	75.4722	79.4278	76.63
1	3	79.9533	.94817	.54743	77.5979	82.3087	78.86
2	3	81.9800	.75286	.43466	80.1098	83.8502	81.12
3	3	78.1533	.81837	.47249	76.1204	80.1863	77.24
4	3	69.2400	.70057	.40447	67.4997	70.9803	68.62
5	3	58.3367	1.11648	.64460	55.5632	61.1102	57.05
Total	18	74.1856	8.39192	1.97799	70.0124	78.3588	57.05

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1188.199	5	237.640	316.375	.000
Within Groups	9.014	12	.751		
Total	1197.212	17			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Nồng độ muối bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3			77.4500		
1	3				79.9533	
2	3					81.9800
3	3			78.1533		
4	3		69.2400			
5	3	58.3367				
Sig.		1.000	1.000	.340	1.000	1.000

Phụ lục 2.1-13 - Ảnh hưởng của hàm lượng lipase đến NR dịch FPH

Descriptives

Hàm lượng enzyme lipase (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	82.7767	1.87033	1.07984	78.1305	87.4228	81.03
0.01	3	80.9633	1.05396	.60850	78.3451	83.5815	80.33
0.02	3	81.1467	1.10817	.63980	78.3938	83.8995	80.15
0.03	3	82.9700	.91340	.52735	80.7010	85.2390	81.98
0.04	3	83.6200	.96814	.55896	81.2150	86.0250	82.83
0.05	3	81.7733	1.06744	.61629	79.1217	84.4250	80.75
0.06	3	80.7333	1.08260	.62504	78.0440	83.4227	80.03
Total	21	81.9976	1.46153	.31893	81.3323	82.6629	80.03

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.476	6	14	.815

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22.881	6	3.814	2.691	.060
Within Groups	19.840	14	1.417		
Total	42.722	20			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hàm lượng enzyme lipase (%)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0	3	82.7767	82.7767
0.01	3	80.9633	
0.02	3	81.1467	
0.03	3	82.9700	82.9700
0.04	3		83.6200
0.05	3	81.7733	81.7733
0.06	3	80.7333	
Sig.		.057	.100

Phụ lục 2.1-14 - Ảnh hưởng của hàm lượng lipase đến hàm lượng lipid dịch FPH

Descriptives

Hàm lượng enzyme lipase (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	3.6767	0.11015	.06360	3.4030	3.9503	3.55
0.01	3	2.5533	0.08622	.04978	2.3392	2.7675	2.46
0.02	3	1.6400	0.11533	.06658	1.3535	1.9265	1.55
0.03	3	0.3833	0.08386	.04842	0.1750	0.5917	0.33
0.04	3	0.3533	0.08386	.04842	0.1450	0.5617	0.30
0.05	3	0.3333	0.10408	.06009	0.0748	0.5919	0.25
0.06	3	0.2967	0.10017	.05783	0.0478	0.5455	0.20
Total	21	1.3195	1.28774	.28101	0.7334	1.9057	0.20

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	33.030	6	5.505	568.358	.000
Within Groups	0.136	14	.010		
Total	33.165	20			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hàm lượng enzyme lipase (%)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3				3.6767
0.01	3			2.5533	
0.02	3		1.6400		
0.03	3	0.3833			
0.04	3	0.3533			
0.05	3	0.3333			
0.06	3	0.2967			
Sig.		0.336	1.000	1.000	1.000

Phụ lục 2.1-15 - Ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng lipase đến NR dịch FPH

Descriptives

Thời gian thủy phân (giờ)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
1	3	62.5033	0.64748	0.37382	60.8949	64.1118	61.92
2	3	73.2900	0.74505	0.43016	71.4392	75.1408	72.55
3	3	76.7967	0.85196	0.49188	74.6803	78.9130	75.98
4	3	78.4500	0.84640	0.48867	76.3474	80.5526	77.67
5	3	73.3033	0.65287	0.37693	71.6815	74.9251	72.60
Total	15	72.8687	5.78697	1.49419	69.6639	76.0734	61.92

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.085	4	10	.985

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	463.161	4	115.790	203.655	.000
Within Groups	5.686	10	.569		
Total	468.847	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Thời gian thủy phân (giờ)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	3	62.5033			
2	3		73.2900		
3	3			76.7967	
4	3				78.4500
5	3		73.3033		
Sig.		1.000	.983	1.000	1.000

Phụ lục 2.1-16 - Ảnh hưởng của thời gian thủy phân bằng lipase đến hàm lượng lipid còn lại trong dịch FPH

Descriptives

Thời gian thủy phân (giờ)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
1	3	1.71	0.086	0.050	1.50	1.93	1.62
2	3	0.42	0.070	0.040	0.25	0.59	0.34
3	3	0.38	0.053	0.031	0.25	0.51	0.32
4	3	0.35	0.050	0.029	0.23	0.47	0.3
5	3	0.33	0.046	0.027	0.21	0.44	0.3
Total	15	0.64	0.560	0.145	0.33	0.95	0.3

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.620	4	10	.659

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.351	4	1.088	275.142	.000
Within Groups	0.040	10	0.004		
Total	4.390	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Thời gian thủy phân (giờ)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3		1.71
2	3	0.42	
3	3	0.38	
4	3	0.35	
5	3	0.33	
Sig.		0.121	1.000

Phụ lục 2.2-1- Ảnh hưởng của nhiệt độ nung đến hiệu suất thu hồi HA

Descriptives

Nhiệt độ nung (⁰ C)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
600	3	59.9000	.94016	.54280	57.5645	62.2355	58.97
700	3	58.7000	.70704	.40821	56.9436	60.4564	57.93
800	3	57.5000	.60828	.35119	55.9890	59.0110	57.10
900	3	56.7000	.75498	.43589	54.8245	58.5755	55.90
1000	3	56.9000	.55000	.31754	55.5337	58.2663	56.35
Total	15	57.9400	1.38741	.35823	57.1717	58.7083	55.90

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.211	4	10	.926

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21.696	4	5.424	10.326	.001
Within Groups	5.253	10	.525		
Total	26.949	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Nhiệt độ nung (⁰ C)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
600	3			59.9000
700	3		58.7000	58.7000
800	3	57.5000	57.5000	
900	3	56.7000		
1000	3	56.9000		
Sig.		.226	.070	.070

Phụ lục 2.2-2- Ảnh hưởng của thời gian nung đến hiệu suất thu hồi HA

Descriptives

Thời gian nung (giờ)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
1	3	57.2033	.84973	.49059	55.0925	59.3142	56.41
2	3	56.7067	.85781	.49526	54.5758	58.8376	55.79
3	3	56.3033	.67099	.38740	54.6365	57.9702	55.69
4	3	55.8000	.87178	.50332	53.6344	57.9656	55.20
5	3	55.4967	.91817	.53010	53.2158	57.7775	54.44
Total	15	56.3020	.95066	.24546	55.7755	56.8285	54.44

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.169	4	10	.949

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.630	4	1.408	2.004	.170
Within Groups	7.022	10	.702		
Total	12.652	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Thời gian nung (giờ)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3		57.2033
2	3	56.7067	56.7067
3	3	56.3033	56.3033
4	3	55.8000	55.8000
5	3	55.4967	
Sig.		.130	.085

Phụ lục 2.2-3- Ảnh hưởng của tốc độ gia nhiệt nung đến hiệu suất thu hồi HA

Descriptives

Tốc độ gia nhiệt nung (°C/phút)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
3	3	57.1000	.80467	.46458	55.1011	59.0989	56.25
5	3	55.6000	.73750	.42579	53.7680	57.4320	55.13
7	3	55.2967	.68237	.39397	53.6016	56.9918	54.72
10	3	55.1000	.75498	.43589	53.2245	56.9755	54.40
Total	12	55.7742	1.03862	.29982	55.1143	56.4341	54.40

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.025	3	8	.994

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.412	3	2.471	4.438	.041
Within Groups	4.454	8	.557		
Total	11.866	11			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Tốc độ gia nhiệt nung (°C/phút)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3	3		57.1000
5	3	55.6000	
7	3	55.2967	
10	3	55.1000	
Sig.		.454	1.000

Phụ lục 2.3-1- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 20

Descriptives

Hỗn hợp dịch protein và HA (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	4.7967	.33561	.19376	3.9630	5.6304	4.45
1	3	4.5000	.22913	.13229	3.9308	5.0692	4.30
3	3	4.2333	.24664	.14240	3.6206	4.8460	3.95
5	3	4.0000	.27839	.16073	3.3084	4.6916	3.70
7	3	4.0000	.26907	.15535	3.3316	4.6684	3.78
Total	15	4.3060	.39321	.10153	4.0882	4.5238	3.70

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.413	4	.353	4.699	.022
Within Groups	.752	10	.075		
Total	2.165	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
7	3	4.0000	
5	3	4.0000	
3	3	4.2333	
1	3	4.5000	4.5000
0	3		4.7967
Sig.		.064	.215

Phụ lục 2.3-2- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 27

Descriptives

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	12.8967	1.54098	.88969	9.0686	16.7247	11.12
1	3	7.6033	.74097	.42780	5.7627	9.4440	6.76
3	3	7.2000	.87430	.50478	5.0281	9.3719	6.22
5	3	6.4000	.62960	.36350	4.8360	7.9640	5.88
7	3	6.6000	.88199	.50922	4.4090	8.7910	5.62
Total	15	8.1400	2.63649	.68074	6.6800	9.6000	5.62

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	87.590	4	21.898	22.517	.000
Within Groups	9.725	10	.972		
Total	97.315	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
5	3	6.4000	
7	3	6.6000	
3	3	7.2000	
1	3	7.6033	
0	3		12.8967
Sig.		.193	1.000

Phụ lục 2.3-3- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 34

Descriptives

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	14.4000	1.80884	1.04433	9.9066	18.8934	12.38
1	3	9.6000	1.31195	.75745	6.3409	12.8591	8.12
3	3	8.4967	1.10871	.64011	5.7425	11.2508	7.28
5	3	7.5967	1.07742	.62205	4.9202	10.2731	6.38
7	3	7.8000	1.11987	.64655	5.0181	10.5819	6.59
Total	15	9.5787	2.82590	.72964	8.0137	11.1436	6.38

ANOVA - MatdoTPCPL34

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	94.525	4	23.631	13.680	.000
Within Groups	17.275	10	1.727		
Total	111.800	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
5	3	7.5967	
7	3	7.8000	
3	3	8.4967	
1	3	9.6000	
0	3		14.4000
Sig.		.112	1.000

Phụ lục 2.3-4- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 41

Descriptives

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	25.5000	2.43056	1.40328	19.4622	31.5378	23.10
1	3	23.6967	2.28058	1.31669	18.0314	29.3619	21.30
3	3	21.4033	2.03289	1.17369	16.3534	26.4533	20.18
5	3	20.7000	2.31784	1.33821	14.9422	26.4578	18.50
7	3	20.5000	2.37664	1.37215	14.5961	26.4039	17.92
Total	15	22.3600	2.78842	.71997	20.8158	23.9042	17.92

ANOVA – Mật độ TPC PL41

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	56.330	4	14.083	2.681	.094
Within Groups	52.524	10	5.252		
Total	108.854	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
7	3	20.5000	
5	3	20.7000	
3	3	21.4033	21.4033
1	3	23.6967	23.6967
0	3		25.5000
Sig.		.142	.063

Phụ lục 2.3-5- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 48

Descriptives

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	41.9967	3.94589	2.27816	32.1945	51.7988	38.10
1	3	43.0033	3.33515	1.92555	34.7184	51.2883	39.30
3	3	42.2967	3.35226	1.93543	33.9692	50.6241	38.52
5	3	41.0967	3.28202	1.89487	32.9437	49.2496	37.52
7	3	41.3033	2.98031	1.72068	33.8998	48.7068	37.92
Total	15	41.9393	2.95565	.76315	40.3025	43.5761	37.52

ANOVA- MatdoTPCPL48

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.133	4	1.783	.155	.956
Within Groups	115.170	10	11.517		
Total	122.302	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
5	3	41.0967
7	3	41.3033
0	3	41.9967
3	3	42.2967
1	3	43.0033
Sig.		.538

Phụ lục 2.3-6- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 55

Descriptives

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	9.5000	.94175	.54372	7.1606	11.8394	8.42
1	3	8.9000	.79019	.45622	6.9371	10.8629	8.12
3	3	8.3033	.86327	.49841	6.1589	10.4478	7.40
5	3	8.0000	.92601	.53463	5.6997	10.3003	7.10
7	3	8.1067	.98002	.56581	5.6722	10.5412	7.13
Total	15	8.5620	.95996	.24786	8.0304	9.0936	7.10

ANOVA-MatdoTPCPL55

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.753	4	1.188	1.458	.286
Within Groups	8.149	10	.815		
Total	12.901	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
5	3	8.0000
7	3	8.1067
3	3	8.3033
1	3	8.9000
0	3	9.5000
Sig.		.091

Phụ lục 2.3-7- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn trong môi trường nước nuôi tôm ở các giai đoạn từ post 20-post 55.

Descriptive Statistics

Giai đoạn tôm	Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation
20	0	3	4.7967	.33561
	1	3	4.5000	.22913
	3	3	4.3000	.31225
	5	3	4.0000	.27839
	7	3	4.0000	.26907
	Total	15	4.3193	.39816
27	0	3	12.8967	1.54098
	1	3	7.6033	.74097
	3	3	7.2000	.87430
	5	3	6.4000	.62960
	7	3	6.6000	.88199
	Total	15	8.1400	2.63649
34	0	3	14.4000	1.80884
	1	3	9.6000	1.31195
	3	3	8.4967	1.10871
	5	3	7.5967	1.07742
	7	3	7.8000	1.11987
	Total	15	9.5787	2.82590
41	0	3	25.5000	2.43056
	1	3	23.6967	2.28058
	3	3	21.4033	2.03289
	5	3	20.7000	2.31784
	7	3	20.5000	2.37664
	Total	15	22.3600	2.78842
48	0	3	41.9967	3.94589
	1	3	43.0033	3.33515
	3	3	42.2967	3.35226
	5	3	41.0967	3.28202
	7	3	41.3033	2.98031
	Total	15	41.9393	2.95565
55	0	3	9.5000	.94175
	1	3	8.9000	.79019
	3	3	8.3033	.86327
	5	3	8.0000	.92601
	7	3	8.1067	.98002
	Total	15	8.5620	.95996

Total	0	18	18.1817	12.85363
	1	18	16.2172	13.90159
	3	18	15.3333	13.67727
	5	18	14.6322	13.44208
	7	18	14.7183	13.44458
	Total	90	15.8166	13.22811

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15369.800 ^a	29	529.993	156.135	.000
Intercept	22514.709	1	22514.709	6632.802	.000
GiaidoanTom	15118.075	5	3023.615	890.753	.000
Honbopbosung	154.737	4	38.684	11.396	.000
GiaidoanTom * Honbopbosung	96.988	20	4.849	1.429	.145
Error	203.667	60	3.394		
Total	38088.176	90			
Corrected Total	15573.467	89			

a. R Squared = .987 (Adjusted R Squared = .981)

Post Hoc Tests (Giai đoạn tôm)

Giai đoạn tôm	N	Subset				
		1	2	3	4	5
20	15	4.3193				
27	15		8.1400			
55	15		8.5620	8.5620		
34	15			9.5787		
41	15				22.3600	
48	15					41.9393
Sig.		1.000	.533	.136	1.000	1.000

Post Hoc Tests (Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung)

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Subset		
		1	2	3
5	18	14.6322		
7	18	14.7183		
3	18	15.3333	15.3333	
1	18		16.2172	
0	18			18.1817
Sig.		.288	.155	1.000

Phụ lục 2.3-8- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn Vibrio trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 20.

Descriptives

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	.1367	.03786	.02186	.0426	.2307	.11
1	3	.1233	.04041	.02333	.0229	.2237	.10
3	3	.0800	.01000	.00577	.0552	.1048	.07
5	3	.0600	.01000	.00577	.0352	.0848	.05
7	3	.0600	.01000	.00577	.0352	.0848	.05
Total	15	.0920	.03986	.01029	.0699	.1141	.05

ANOVA

MatdoVibrioPL20

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.016	4	.004	5.757	.011
Within Groups	.007	10	.001		
Total	.022	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
5	3	.0600		
7	3	.0600		
3	3	.0800	.0800	
1	3		.1233	.1233
0	3			.1367
Sig.		.389	.068	.543

Phụ lục 2.3-9- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn *Vibrio* trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 27.

Descriptives

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	.5833	.06028	.03480	.4336	.7331	.52
1	3	.4633	.05132	.02963	.3359	.5908	.42
3	3	.3500	.04000	.02309	.2506	.4494	.31
5	3	.3300	.03464	.02000	.2439	.4161	.31
7	3	.3233	.03215	.01856	.2435	.4032	.30
Total	15	.4100	.11065	.02857	.3487	.4713	.30

ANOVA

MatdoVibrio

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.151	4	.038	18.713	.000
Within Groups	.020	10	.002		
Total	.171	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
7	3	.3233		
5	3	.3300		
3	3	.3500		
1	3		.4633	
0	3			.5833
Sig.		.504	1.000	1.000

Phụ lục 2.3-10- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn Vibrio trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 34.

Descriptives

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	.7167	.07572	.04372	.5286	.9048	.63
1	3	.5667	.05859	.03383	.4211	.7122	.50
3	3	.4267	.05686	.03283	.2854	.5679	.38
5	3	.3800	.03606	.02082	.2904	.4696	.34
7	3	.3933	.04509	.02603	.2813	.5053	.35
Total	15	.4967	.14115	.03645	.4185	.5748	.34

ANOVA

MatdoVibrio

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.247	4	.062	19.661	.000
Within Groups	.031	10	.003		
Total	.279	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
5	3	.3800		
7	3	.3933		
3	3	.4267		
1	3		.5667	
0	3			.7167
Sig.		.354	1.000	1.000

Phụ lục 2.3-11- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn *Vibrio* trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 41.

Descriptives

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	2.7367	.28042	.16190	2.0401	3.4333	2.43
1	3	2.1733	.18610	.10745	1.7110	2.6356	2.00
3	3	1.8633	.14572	.08413	1.5014	2.2253	1.70
5	3	1.6233	.14978	.08647	1.2513	1.9954	1.50
7	3	1.8967	.11015	.06360	1.6230	2.1703	1.77
Total	15	2.0587	.42413	.10951	1.8238	2.2935	1.50

ANOVA

MatdoVibrioPL41

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.180	4	.545	16.120	.000
Within Groups	.338	10	.034		
Total	2.518	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
5	3	1.6233		
3	3	1.8633	1.8633	
7	3	1.8967	1.8967	
1	3		2.1733	
0	3			2.7367
Sig.		.113	.077	1.000

Phụ lục 2.3-12- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn *Vibrio* trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 48.

Descriptives

MatdoVibrioPL48

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	3.8133	.42099	.24306	2.7675	4.8591	3.41
1	3	2.8300	.31241	.18037	2.0539	3.6061	2.47
3	3	2.7767	.28572	.16496	2.0669	3.4864	2.45
5	3	2.5667	.31214	.18022	1.7913	3.3421	2.30
7	3	2.6400	.19000	.10970	2.1680	3.1120	2.43
Total	15	2.9253	.53914	.13920	2.6268	3.2239	2.30

ANOVA

MatdoVibrioPL48

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.089	4	.772	7.881	.004
Within Groups	.980	10	.098		
Total	4.069	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
5	3	2.5667	
7	3	2.6400	
3	3	2.7767	
1	3	2.8300	
0	3		3.8133
Sig.		.359	1.000

Phụ lục 2.3-13- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn *Vibrio* trong môi trường nước nuôi tôm giai đoạn post 55.

Descriptives

MatdoVibrioPL55

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	.1233	.02309	.01333	.0660	.1807	.11
1	3	.1167	.02887	.01667	.0450	.1884	.10
3	3	.1033	.00577	.00333	.0890	.1177	.10
5	3	.0900	.01000	.00577	.0652	.1148	.08
7	3	.0900	.01000	.00577	.0652	.1148	.08
Total	15	.1047	.02066	.00533	.0932	.1161	.08

ANOVA

MatdoVibrioPL55

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	4	.001	2.167	.147
Within Groups	.003	10	.000		
Total	.006	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
5	3	.0900
7	3	.0900
3	3	.1033
1	3	.1167
0	3	.1233
Sig.		.062

Phụ lục 2.3-14- Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung đến mật độ tổng số vi khuẩn Vibrio trong môi trường nước nuôi tôm ở các giai đoạn từ post 20-post 55.

Descriptive Statistics

Giai đoạn tôm	Hỗn hợp dịch protein và HA bổ sung (%)	Mean	Std. Deviation	N
20	0	.1367	.03786	3
	1	.1233	.04041	3
	3	.0800	.01000	3
	5	.0600	.01000	3
	7	.0600	.01000	3
	Total	.0920	.03986	15
27	0	.5833	.06028	3
	1	.4633	.05132	3
	3	.3500	.04000	3
	5	.3300	.03464	3
	7	.3233	.03215	3
	Total	.4100	.11065	15
34	0	.7167	.07572	3
	1	.5667	.05859	3
	3	.4267	.05686	3
	5	.3800	.03606	3
	7	.3933	.04509	3
	Total	.4967	.14115	15
41	0	2.7367	.28042	3
	1	2.1733	.18610	3
	3	1.8633	.14572	3
	5	1.6233	.14978	3
	7	1.8967	.11015	3
	Total	2.0587	.42413	15
48	0	3.8133	.42099	3
	1	2.8300	.31241	3
	3	2.7767	.28572	3
	5	2.5667	.31214	3
	7	2.6400	.19000	3
	Total	2.9253	.53914	15
55	0	.1233	.02309	3
	1	.1167	.02887	3
	3	.1033	.00577	3
	5	.0900	.01000	3
	7	.0900	.01000	3
	Total	.1047	.02066	15
Total	0	1.3517	1.46336	18
	1	1.0456	1.09799	18

	3	.9333	1.05847	18
	5	.8417	.96886	18
	7	.9006	1.02953	18
	Total	1.0146	1.12617	90

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	111.496 ^a	29	3.845	167.192	.000
Intercept	92.639	1	92.639	4028.564	.000
GiaidoanTom	105.809	5	21.162	920.257	.000
Honbopbosung	2.954	4	.738	32.110	.000
GiaidoanTom * Honbopbosung	2.733	20	.137	5.942	.000
Error	1.380	60	.023		
Total	205.515	90			
Corrected Total	112.875	89			

a. R Squared = .988 (Adjusted R Squared = .982)

Post Hoc Tests (Duncan Tests-Giai đoạn tôm)

Giai đoạn tôm	N	Subset			
		1	2	3	4
20	15	.0920			
55	15	.1047			
27	15		.4100		
34	15		.4967		
41	15			2.0587	
48	15				2.9253
Sig.		.820	.123	1.000	1.000

Post Hoc Tests (Duncan Tests-Hỗn hợp bổ sung)

Hỗn hợp bổ sung	N	Subset		
		1	2	3
0	18			1.3517
1	18		1.0456	
3	18	.9333		
5	18	.8417		
7	18	.9006		
Sig.		.091	1.000	1.000

Phụ lục 2.3-15- Ảnh hưởng của hỗn hợp bổ sung đến tỷ lệ sống của tôm 55 ngày tuổi ở 5 nghiệm thức

Tỷ lệ hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	98.3333	.96090	.55478	95.9463	100.7203	97.30
1	3	98.4600	.79076	.45654	96.4956	100.4244	97.55
3	3	97.9000	.60000	.34641	96.4095	99.3905	97.30
5	3	97.3000	.72111	.41633	95.5087	99.0913	96.50
7	3	96.8967	.95866	.55348	94.5152	99.2781	95.99
Total	15	97.7780	.92876	.23980	97.2637	98.2923	95.99

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.277	4	10	.886

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.381	4	1.345	2.009	.169
Within Groups	6.695	10	.670		
Total	12.076	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Tỷ lệ hỗn hợp dịch FPH và HA bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
0	3	98.3333
1	3	98.4600
3	3	97.9000
5	3	97.3000
7	3	96.8967
Sig.		.057

Phụ lục 2.3-16- Ảnh hưởng của hỗn hợp bổ sung đến năng suất tôm 55 ngày tuổi ở 5 nghiệm thức

Tỷ lệ hỗn hợp FPH và HA bổ sung (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	2.4500	.06083	.03512	2.2989	2.6011	2.38
1	3	2.7200	.10817	.06245	2.4513	2.9887	2.60
3	3	2.9500	.10000	.05774	2.7016	3.1984	2.85
5	3	3.5233	.07506	.04333	3.3369	3.7098	3.45
7	3	3.4733	.08021	.04631	3.2741	3.6726	3.39
Total	15	3.0233	.44003	.11361	2.7797	3.2670	2.38

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.288	4	10	.879

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.636	4	.659	87.938	.000
Within Groups	.075	10	.007		
Total	2.711	14			

Post Hoc Tests (Duncan Tests)

Tỷ lệ hỗn hợp FPH và HA bổ sung (%)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	2.4500			
1	3		2.7200		
3	3			2.9500	
5	3				3.5233
7	3				3.4733
Sig.		1.000	1.000	1.000	.495

Phụ lục 2.4- Thông kê hiệu quả sử dụng phế liệu cá Tra sau khi phi-lê

STT	Tên/thành phần	Khối lượng (g)	Tỷ lệ (%)	Diễn giải
1	Nguyên liệu cá Tra	10.000	-	
2	Thịt cá Tra phi-lê	3.500	35	Số liệu thu thập thực tế sản xuất tại Công ty Nam Việt – An Giang
3	Phế liệu cá Tra	6.500	65	
4	Hàm lượng protein phế liệu cá Tra	952,90	14,66	Kết quả từ Bảng 3.1 – trang 73 của Luận án.
5	Hàm lượng lipít phế liệu cá Tra	949,00	14,60	
6	Protein bị thủy phân	333,52	35	Trích trang 89 của Luận án.
7	Dịch protein thủy phân	3250	50	
8	Hàm lượng axit amin tổng	182,88	2,81	Kết quả từ Bảng 3.4 & 3.5 – trang 90 & 91 của Luận án,
9	Xương cá Tra khô	455,00	7	
10	Hàm lượng tro tổng và thành phần hóa học	273,00	4,2	- Canxi: 152,33g
				- Phốt pho: 97,19g
11	Hàm lượng Hydroxyapatite	273,00	4,2	Kết quả từ Bảng 3.15 – trang 114 của Luận án.
				- Canxi: 152,33g
12	Sự tăng trưởng khối lượng tôm nuôi thử nghiệm	24,41	23,5	- Phốt pho: 97,19g
				Kết quả từ Bảng 3.15 – trang 114 của Luận án.
				Trích trang VI của Luận án.

PHỤ LỤC 3 - PHỤ LỤC KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

3.1. Thành phần hóa học của phế liệu cá Tra thu nhận từ cỡ nguyên liệu cá 1100-1500 g/con.....	-51-
3.2. Hàm lượng protein và lipít dịch FPH từ phế liệu cá Tra không xử lý tách lipít trước thủy phân bằng alcalase	-52-
3.3. Hàm lượng protein và lipít dịch FPH từ phế liệu cá Tra xử lý tách lipít trước thủy phân bằng alcalase	-53-
3.4. Hàm lượng protein và lipít dịch FPH cô đặc từ phế liệu cá Tra thủy phân bằng alcalase và lipase.....	-54-
3.5. Hàm lượng amino axit của dịch thủy phân prtotein từ phế liệu cá Tra được thủy phân bằng alcalase và lipase.....	-55-
3.6. Sự phân bố khối lượng phân tử của dịch thủy phân prtotein từ phế liệu cá Tra được thủy phân bằng alcalase và lipase.....	-57-
3.7. Kết quả phân tích hàm lượng Canxi trong sản phẩm HA từ xương cá Tra.....	-59-
3.8. Kết quả phân tích hàm lượng Phốt pho trong sản phẩm HA từ xương cá Tra.....	-60-
3.9. Kết quả phân tích hàm lượng Thủy ngân sản phẩm HA từ xương cá Tra.....	-61-
3.10. Kết quả phân tích hàm lượng Cát đi mi sản phẩm HA từ xương cá Tra.....	-62-
3.11. Kết quả phân tích hàm lượng Chì trong sản phẩm HA từ xương cá Tra.....	-63-
3.12. Kết quả phân tích hàm lượng Át sen trong sản phẩm HA từ xương cá Tra....	-64-

3.1. Thành phần hóa học của phế liệu cá Tra từ cỡ nguyên liệu 1100 - 1500 g/con



BM 5.7/1 (20/02/2016)

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

Mã số: 1604028

Tên khách hàng: **PHẠM VIỆT NAM**

Địa chỉ: 140 Lê Trọng Tấn, Phường Sơn Kỳ, Quận Tân Phú, TPHCM.

Tên mẫu: **Phế liệu cá tra**

Tình trạng mẫu: Mẫu dạng xay nhuyễn, bảo quản lạnh

Ngày nhận mẫu: 12/04/2016 Thời gian thử nghiệm: 12-14/04/2016

Ngày hẹn trả kết quả: 14/04/2016

STT	CHỈ TIÊU	ĐƠN VỊ	KẾT QUẢ	PHƯƠNG PHÁP THỬ
01	Hàm lượng chất khô	%	49.69	TCVN 3700:1990
02	Hàm lượng protein	%	13.96	TCVN 3705:1990 (*)
03	Hàm lượng béo tổng	%	18.87	TK.AOAC 948.16 (*)
04	Hàm lượng tro tổng	%	5.87	AOAC 941.12 (*)

Ghi chú (*): chỉ tiêu được VILAS công nhận theo ISO/IEC 17025:2005

Phụ trách PTN

Nguyễn Kim Liễu

GIÁM ĐỐC

Nguyễn Thị Hồng

3.2. Hàm lượng protein và lipit dịch FPH từ phế liệu cá Tra không xử lý tách lipit trước thủy phân bằng alcalase



KHUE NAM
Committed to quality

CÔNG TY TNHH DV KHCN KHUÊ NAM

KHUE NAM TECHNOLOGY SCIENCE SERVICES CO., LTD
PHÒNG THÍ NGHIỆM ĐƯỢC CỤC AN TOÀN THỰC PHẨM
BỘ Y TẾ, BỘ CÔNG THƯƠNG CHỈ ĐỊNH



Số: 2010010/KQKN

Mã số: 2010279-2

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

Tên khách hàng: **TH.S PHẠM VIỆT NAM**

Địa chỉ: 140 Lê Trọng Tấn, Phường Tây Thạnh, Quận Tân Phú, Thành phố Hồ Chí Minh

Tên mẫu: **MẪU 2: DỊCH PROTEIN THỦY PHÂN TỪ PHÉ LIỆU CÁ TRA**

Tình trạng mẫu: Mẫu thành phẩm (dạng lỏng), chứa trong hũ nhựa kín

Ngày nhận mẫu: 27/10/2020 Thời gian thử nghiệm: 27/10 - 30/10/2020

Ngày trả kết quả: 02/11/2020

STT	CHỈ TIÊU	ĐƠN VỊ	KẾT QUẢ	PHƯƠNG PHÁP THỬ
01	Protein (Nx6.25)	%	11.7	TCVN 3705:1990(*)
02	Béo tổng	%	10.8	TCVN 3703:2009(*)

Ghi chú:

(*): Chỉ tiêu được VILAS công nhận theo ISO/IEC 17025:2017

Phụ trách PTN

Nguyễn Kim Liễu



GIÁM ĐỐC

Nguyễn Thị Hồng

- Thông tin về mẫu được ghi theo yêu cầu khách hàng / Information of sample is written as customer's request.
- Không được sao chép kết quả này, 1 phần hay toàn bộ, nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Công ty.
This above result shall not reproduced, partly or fully, unless written approval of company.
- Kết quả phân tích chỉ có giá trị trên mẫu thử / This testing result is only valid on tested sample.

Công ty TNHH Dịch vụ

2/17 Phạm Văn Bạch, Phường 15

E-mail: khuenamts@gmail.com

3.3. Hàm lượng protein và lipit dịch FPH từ phế liệu cá Tra xử lý tách lipit trước thủy phân bằng alcalase



KHUE NAM
Committed to quality

CÔNG TY TNHH DV KHCN KHUÊ NAM
KHUÊ NAM TECHNOLOGY SERVICE CO., LTD
PHÒNG THÍ NGHIỆM ĐƯỢC CẤP AN TOÀN THỰC PHẨM
(BỘ Y TẾ, BỘ CÔNG THƯƠNG CHỈ ĐỊNH)




Số: 2012673/KQKN
Mã số: 2012198

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

Tên khách hàng: TH.S PHẠM VIỆT NAM

Địa chỉ: 140 Lê Trọng Tấn, Phường Tây Thạnh, Quận Tân Phú, Thành phố Hồ Chí Minh

Tên mẫu: DỊCH THỦY PHẦN PHÊ PHẨM CÁ TRA

Tình trạng mẫu: Mẫu thành phẩm, chứa trong hộp kín

Ngày nhận mẫu: 15/12/2020 **Thời gian thử nghiệm:** 15/12 - 18/12/2020

Ngày trả kết quả: 21/12/2020

STT	CHỈ TIÊU	ĐƠN VỊ	KẾT QUẢ	PHƯƠNG PHÁP THỬ
01	Protein (Nx6.25)	%	11.7	TCVN 3705:1990(*)
02	Béo tổng	%	2.17	TCVN 3703:2008(*)

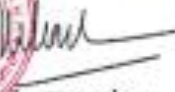
Ghi chú: (*) Chỉ tiêu được VILAS công nhận theo ISO/IEC 17025:2017

Phụ trách PTN



Nguyễn Kim Liễu

GIÁM ĐỐC

Nguyễn Thị Hồng

1. Thông tin về mẫu được ghi theo yêu cầu khách hàng / Information of sample is written as customer's request.

2. Không được sao chép kết quả này. / phần hay toàn bộ, nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Công ty.
This above result shall not reproduced, partly or fully, without written approval of company.

3. Kết quả phân tích chỉ có giá trị trên mẫu thử / This testing result is only valid on tested sample.

Công ty TNHH Dịch vụ
Khoa học Công nghệ Khuê Nam

2/17 Phạm Văn Bạch, Phường 15,
Quận Tân Bình, Tp. HCM

E-mail: khuenam@khuenam.com
Tel: 028.3815 3388 - 3815 8979 Hotline: 090 385 7964

BM 7.5/101/06/2019/CHH/04

www.khuenam.vn

3.4. Hàm lượng protein và lipit dịch FPH cô đặc từ phế liệu cá Tra thủy phân bằng alcalase và lipase.



Số: 2007549A/KQKN
Mã số: 2007097-2

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

Tên khách hàng: **PHẠM VIỆT NAM**

Địa chỉ: 188/35A Tân Kỳ Tân Quý, Sơn Kỳ, Tân Phú, Thành phố Hồ Chí Minh

Tên mẫu: **MẪU 2: DỊCH THỦY PHÂN PROTEIN PHẾ LIỆU CÁ TRA**

Tình trạng mẫu: Mẫu thành phẩm, chứa trong hũ kín có nhãn

Ngày nhận mẫu: 09/07/2020 Thời gian thử nghiệm: 09/07 - 14/07/2020

Ngày trả kết quả: 15/07/2020

STT	CHỈ TIÊU	ĐƠN VỊ	KẾT QUẢ	PHƯƠNG PHÁP THỬ
01	Béo tổng	%	1.93	TCVN 3703:2009(*)
02	Protein	%	33.2	TCVN 3705:1990(*)

Ghi chú:

(*): Chỉ tiêu được VILAS công nhận theo ISO/IEC 17025:2017

Phụ trách PTN

Nguyễn Kim Liễu

GIÁM ĐỐC

Nguyễn Thị Hồng

- Thông tin về mẫu được ghi theo yêu cầu khách hàng / Information of sample is written as customer's request.
- Không được sao chép kết quả này, 1 phần hay toàn bộ, nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Công ty.
This above result shall not reproduced, partly or fully, unless written approval of company.
- Kết quả phân tích chỉ có giá trị trên mẫu thử / This testing result is only valid on tested sample.

Công ty TNHH Dịch vụ

2/17 Phạm Văn Bạch, Phường 15

E-mail: khuenamts@gmail.com

3.5. Hàm lượng amino axit của dịch thủy phân protein từ phế liệu cá Tra được thủy phân bằng alcalase và lipase.



Đại Học Quốc Gia Thành Phố Hồ Chí Minh
Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên
Phòng Thí Nghiệm Phân Tích Trung Tâm
227 Nguyễn Văn Cừ, F.4, Q.5, TpHCM



BẢN KẾT QUẢ

Người gửi mẫu: **ThS. Phạm Viết Nam**

Cơ quan: **Trường ĐH Công nghiệp Thực phẩm TP Hồ Chí Minh**

Mô tả mẫu: **Dịch thủy phân từ phế liệu cá tra, màu vàng nâu, chứa trong chai nhựa**

Yêu cầu/Chi tiêu phân tích: **Amino acids tự do**

Kết quả phân tích

TT	Amino acids	ĐƠN VỊ	KẾT QUẢ	PHƯƠNG PHÁP
			Mẫu 3	
1	Taurine	mg g ⁻¹	0.378	HPLC-UV (phương pháp nội bộ)
2	Asparagine		0.397	
3	Glutamine		nd	
4	Arginine		1.290	
5	Citruline		0.145	
6	Serine		0.391	
7	Aspartic acid		0.563	
8	Glutamic acid		0.782	
9	Hydroxyproline		0.025	
10	Glycine		0.290	
11	Threonine		0.512	
12	β-Alanine		0.038	
13	α-Alanine		1.270	
14	Aminobutyric acid		0.028	
15	Cysteine		0.203	
16	Proline		0.122	
17	Methionine		0.559	
18	Valine		0.963	
19	Phenylalanine		1.117	



Cảm ơn quý khách hàng đã quan tâm đến dịch vụ của chúng tôi

20	Isoleucine		0.676	
21	Leucine		1.592	
22	Ornithine		0.057	
23	Lysine		0.498	
24	Histidine		0.145	
25	Tyrosine		0.006	
26	Tryptophan		0.128	
	Tổng	mg g⁻¹	12.174	

Ghi chú:

1. Mẫu sau khi đồng nhất được chiết với HCl 0.1M và loại tạp, sau đó được tạo dẫn xuất trước cột và phân tích bằng phương pháp HPLC-UV tại bước sóng $\lambda = 250$ nm
2. **nd**: không phát hiện
3. Kết quả phân tích có giá trị trên mẫu.

Tp.HCM, ngày 16 tháng 10 năm 2020
Người phân tích

Nguyễn Khánh Hưng



Cảm ơn quý khách hàng đã quan tâm đến dịch vụ của chúng tôi

3.6. Sự phân bố khối lượng phân tử của dịch thủy phân prtein từ phế liệu cá Tra được thủy phân bằng alcalase và lipase.



Đại Học Quốc Gia Thành Phố Hồ Chí Minh
Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên
Phòng Thí Nghiệm Phân Tích Trung Tâm
227 Nguyễn Văn Cừ, F.4, Q.5, TpHCM



CLA
CENTRAL LABORATORY FOR ANALYSIS

BẢN KẾT QUẢ

Người gửi mẫu: ThS. Phạm Việt Nam
 Cơ quan: Khoa Thủy sản, Trường ĐH Công nghiệp Thực phẩm T.p Hồ Chí Minh
 Mô tả mẫu: Dịch thủy phân từ phế liệu cá tra, màu vàng nâu, chứa trong chai nhựa
 Chỉ tiêu phân tích: GPC

Kết quả phân tích

TT	TÊN MẪU	KẾT QUẢ			PHƯƠNG PHÁP
1	Mẫu 2	M_n	3.8778e2	g/mol	GPC-RID (Lưu hành nội bộ)
		M_w	6.9143e2	g/mol	
		M_z	1.2654e3	g/mol	
		M_v	0.0000	g/mol	
		D	1.7830e0		
		[n]	0.0000	mL/g	
		Vp	8.9063e0	mL	
		Mp	4.5016e2	g/mol	
		A	2.0514e4	mL*V	
		10%	1.8749e2	g/mol	
		30%	3.1499e2	g/mol	
		50%	4.8646e2	g/mol	
		70%	7.6330e2	g/mol	
		90%	1.4518e3	g/mol	

Ghi chú và diễn giải:

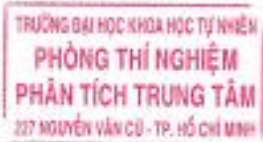
- Mẫu được chiết với TFA và làm sạch bằng dung môi thích hợp. Sau đó phân tích trên thiết bị GPC-RID.
- Kết quả có giá trị trên mẫu

Tp.HCM, Ngày 23 tháng 10 năm 2020

Người phân tích



Nguyễn Khánh Hưng

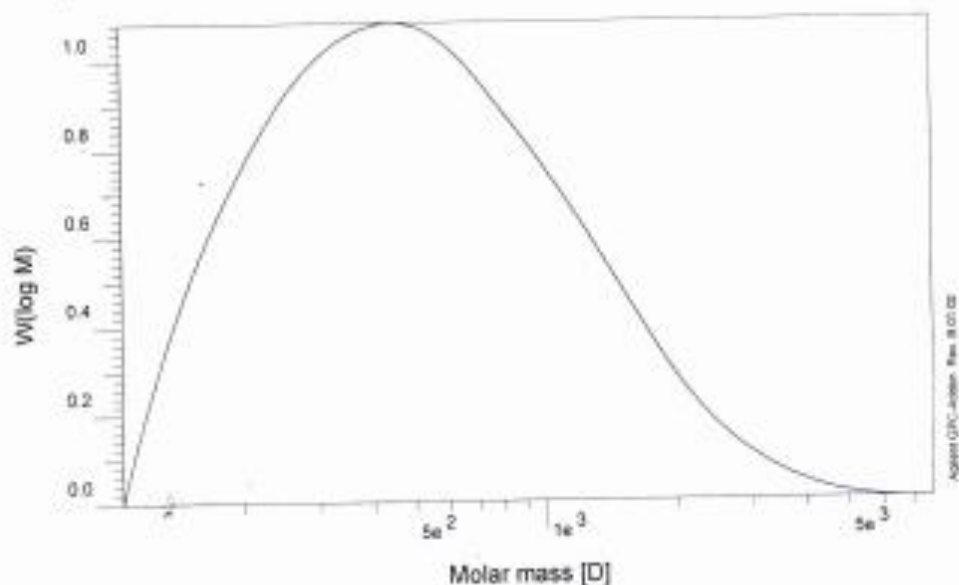




Cảm ơn quý khách hàng đã quan tâm đến dịch vụ của chúng tôi

Sample : MTTT
 Injection Date : 28-Oct-20, 20:03:06
 Calibration File : C:\Chem32\GPC\calib\250 U LINEAR.CAL
 Calibration Date : Monday 10/26/20 18:42:00
 Baseline from : 7.124 min
 Integration from : 7.124 min
 MHK - A (Cal): 0.000000E+0
 Eluent :
 Concentration : 1.000 g/l
 Detector 1 : RID A, Refractive Index Signal
 Operator : PTTT

Baseline to : 9.817 min
 Integration to : 9.817 min
 MHK - K (Cal): 1.000000E+0 mg
 Flowrate : 1.000 ml/min
 Inject volume : 20.000 μ l
 Delay volume : 0.020 ml
 Acquisition interval : 0.430 sec



HỌC TẬP NHẬN
 NGHIỆM
 ỨNG DỤNG
 P. HỒ CHÁNH

dd1A
 Mn : 3.8778e2 g/mol
 Mw : 6.9143e2 g/mol
 Mz : 1.2654e3 g/mol
 Nv : 0.000000 g/mol
 D : 1.7830e0
 [n] : 0.000000 ml/g
 Vp : 8.9063e0 ml
 Mo : 4.5015e2 g/mol
 A : 2.0514e4 m²/V
 10% : 1.8749e2 g/mol
 30% : 3.1499e2 g/mol
 50% : 4.8454e2 g/mol
 70% : 7.6330e2 g/mol
 90% : 1.4518e3 g/mol

Data File : C:\CHEM32\1\DATA\PRO-GPC\281020TP000008.D
 Print Date : Wednesday 10/28/20 20:56:08

Sign :

Page 1 of 1

3.7. Kết quả phân tích hàm lượng Canxi trong sản phẩm HA từ xương cá Tra.

CỤC THÚ Y TRUNG TÂM KIỂM TRA VỆ SINH THÚ Y TRUNG ƯƠNG II NATIONAL CENTER FOR VETERINARY HYGIENE INSPECTION II   							
Mã hồ sơ: TD-01 Số: MMYXXXXX			PHIẾU KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM			Ngày: 19/03/2018 Số Trang: 1/ 1	
1. Tên mẫu – Mã số phân tích : HA cá Tra 2. Số lượng mẫu : 01 3. Mô tả mẫu : Bột khoáng 4. Ngày nhận mẫu : 15/03/2018 5. Thời gian thử nghiệm : 19/03/2018 6. Tên và địa chỉ khách hàng : Phạm Viết Nam 7. Kết quả thử nghiệm : Canxi							
TT	Tên mẫu	Tên phép thử	Đơn vị tính	Phương pháp thử	Kết quả thô	MLOD	Kết quả
1	HA xương cá Tra	Canxi	mg/Kg	AOAC 2015.01 ICP-MS 7700	327654,14	0,02	327654,14
<i><u>Ghi chú:</u> Thời gian lưu mẫu 14 ngày kể từ ngày trả kết quả.</i> <i>KPH: Không phát hiện. LOD: Giới hạn phát hiện.</i> <i>(*): chỉ tiêu được VILAS công nhận.</i> <i>(Δ): chỉ tiêu nhà thầu phụ thực hiện.</i> GIÁM ĐỐC							
TRUNG TÂM KIỂM TRA VỆ SINH THÚ Y TRUNG ƯƠNG II 521/1 Hoàng Văn Thụ, P. 4, Q. Tân Bình, Tp. HCM Điện thoại: (84-8) 38111802 Fax: (84-8) 38119770 Email: vstytw2@gmail.com							

3.8. Kết quả phân tích hàm lượng Phốt pho trong sản phẩm HA từ xương cá Tra.

CỤC THÚ Y TRUNG TÂM KIỂM TRA VỆ SINH THÚ Y TRUNG ƯƠNG II NATIONAL CENTER FOR VETERINARY HYGIENE INSPECTION II   																				
Mã hồ sơ: TD-01 Số: MMYXXXXX		PHIẾU KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM			Ngày: 19/03/2018 Số Trang: 1/ 1															
1. Tên mẫu – Mã số phân tích : HA cá Tra 2. Số lượng mẫu : 01 3. Mô tả mẫu : Bột khoáng 4. Ngày nhận mẫu : 15/03/2018 5. Thời gian thử nghiệm : 19/03/2018 6. Tên và địa chỉ khách hàng : Phạm Viết Nam 7. Kết quả thử nghiệm : Photpho																				
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="padding: 5px;">Tên mẫu</th> <th style="padding: 5px;">Tên phép thử</th> <th style="padding: 5px;">Đơn vị tính</th> <th style="padding: 5px;">Phương pháp thử</th> <th style="padding: 5px;">Kết quả thô</th> <th style="padding: 5px;">MLOD</th> <th style="padding: 5px;">Kết quả</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 5px;">HA xương cá Tra</td> <td style="padding: 5px;">Photpho</td> <td style="padding: 5px;">mg/Kg</td> <td style="padding: 5px;">AOAC 2015.01 ICP-MS 7700</td> <td style="padding: 5px;">141968,46</td> <td style="padding: 5px;">0,02</td> <td style="padding: 5px;">141968,46</td> </tr> </tbody> </table>							Tên mẫu	Tên phép thử	Đơn vị tính	Phương pháp thử	Kết quả thô	MLOD	Kết quả	HA xương cá Tra	Photpho	mg/Kg	AOAC 2015.01 ICP-MS 7700	141968,46	0,02	141968,46
Tên mẫu	Tên phép thử	Đơn vị tính	Phương pháp thử	Kết quả thô	MLOD	Kết quả														
HA xương cá Tra	Photpho	mg/Kg	AOAC 2015.01 ICP-MS 7700	141968,46	0,02	141968,46														
<i>Ghi chú: Thời gian lưu mẫu 14 ngày kể từ ngày trả kết quả.</i> <i>KPH: Không phát hiện. LOD: Giới hạn phát hiện.</i> <i>(*) : chỉ tiêu được VILAS công nhận.</i> <i>(Δ) : chỉ tiêu nhà thầu phụ thực hiện.</i> GIÁM ĐỐC																				
TRUNG TÂM KIỂM TRA VỆ SINH THÚ Y TRUNG ƯƠNG II 521/1 Hoàng Văn Thụ, P. 4, Q. Tân Bình, Tp. HCM Điện thoại: (84-8) 38111802 Fax: (84-8) 38119770 Email: vstytw2@gmail.com																				

3.9. Kết quả phân tích hàm lượng Thủy ngân trong sản phẩm HA từ xương cá Tra.

CỤC THÚ Y TRUNG TÂM KIỂM TRA VỆ SINH THÚ Y TRUNG ƯƠNG II NATIONAL CENTER FOR VETERINARY HYGIENE INSPECTION II   						
Mã hồ sơ: TD-01 Số: MMYXXXXX		PHIẾU KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM			Ngày: 19/03/2018 Số trang: 1/ 1	
1. Tên mẫu – Mã số phân tích 2. Số lượng mẫu 3. Mô tả mẫu 4. Ngày nhận mẫu 5. Thời gian thử nghiệm 6. Tên và địa chỉ khách hàng 7. Kết quả thử nghiệm : HA cá Tra : 01 : Bột khoáng : 15/03/2018 : 19/03/2018 : Phạm Viết Nam : Thủy ngân						
Tên mẫu	Tên phép thử	Đơn vị tính	Phương pháp thử	Kết quả thô	MLO D	Kết quả
HA xương cá Tra	Thủy ngân	µg/Kg	AOAC 2015.01 ICP-MS 7700	0,00	20,00	KPH
<i>Ghi chú:</i> Thời gian lưu mẫu 14 ngày kể từ ngày trả kết quả. KPH: Không phát hiện. LOD: Giới hạn phát hiện. (*): chỉ tiêu được VILAS công nhận. (Δ): chỉ tiêu nhà thầu phụ thực hiện. GIÁM ĐỐC						
1. Các kết quả thử nghiệm ghi trong phiếu này chỉ có giá trị đối với mẫu đã mã hóa như trên. 2. Không được trích sao một phần phiếu kết quả thử nghiệm này nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Giám đốc Trung tâm. 3. Tên mẫu, tên khách hàng được ghi theo yêu cầu của nơi gửi mẫu.						
TRUNG TÂM KIỂM TRA VỆ SINH THÚ Y TRUNG ƯƠNG II Q. Tân Bình, Tp. HCM Điện thoại: (84-8) 38111802 Email: vstytw2@gmail.com				521/1 Hoàng Văn Thụ, P. 4, Fax: (84-8) 38119770		

3.10. Kết quả phân tích hàm lượng Các đi mi trong sản phẩm HA từ xương cá Tra.

CỤC THÚ Y TRUNG TÂM KIỂM TRA VỆ SINH THÚ Y TRUNG ƯƠNG II NATIONAL CENTER FOR VETERINARY HYGIENE INSPECTION II   																				
Mã hồ sơ: TD-01 Số: MMYXXXXX		PHIẾU KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM			Ngày: 19/03/2018 Số trang: 1/ 1															
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%;">1. Tên mẫu – Mã số phân tích</td> <td>: HA cá Tra</td> </tr> <tr> <td>2. Số lượng mẫu</td> <td>: 01</td> </tr> <tr> <td>3. Mô tả mẫu</td> <td>: Bột khoáng</td> </tr> <tr> <td>4. Ngày nhận mẫu</td> <td>: 15/03/2018</td> </tr> <tr> <td>5. Thời gian thử nghiệm</td> <td>: 19/03/2018</td> </tr> <tr> <td>6. Tên và địa chỉ khách hàng</td> <td>: Phạm Viết Nam</td> </tr> <tr> <td>7. Kết quả thử nghiệm</td> <td>: Cadimi</td> </tr> </table>							1. Tên mẫu – Mã số phân tích	: HA cá Tra	2. Số lượng mẫu	: 01	3. Mô tả mẫu	: Bột khoáng	4. Ngày nhận mẫu	: 15/03/2018	5. Thời gian thử nghiệm	: 19/03/2018	6. Tên và địa chỉ khách hàng	: Phạm Viết Nam	7. Kết quả thử nghiệm	: Cadimi
1. Tên mẫu – Mã số phân tích	: HA cá Tra																			
2. Số lượng mẫu	: 01																			
3. Mô tả mẫu	: Bột khoáng																			
4. Ngày nhận mẫu	: 15/03/2018																			
5. Thời gian thử nghiệm	: 19/03/2018																			
6. Tên và địa chỉ khách hàng	: Phạm Viết Nam																			
7. Kết quả thử nghiệm	: Cadimi																			
Tên mẫu	Tên phép thử	Đơn vị tính	Phương pháp thử	Kết quả thô	MLOD	Kết quả														
HA xương cá Tra	Cadimi	µg/Kg	AOAC 2015.01 ICP-MS 7700	2,04	10,00	KPH														
<u>Ghi chú:</u> Thời gian lưu mẫu 14 ngày kể từ ngày trả kết quả. KPH: Không phát hiện. LOD: Giới hạn phát hiện. (*): chỉ tiêu được VILAS công nhận. (Δ): chỉ tiêu nhà thầu phụ thực hiện. GIÁM ĐỐC																				
8. Các kết quả thử nghiệm ghi trong phiếu này chỉ có giá trị đối với mẫu đã mã hóa như trên. 9. Không được trích sao một phần phiếu kết quả thử nghiệm này nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Giám đốc Trung tâm. 10. Tên mẫu, tên khách hàng được ghi theo yêu cầu của nơi gửi mẫu.																				
TRUNG TÂM KIỂM TRA VỆ SINH THÚ Y TRUNG ƯƠNG II Q. Tân Bình, Tp. HCM Điện thoại: (84-8) 38111802 Email: vstytw2@gmail.com				521/1 Hoàng Văn Thụ, P. 4, Fax: (84-8) 38119770																

3.11. Kết quả phân tích hàm lượng Chì trong sản phẩm HA từ xương cá Tra.

CỤC THÚ Y TRUNG TÂM KIỂM TRA VỆ SINH THÚ Y TRUNG ƯƠNG II NATIONAL CENTER FOR VETERINARY HYGIENE INSPECTION II   VILAS 514																				
Mã hồ sơ: TD-01 Số: MMYXXXXX		PHIẾU KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM			Ngày: 19/03/2018 Số trang: 1/ 1															
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 45%;">1. Tên mẫu – Mã số phân tích</td> <td style="width: 55%;">: HA cá Tra</td> </tr> <tr> <td>2. Số lượng mẫu</td> <td>: 01</td> </tr> <tr> <td>3. Mô tả mẫu</td> <td>: Bột khoáng</td> </tr> <tr> <td>4. Ngày nhận mẫu</td> <td>: 15/03/2018</td> </tr> <tr> <td>5. Thời gian thử nghiệm</td> <td>: 19/03/2018</td> </tr> <tr> <td>6. Tên và địa chỉ khách hàng</td> <td>: Phạm Viết Nam</td> </tr> <tr> <td>7. Kết quả thử nghiệm</td> <td>: Chì</td> </tr> </table>							1. Tên mẫu – Mã số phân tích	: HA cá Tra	2. Số lượng mẫu	: 01	3. Mô tả mẫu	: Bột khoáng	4. Ngày nhận mẫu	: 15/03/2018	5. Thời gian thử nghiệm	: 19/03/2018	6. Tên và địa chỉ khách hàng	: Phạm Viết Nam	7. Kết quả thử nghiệm	: Chì
1. Tên mẫu – Mã số phân tích	: HA cá Tra																			
2. Số lượng mẫu	: 01																			
3. Mô tả mẫu	: Bột khoáng																			
4. Ngày nhận mẫu	: 15/03/2018																			
5. Thời gian thử nghiệm	: 19/03/2018																			
6. Tên và địa chỉ khách hàng	: Phạm Viết Nam																			
7. Kết quả thử nghiệm	: Chì																			
Tên mẫu	Tên phép thử	Đơn vị tính	Phương pháp thử	Kết quả thô	MLOD	Kết quả														
HA cá Tra	Chì	µg/Kg	AOAC 2015.01 ICP-MS 7700	0,00	20,00	KPH														
<u>Ghi chú:</u> Thời gian lưu mẫu 14 ngày kể từ ngày trả kết quả. KPH: Không phát hiện. LOD: Giới hạn phát hiện. (*): chỉ tiêu được VILAS công nhận. (Δ): chỉ tiêu nhà thầu phụ thực hiện. GIÁM ĐỐC																				
4. Các kết quả thử nghiệm ghi trong phiếu này chỉ có giá trị đối với mẫu đã mã hóa như trên. 5. Không được trích sao một phần phiếu kết quả thử nghiệm này nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Giám đốc Trung tâm. 6. Tên mẫu, tên khách hàng được ghi theo yêu cầu của nơi gửi mẫu.																				
TRUNG TÂM KIỂM TRA VỆ SINH THÚ Y TRUNG ƯƠNG II Q. Tân Bình, Tp. HCM Điện thoại: (84-8) 38111802 Email: vstytw2@gmail.com				521/1 Hoàng Văn Thụ, P. 4, Fax: (84-8) 38119770																

3.12. Kết quả phân tích hàm lượng Át sen trong sản phẩm HA từ xương cá Tra.

CỤC THÚ Y TRUNG TÂM KIỂM TRA VỆ SINH THÚ Y TRUNG ƯƠNG II NATIONAL CENTER FOR VETERINARY HYGIENE INSPECTION II   VILAS 514																				
Mã hồ sơ: TD-01 Số: MMYXXXXX		PHIẾU KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM			Ngày: 19/03/2018 Số trang: 1/ 1															
1. Tên mẫu – Mã số phân tích 2. Số lượng mẫu 3. Mô tả mẫu 4. Ngày nhận mẫu 5. Thời gian thử nghiệm 6. Tên và địa chỉ khách hàng 7. Kết quả thử nghiệm : HA cá Tra : 01 : Bột khoáng : 15/03/2018 : 19/03/2018 : Phạm Viết Nam : Asen																				
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">Tên mẫu</th> <th style="width: 10%;">Tên phép thử</th> <th style="width: 10%;">Đơn vị tính</th> <th style="width: 20%;">Phương pháp thử</th> <th style="width: 10%;">Kết quả thô</th> <th style="width: 10%;">MLOD</th> <th style="width: 15%;">Kết quả</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HA cá Tra</td> <td>Asen</td> <td>µg/Kg</td> <td>AOAC 2015.01 ICP-MS 7700</td> <td>34,60</td> <td>15,00</td> <td>34,60</td> </tr> </tbody> </table>							Tên mẫu	Tên phép thử	Đơn vị tính	Phương pháp thử	Kết quả thô	MLOD	Kết quả	HA cá Tra	Asen	µg/Kg	AOAC 2015.01 ICP-MS 7700	34,60	15,00	34,60
Tên mẫu	Tên phép thử	Đơn vị tính	Phương pháp thử	Kết quả thô	MLOD	Kết quả														
HA cá Tra	Asen	µg/Kg	AOAC 2015.01 ICP-MS 7700	34,60	15,00	34,60														
<i>Ghi chú:</i> Thời gian lưu mẫu 14 ngày kể từ ngày trả kết quả. KPH: Không phát hiện. LOD: Giới hạn phát hiện. (*): chỉ tiêu được VILAS công nhận. (Δ): chỉ tiêu nhà thầu phụ thực hiện.																				
GIÁM ĐỐC																				
7. Các kết quả thử nghiệm ghi trong phiếu này chỉ có giá trị đối với mẫu đã mã hóa như trên. 8. Không được trích sao một phần phiếu kết quả thử nghiệm này nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Giám đốc Trung tâm. 9. Tên mẫu, tên khách hàng được ghi theo yêu cầu của nơi gửi mẫu. 521/1 Hoàng Văn Thụ, P. 4, Q. Tân Bình, Tp. HCM Điện thoại: (84-8) 38111802 Email: vstytw2@gmail.com																				