

**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**

Ngành đào tạo: Công nghệ Chế biến Thủy sản

Mã số: 9540105

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

KHÁNH HOÀ – 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**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

**NGÀNH ĐÀO TẠO: CÔNG NGHỆ CHẾ BIẾN
THỦY SẢN**

MÃ SỐ : 9540105

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

PGS.TS Trang Sỹ Trung

PGS.TS. Nguyễn Văn Hòa

KHÁNH HÒA - 2021

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
Nd	Not detected	Không phát hiện
JCPDS 09-0432		Ký hiệu mẫu HA chuẩn
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.

Nghiên cứu sinh: Phạm Việt Nam **Khóa:** 2015 - 2019

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, lipit 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 lipit tổng 10,8%. Khi sử dụng enzyme alcalase và lipase, sản phẩm dịch thủy phân thu nhận có hàm lượng đạm tổng 33,2%, hàm lượng lipit 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

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết

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 và 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 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, lipit,..... 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. Do đó, việc nghiên cứu thu nhận các hợp chất có giá trị gia tăng từ phế liệu cá Tra là rất cần thiết.

Gần đây, 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 lipit từ phần hữa cơ của phế liệu cá mà bỏ qua phần khoáng chất (chủ yếu hydroxyapatite, HA) từ phần xương cá. Ngược lại, một số tác giả chỉ thu nhận HA từ xương cá, bỏ qua phần protein và lipit 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.

Ở nước ta, lượng 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... Nguồn phế liệu này chủ yếu làm nguyên liệu cho các Nhà máy sản xuất bột cá và được dùng làm thức ăn chăn nuôi có giá trị kinh tế thấp, chất lượng dinh dưỡng không cao. Do đó, việc nghiên cứu quy trình phù hợp để thu nhận các sản phẩm có giá trị cao từ toàn bộ phần phụ phẩm còn lại của cá Tra, đồng thời thử nghiệm ứng dụng các sản phẩm thu nhận được trong lĩnh vực nông nghiệp tại Việt Nam là rất cần thiết.

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, lipit 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.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Xây dựng được quy trình thu nhận dịch protein thủy phân và hydroxyapatite từ phế liệu cá Tra sau phi-lê.

- Bước đầu ứng dụng thử nghiệm bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy phân và hydroxyapatite vào thức ăn tôm giai đoạn 20 – 55 ngày tuổi.

3. Phạm vi và nội dung nghiên cứu

Luận án tập trung nghiên cứu, đánh giá, làm rõ các nội dung:

- Xác định thành phần hóa học, thành phần khối lượng của phế liệu cá Tra.

- 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.

- 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.

- 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.

4. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của luận án là phế liệu cá Tra (*Pangasius hypophthalmus*) được thu gom từ nguyên liệu cá Tra kích cỡ 1,2 – 1,5 kg/con trên dây chuyền chế biến cá Tra phi-lê đông lạnh của Công ty chế biến Thủy sản Nam Việt, tỉnh An Giang.

5. Ý nghĩa khoa học, thực tiễn và tính mới của luận án

- 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.

- Luận án đã xây dựng được quy trình thu nhận các sản phẩm giá trị gia tăng gồm dịch protein thủy phân, hydroxyapatite, lipit thô từ phế liệu cá Tra. 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”.

- Luận án đã xác định được điều kiện thủy phân phế liệu cá Tra để thu nhận dịch protein sử dụng enzyme alcalase và lipase.

- Luận án đã xác định được điều kiện thu nhận hydroxyapatite (HA) kích thước nanomet từ xương cá bằng phương pháp xử lý nhiệt. Luận án cũng đã so sánh tính chất của HA thu được từ xương cá Tra so với một số sản phẩm HA thu được từ các xương cá khác.

- Luận án đã đánh giá thành phần hóa học, khối lượng phân tử, thành phần axit amin và axit béo của dịch protein thủy phân thu được. Kết quả nghiên cứu sẽ là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu về ứng dụng của dịch protein thủy phân này.

- 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.

6. Kết cấu của Luận án

Luận án gồm 227 trang với 130 trang nội dung, 165 tài liệu tham khảo và 59 trang phụ lục. Nội dung luận án được trình bày trong 3 chương với 31 bảng biểu và 55 hình ảnh, đồ thị, sơ đồ, qui trình.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Phế liệu cá Tra

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 (đầu, da, xương, vây, nội tạng, máu, mỡ, thịt vụn cá) chiếm khoảng 60% so với nguyên liệu cá. 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.

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 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 thủy phân protein, 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.

1.2. Dịch protein thủy phân

Dịch protein thủy phân là sản phẩm của quá trình thủy phân protein. Thành phần chủ yếu của dịch protein thủy phân là các axit amin, các peptit với chiều dài mạch khác nhau. Ngoài ra, trong dịch protein thủy phân còn chứa một lượng nhỏ khoáng và lipid. 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.

Để thu hồi dịch protein thủy phân từ phế liệu cá đã có nhiều tác giả sử dụng các tác nhân thủy phân là các 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.

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.

Bổ sung enzyme từ bên ngoài vào để tăng tốc độ thủy phân, rút ngắn thời gian thủy phân, tăng năng suất thủy phân và đạt được mục đích công nghệ mong muốn là một phương pháp thủy phân rất hiện đại,

phổ biến và đang được áp dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực. Để thủy phân cơ thịt cá cắt mạch polypeptit tạo thành sản phẩm peptit, axit amin có thể sử dụng hệ enzyme protease với các loại enzyme khác nhau tùy thuộc vào cơ chất và mục đích của quá trình thủy phân.

Nhìn chung, các nghiên cứu này chỉ mới sử dụng một loại enzyme, hoặc kết hợp hỗn hợp enzyme như alcalase, flavourzyme, protamex để nghiên cứu bước đầu và tập trung để nghiên cứu tìm ra chế độ tối ưu để sản xuất dịch thủy phân ở một số loại cá, phụ phẩm có tại Việt Nam, chưa nghiên cứu ứng dụng của dịch thủy phân và phát triển thành quy mô công nghiệp, chưa đánh giá đầy đủ chất lượng dịch protein thu nhận. 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.

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

1.3.1. Tính chất của HA

Canxi hydroxyapatite (hay còn được gọi là hydroxyapatite, HA) có công thức phân tử là $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ hoặc $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Trong cơ thể người và động vật, HA là thành phần chính của xương (chiếm đến 65 – 70% khối lượng) và răng (chiếm 99%). HA được nghiên cứu rộng rãi do có các tính chất quý giá như: hoạt tính và khả năng tương thích sinh học cao với tế bào và mô, tạo liên kết trực tiếp với xương non dẫn đến sự tái sinh xương nhanh mà không bị cơ thể đào thải. Mặt khác, HA là dạng canxi photphat dễ hấp thu nhất đối với cơ thể con người với tỷ lệ Ca/P 1,67 đúng như tỷ lệ trong xương và răng người. HA có màu trắng, trắng ngà, vàng nhạt hoặc xanh lơ, tùy theo điều kiện hình thành, kích thước hạt và cấu trúc phân tử. Cấu trúc ô mạng cơ sở của tinh thể HA gồm các ion Ca^{2+} , PO_4^{3-} và OH^- .

1.3.2. Ứng dụng của hydroxyapatite

Trong nhiều thập kỷ qua, việc nghiên cứu tổng hợp HA đã được các nhà khoa học vật liệu quan tâm do tính tương thích sinh học tuyệt vời với tế bào động vật, tương tác tốt với các polyme sinh học và có khả năng tương thích với xương tốt. HA đã được chứng minh là có thể thúc đẩy sự phát triển của xương mới mà không gây ra độc tính cục bộ hoặc toàn thân, viêm hoặc dị ứng. Khi cấy ghép vật liệu gồm chứa HA vào cơ thể, một lớp mô mới được hình thành trên bề mặt và góp phần vào sự

liên kết của các mô cấy vào xương, dẫn đến định hình vượt trội mô cấy đến các mô xung quanh. Hơn nữa, một số nghiên cứu cho thấy 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.

Hiện nay, HA đang được nghiên cứu là vật liệu cho các ứng dụng y sinh học khác nhau như: thay thế cho xương và các khuyết tật của răng, răng giả, cấy ghép xương, kỹ thuật mô, tác nhân truyền dẫn thuốc, tác nhân điều trị bệnh loãng xương, vật liệu nha khoa và lớp phủ hoạt tính sinh học lên miếng cấy ghép xương bằng kim loại. Ngoài lĩnh vực dược học và y sinh học, vật liệu xử lý nước ô nhiễm kim loại nặng, thuốc nhuộm.

1.3.3. Phương pháp điều chế HA

Đã có rất nhiều phương pháp tổng hợp HA được phát triển. Nhìn chung, có thể phân loại thành 2 nhóm phương pháp: (i) phương pháp tổng hợp bằng hóa học từ các muối vô cơ có chứa ion Ca^{2+} và PO_4^{3-} , (ii) phương pháp thu nhận từ các 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. Trong hầu hết các nghiên cứu này, phế liệu cá sau khi đưa về phòng thí nghiệm được đun sôi loại bỏ tạp chất, phần thịt thừa, lipid sau đó đem sấy khô sẽ thu được xương cá thô. 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.

1.4. Thức ăn cho tôm hậu ấu trùng

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. Trong đó, 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.

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, thức ăn tự nhiên và thức ăn tự chế.

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, vitamin C, E, dầu mực. Thành phần dinh dưỡng và bổ sung dinh dưỡng vào thức ăn tôm bao gồm: protein, lipid, khoáng, carbohydrat, vitamin...

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 gom từ nguyên liệu cá Tra kích cỡ 1,2 – 1,5 kg/con trên dây chuyền chế biến cá Tra phi-lê đông lạnh của Công ty Chế biến Thủy sản Nam Việt, tỉnh An Giang. Phế liệu cá tươi (đầu cá, nội tạng, vây, xương, da, 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 ở nhiệt độ -18°C, trước khi sử dụng cho quá trình thí nghiệm.

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. 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 acid béo và glycerol của cơ chất triacylglycerol.

2.1.3. Tôm thẻ chân trắng

Tôm thẻ chân trắng (12 ngày tuổi, post 12) được mua chọn lọc tại Công ty Giống Thủy sản – Ninh Hòa, Khánh Hòa, tôm được kiểm tra sạch 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 được nuôi chăm sóc tại Trung tâm nghiên cứu giống và dịch bệnh, Trường Đại học Nha Trang trong 8 ngày đạt chiều dài $39,45 \pm 0,42$ mm, khối lượng $0,29 \pm 0,02$ 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.

2.1.4. Hóa chất dùng trong nghiên cứu

Tất cả hóa chất dùng trong 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

Sơ đồ phương pháp tiếp cận các vấn đề nghiên cứu được trình bày ở Hình 2.1

- *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 phần 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 xử lý gồm: (i) nấu chín và ép, (ii) không tách lipít.

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

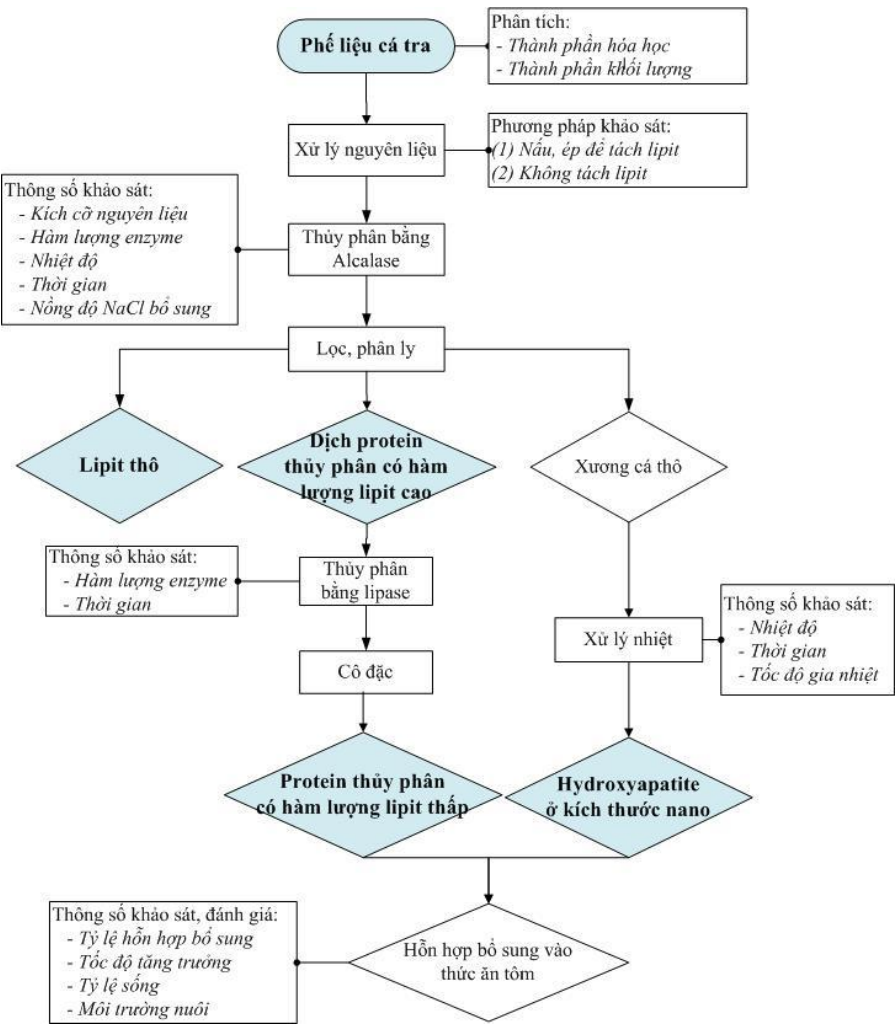
- *Nghiên cứu giảm hàm lượng lipít có trong dịch protein thủy phân từ phế liệu cá Tra bằng enzyme lipase*: Sử dụng lipase để tiếp tục thủy phân phần dịch lỏng thu được từ phế liệu cá Tra bằng alcalase để thu nhận dịch protein thủy phân có hàm lượng lipít thấp nhằm sử dụng làm nguồn bổ sung vào thức ăn 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.

- *Nghiên cứu quy trình sản xuất hydroxyapatite kích thước nano từ phần xương cá thô*: tiến xử lý phế liệu để thu nhận xương cá Tra thô. 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.

- *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.

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



Hình 2.1. Sơ đồ phương pháp tiếp cận các vấn đề nghiên cứu của Luận án.

2.3. Phương pháp phân tích, đánh giá nguyên liệu và sản phẩm

2.3.1. Phân tích thành phần hóa học cơ bản của phế liệu

Phế liệu cá Tra được xác định hàm lượng protein thô được xác định bằng phương pháp Kjeldahl. Hàm lượng tro và ẩm được xác định theo phương pháp chuẩn của AOAC. Hàm lượng lipit thô được phân tích bằng phương pháp Folch.

2.3.2. Phân tích tính chất sản phẩm thu được

Dịch protein thủy phân và lipit thô: Xác định DH theo phương pháp DNFB. Xác định hiệu suất thu hồi nitơ (NR) được xác định theo công thức sau: $NR(\%) = \frac{\text{Lượng nitơ tổng số có trong dịch thủy phân thu được từ 100g phụ phẩm cá Tra (g)}}{\text{Lượng nitơ tổng số có trong 100 g phụ phẩm cá Tra đem thủy phân (g)}} \times 100$. Xác định thành phần và hàm lượng đạm axit amin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Xác định khối lượng phân tử bằng phương pháp sắc ký gel thẩm qua (GPC).

Hydroxyapatite: 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 (BET). 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).

2.3.3. Phân tích trong quá trình thử nghiệm nuôi tôm

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 acid, DO được phân tích theo phương pháp Indophenol Blue. Nitrite 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). 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: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Sau đó, hút 100 μ l từ mỗi nồng độ pha loãng của mẫu nước cho vào đĩa môi trường NA hoặc TCBS, dùng que thủy tinh trải 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 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 tiêu li với độ chính xác 1 mg. Tỷ lệ sống được xác định khi tôm đạt giai đoạn 55 ngày tuổi. Tỷ lệ sống (%) = Tổng số tôm thu hoạch (con) x 100 / 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. Ngoài ra để đánh giá chất lượng vỏ tôm thẻ 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 và phổ nhiễu xạ tia X.

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

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

Theo Bảng 3.1, thành phần khối lượng phế liệu cá Tra 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%). 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. Tuy nhiên, hàm lượng lipít cao (41,85%) 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 lipít.

3.2. Kết quả nghiên cứu tách lipít từ phế liệu cá Tra

Kết quả nghiên cứu phương pháp tiền xử lý phế liệu cá Tra thích hợp để tách lipít trước khi thủy phân được trình bày trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của các phương pháp tách lipít

Phương pháp	Hàm lượng lipít được tách ra (%)	Hàm lượng lipít và protein còn lại, theo nguyên liệu (%)	
		Lipít	Protein
Nấu chín – ép	61,92 ± 0,85	5,56 ± 0,48	10,48 ± 0,53
Không tách lipít	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 lipít được tách ra khỏi nguyên liệu là

61,92%. Khi xử lý nguyên liệu theo phương pháp Nấu chín – ép, hàm lượng lipít còn lại trong nguyên liệu (5,56%), 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.

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

3.3.1. Ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu

Dựa theo kích cỡ của nguyên liệu cá Tra sử dụng cho chế biến phân phế liệu ra 6 loại mẫu khác nhau (Bảng 3.3).

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

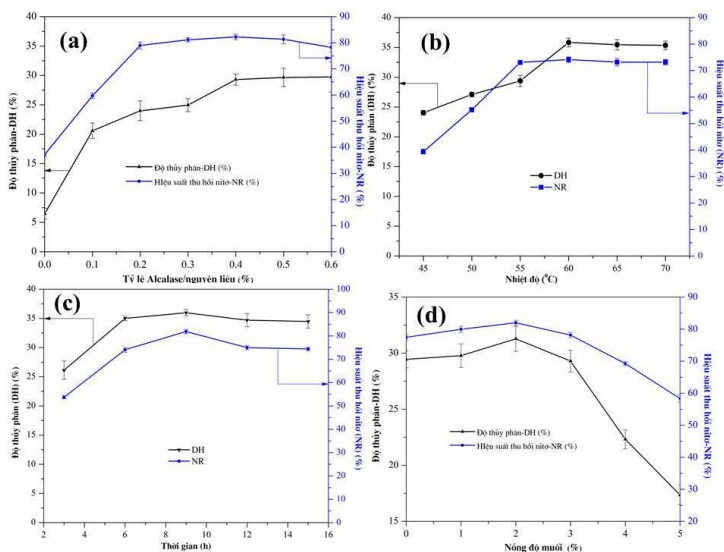
Kích cỡ nguyên liệu (g/con)	Hàm lượng nước (%)	Hàm lượng protein (%)	DH (%)	NR (%)
500 – 700	68,30 ± 0,85	13,60 ± 0,60	37,85 ^a ± 0,98	81,55 ^a ± 1,12
700 – 900	68,10 ± 0,75	13,68 ± 0,55	35,63 ^b ± 1,05	80,78 ^{ab} ± 0,85
900 – 1100	67,40 ± 0,70	14,25 ± 0,72	33,75 ^c ± 0,95	80,42 ^{ab} ± 1,02
1100 – 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

Khi điều kiện thủy phân: hàm lượng alcalase 0,6%, nhiệt độ 50°C, 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. Điều này được giải thích, khi kích cỡ nguyên liệu cá càng lớn thì hàm lượng lipít càng cao, phế liệu thu nhận có hàm lượng lipít cao kìm hãm quá trình thủy phân, tốc độ thủy phân chậm.

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

Ở cùng điều kiện thủy phân 3 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% so với khối lượng nguyên liệu.

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. Giá trị DH này sẽ tăng có ý nghĩa đến 20,58% khi enzyme alcalase thương mại được thêm vào quá trình thủy phân với hàm lượng là 0,1%. 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. 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 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%.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của (a) hàm lượng alcalase, (b) nhiệt độ, (c) thời gian, (d) nồng độ muối bổ sung đến DH và NR của dịch FPH.

Quan sát ở Hình 3.1a, giá trị NR tăng lên có ý nghĩa khi hàm lượng enzyme tăng từ 0,1% đến 0,6%. Đáng chú ý, giá trị NR tăng nhanh chóng từ 37,22% đến 78,98% trong khoảng hàm lượng enzyme 0,1% đến 0,2%. Khi hàm lượng enzyme tăng từ 0,3% đến

0,4%. NR tăng chậm lên 81,16% đạt giá trị cao nhất 82,24%. Sau đó, giá trị NR có sự giảm nhẹ trong khoảng 0,5% đến 0,6%.

Như vậy, hàm lượng enzyme alcalase sử dụng phù hợp nhất cho quá trình thủy phân thu nhận dịch protein thủy phân có DH và NR tốt nhất là 0,4% so với khối lượng nguyên liệu.

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

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra được biểu diễn trên Hình 3.1b. 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. Khi nhiệt độ tăng từ 45 – 60°C thì giá trị DH tăng lên từ 24,04% đến 35,83%, giá trị tăng có ý nghĩa ($P < 0,05$), sau đó khi nhiệt độ tiếp tục tăng lên đến 70°C thì DH sẽ giảm nhẹ xuống 34,67%, sự khác nhau không có ý nghĩa ($P > 0,05$). 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%. 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%. Kết luận, nhiệt độ thủy phân thích hợp nhất cho quá trình thủy phân thu nhận dịch protein thủy phân có DH và NR là 60°C.

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

Hình 3.1c cho thấy trong khoảng thời gian thủy phân 3 – 15 giờ cả 2 giá trị DH và NR đều tăng khi thời gian thủy phân đến 9 giờ nhưng cả hai không tăng hoặc giảm nhẹ sau 9 giờ thủy phân. DH rất nhanh từ 3 giờ đến 6 giờ. Trong nghiên cứu này, DH đạt giá trị cao nhất là 35,97% trong 9 giờ thủy phân. NR tăng lên từ 53,71% đến giá trị lớn nhất là 81,88% khi thời gian thủy phân tăng từ 3 giờ đến 9 giờ, tương ứng. Tuy nhiên, NR bắt đầu giảm nhẹ từ 74,98% và 74,41% sau 12 và 15 giờ tương ứng. Vì vậy, thời gian thủy phân thích hợp để đạt giá trị NR cao nhất là 9 giờ.

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

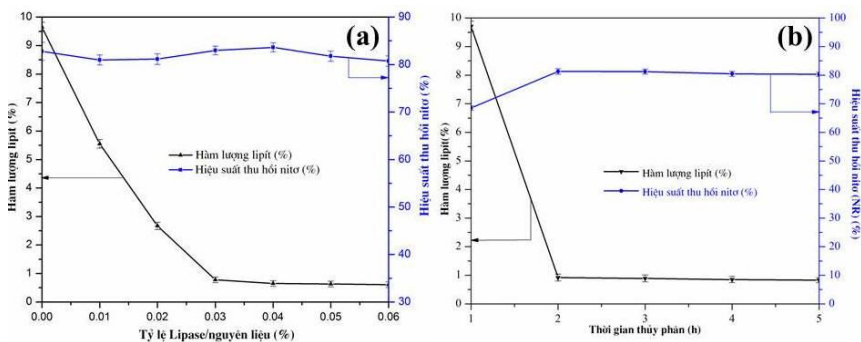
Ảnh hưởng của nồng độ muối đến quá trình thủy phân phế liệu cá Tra được biểu diễn trên Hình 3.1d. Theo đó, khi nồng độ muối tăng từ 0 – 5% thì cả 2 giá trị DH và NR đều tăng nhẹ từ 29,45 % lên 31,28%

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. 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%. Khi tiếp tục tăng nồng độ muối lên 3% thì cả 2 giá trị DH và NR đều giảm nhẹ, 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. Vì vậy, nồng độ muối bổ sung tối ưu vào quá trình thủy phân phế liệu cá Tra là 2%.

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

Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme lipase đến quá trình thủy phân dịch protein thủy phân ở giai đoạn 1 được biểu diễn trên Hình 3.2a. Khi hàm lượng enzyme lipase sử dụng tăng từ 0 – 0,06% thì lúc ban đầu, hàm lượng lipid trong dịch thủy phân giảm xuống rất nhanh từ 9,65% xuống còn 0,78%, sau đó lipid trong dịch thủy phân tách ra không đáng kể, lượng lipid trong dịch thủy phân còn 0,30%, 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% và sau đó giảm nhẹ còn 80,73%, không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).



Hình 3.2. Ảnh hưởng của (a) hàm lượng lipase, (b) thời gian thủy phân đến hàm lượng lipid và NR.

Khi hàm lượng lipase tăng từ 0 – 0,02% thì quá trình thủy phân lipid trong dịch protein xảy ra mạnh, lipid được thủy phân tạo thành các axit béo tự do hòa tan nên hàm lượng lipid 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 lipid trong dịch thủy phân tách ra không đáng kể, hàm lượng lipid trong dịch thủy

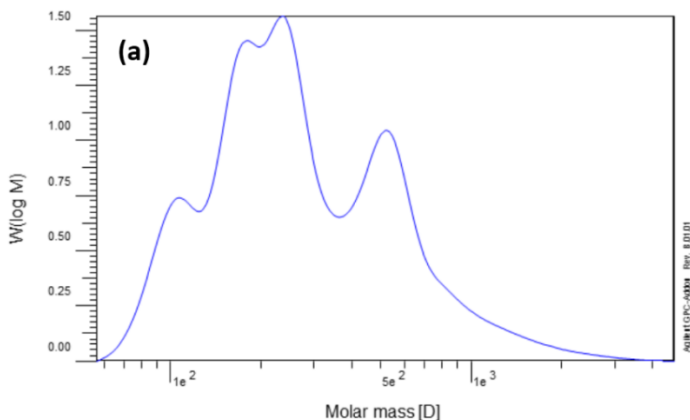
phân còn 0,30%, không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) của hàm lượng lipid trong dịch thủy phân khi hàm lượng enzyme tăng từ 0,03 – 0,06%. Trong khi đó, giá trị NR tăng nhẹ từ 80,96% lên 82,97% tương ứng với hàm lượng enzyme tăng từ 0,02% đến 0,03%, khi tăng hàm lượng enzyme lên từ 0,03 – 0,06% thì NR tăng lên chậm và đạt giá trị cao nhất là 83,62% và sau đó giảm nhẹ còn 80,73%. Vì vậy, hàm lượng enzyme lipase bổ sung tối ưu vào quá trình thủy phân dịch thủy phân cá Tra là 0,03%. Dịch thủy phân protein sau khi thủy phân ở giai đoạn 2 bằng enzyme lipase thu được có hàm lượng lipid rất thấp (0,38% wt.) rất phù hợp để làm thức ăn bổ sung cho tôm thẻ post sau này.

3.4.2. Ảnh hưởng của thời gian bằng enzyme lipase

Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến quá trình thủy phân dịch protein thủy phân ở giai đoạn 1 được biểu diễn trên Hình 3.2b. Thời gian thủy phân tối ưu cho quá trình thủy phân dịch thủy phân cá Tra giai đoạn 2 là 2 giờ. Dịch thủy phân protein sau khi thủy phân ở giai đoạn 2 bằng enzyme lipase thu được có hàm lượng lipid rất thấp (0,83% wt.) phù hợp để làm thức ăn bổ sung cho tôm thẻ post sau này.

3.5. Thành phần hóa học của FPH

Hình. 3.3 trình bày sự phân bố khối lượng phân tử (Mw) của các peptit FPH. Kết quả cho thấy rằng, tỷ lệ % các peptides 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).



Hình 3.3. Đồ thị biểu diễn phân bố khối lượng phân tử của dịch thủy phân.

Hầu hết các peptit có khối lượng phân tử < 1000 Da. Thành phần axit amin 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 (TEAA) 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

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 lipid (%)	1,93 ± 0,05
Hàm lượng chất khô (%)	40,6 ± 2,32
Hàm lượng đạm axit amin (mg/g)	420,16
Màu sắc	Nâu sẫm
Mùi	Thơm tự nhiên

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

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 (docosaheptaenoic)	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 và sản phẩm HA

Nguyên liệu xương cá Tra có hàm lượng khoáng 51,60%, với trữ lượng 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.

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

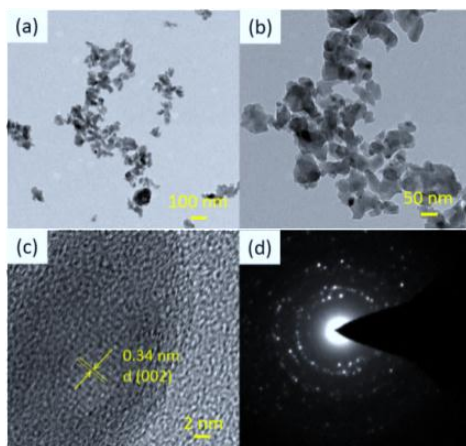
Để tách riêng phần hữu sử dụng phương pháp đun sôi nước, nấu chín nguyên liệu và phương pháp thủy phân protein bằng enzyme. Xử lý phế liệu theo phương pháp thủy phân: xương cá Tra có protein, lipít, 35,24 %, tro khoáng 51,06%; sản phẩm HA trắng ngà, bề mặt không nhẵn, sẫm màu. Khi xử lý theo phương pháp đun sôi, xương cá có protein, lipít, 36,58%, tro khoáng 50,06%.

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

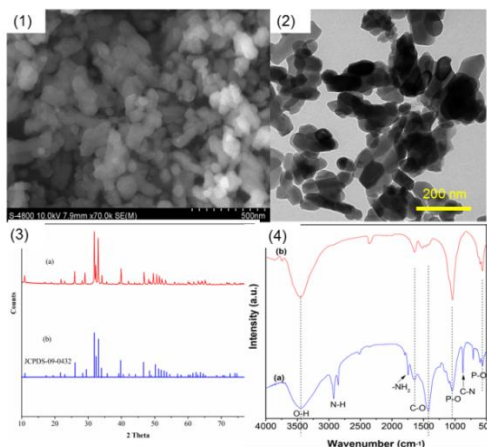
Nhiệt độ nung có ảnh hưởng lớn đến màu sắc, hình thái, kích thước và cấu trúc tinh thể, độ xốp, kích thước hạt của sản phẩm HA.

Hình thái của HA ở nhiệt độ nung 700°C có kích thước 50 – 70 nm, có độ xốp cao, cấu trúc nano HA cho thấy bề mặt vật liệu từ ảnh TEM có độ phân giải cao, khoảng cách giữa các hạt liền kề khoảng

0,34 nm, khoảng cách này bằng với khoảng cách HA (220) tiêu chuẩn (hình 3.4c). 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 3.4d).



Hình 3.4. Ảnh (a,b) TEM, (c) HRTEM và (d) mẫu SAED của HA từ xương cá Tra ở 700°C với các độ phóng đại khác nhau.



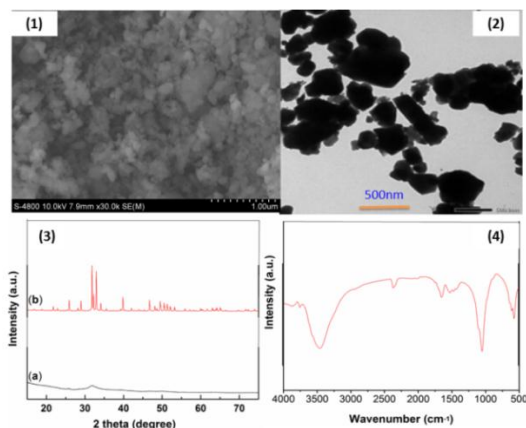
Hình 3.5. Ảnh SEM, TEM, XRD và FTIR của HA xương cá Tra.

HA có phổ XRD với các peak đặc trưng, cường độ của các peak sắc nhọn, 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 3.5). Phổ FTIR của HA, có 3 dãy băng thông bước sóng chính phụ

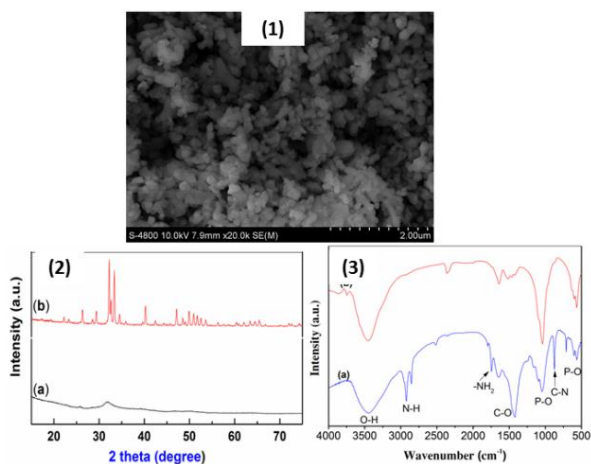
thuộc vào sự có mặt của 3 nhóm chức như nhóm phosphate (PO_4^{3-}), hydroxyl (OH^-) và carbonate (CO_3^{2-}). Phổ FTIR ở nghiên cứu này cũng phù hợp với phổ HA ở các nghiên cứu được báo cáo trước đó.

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

Ở nhiệt độ nung 700°C , tốc độ gia nhiệt $5^\circ\text{C}/\text{phút}$, thời gian nung phù hợp nhất để thu nhận HA có màu sắc, trạng thái, hiệu suất thu hồi cao nhất. Mẫu HA có kích thước hạt HA nhỏ, đồng đều ($50 - 70 \text{ nm}$), có độ xốp cao, có xuất hiện các peak, các nhóm chức đặc trưng của HA.



Hình 3.6. SEM, TEM, Phổ XRD và FTIR của HA xương cá Tra.
3.6.5. Ảnh hưởng của tốc độ nâng nhiệt nung đến HA thu nhận.



Hình 3.7. SEM, phổ XRD và FTIR của HA xương cá Tra.

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. 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 sẽ thu nhận HA có màu sắc, trạng thái, hiệu suất thu hồi, các mẫu có kích thước trong khoảng 30 - 300 nm, có độ xốp cao, có xuất hiện các peak, các nhóm chức đặc trưng của HA.

3.7. Phân tích sản phẩm HA cá Tra

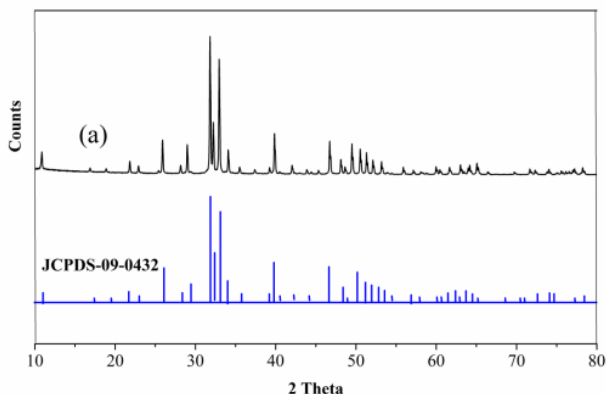
Sản phẩm HA được đánh giá, đo đạc về màu sắc, thành phần hóa học, hình dạng, kích thước, độ kết tinh, độ xốp để làm cơ sở đề xuất các ứng dụng sản phẩm HA cho phù hợp với các lĩnh vực.

Thành phần nguyên tố chính trong mẫu HA là Canxi (khoảng 302903 (mg/kg)) và Phốt pho (khoảng 165539 (mg/kg)), tỷ lệ phân tử Ca/P khoảng 1,83, Natri (4439,30), Kali (963,73), Magiê (2,03), Kẽm (138,69) và Nhôm (0,35) (mg/kg), Ngoài ra, trong HA từ xương cá Tra có nhiều vết nguyên tố được tìm thấy trong tất cả các mẫu HA, gồm Na, K, Mg, Zn và Al. Hai oxít kim loại, CaO (55,80 wt.%) và P₂O₅ (35,60 wt.%), đây là thành phần chính được tìm thấy trong tất cả các mẫu HA. Hàm lượng nguyên tố khoáng chính Canxi, phốtpho và ôxít của chúng trong sản phẩm HA thu hồi từ xương cá Tra chiếm hơn 90 wt.%, đây là nguồn cung cấp chất khoáng rất tiềm năng để bổ sung vào thức ăn tôm thẻ chân trắng 20 – 55 ngày tuổi.

Giá trị diện tích bề mặt, thể tích lỗ và kích thước lỗ trung bình là 2,87 m²/g⁻¹; 0,020 m³/g⁻¹; 1,20 nm và chỉ ra rằng HA có độ xốp cao và có tiềm năng ứng dụng rất tốt của HA.

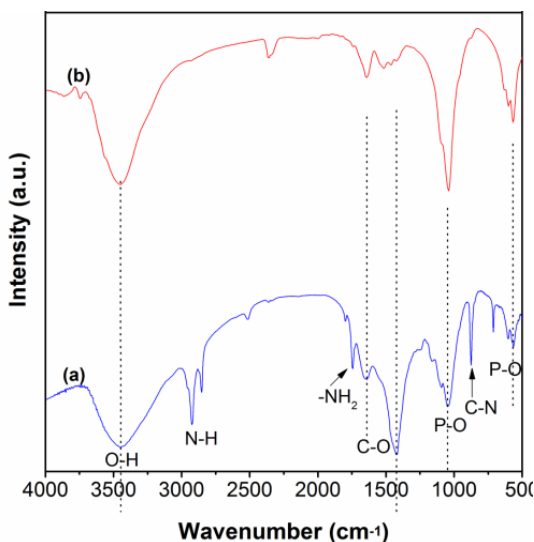
Ngoài ra, mẫu sản phẩm hydroxyapatite xương cá Tra được đánh giá:

+Tính chất kết tinh của sản phẩm HA được xác định bằng nhiễu xạ tia X, XRD (Hình 3.8a).



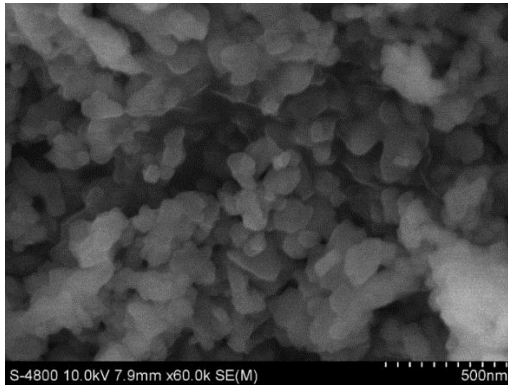
Hình 3.8. Phổ XRD của (a) HA xương cá Tra ở 700°C, 3°C/phút, 2 giờ và HA chuẩn JCPDS-09-0432.

+Cấu trúc hóa học của sản phẩm HA được xác định bằng phổ hồng ngoại FTIR (Hình 3.9)

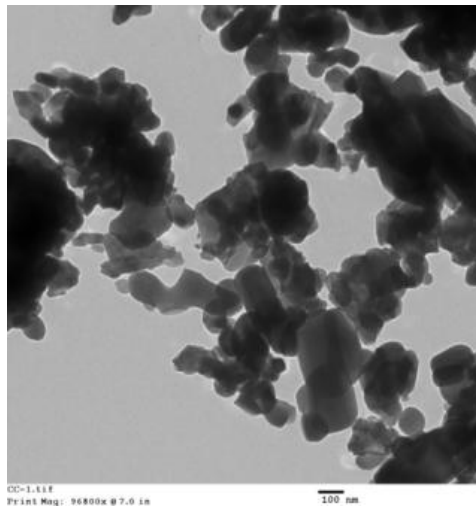


Hình 3.9. Phổ FTIR (a) xương cá Tra và (b) HA 700°C ở 2 giờ, 3°C/phút.

+Hình dạng, kích thước và tính chất xốp của bề mặt sản phẩm HA được kiểm tra bằng SEM, TEM (Hình 3.10 và Hình 3.11)

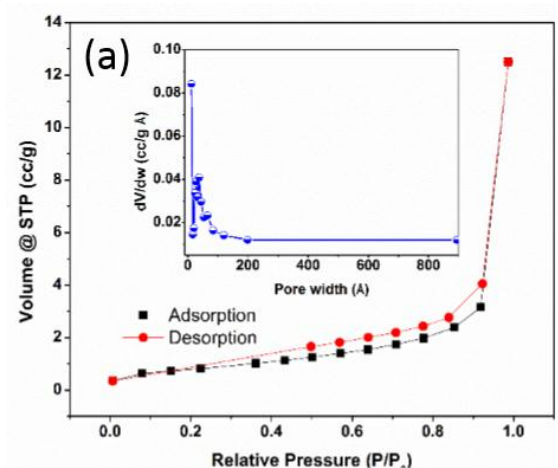


Hình 3.10. Ảnh SEM HA cá Tra nung ở 700°C, 3°C/phút, 2 giờ.



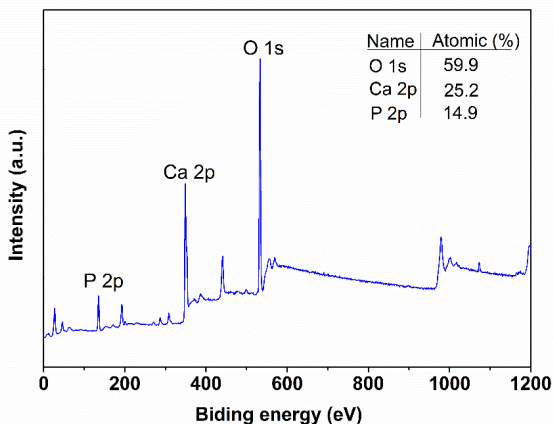
Hình 3.11. Ảnh TEM HA cá Tra nung ở 700°C, 3°C/phút, 2 giờ.

+Đồ thị hấp phụ và giải hấp phụ của sản phẩm HA được thể hiện trong Hình 3.12. Diện tích bề mặt riêng của sản phẩm HA là 2,87 m²/g.



Hình 3.12. Đồ thị hấp và giải hấp của HA cá Tra nung ở 700°C, 3°C/phút, 2 giờ

+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 3.13). Tỷ lệ Ca/P của sản phẩm HA là 1.82.



Hình 3.13. Đồ thị biểu diễn thành phần nguyên tố trong HA xương cá Tra nung ở 700°C, 3°C/phút, 2 giờ

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

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

Nhiệt độ trung bình vào buổi sáng từ 29,4°C đến 29,7°C và buổi chiều từ 30,1°C đến 30,6°C; kết quả pH đo được vào buổi sáng từ 7,55 đến 8,05 và buổi chiều từ 7,75 đến 8,15; hàm lượng DO trong môi trường nuôi là 5,5 mg/L; độ kiềm đo được từ 103,3 mgCaCO₃/L đến 105,8 mgCaCO₃/L; hàm lượng NO₂⁻ từ 0,30 mg/L đến 0,55 mg/L. Tất cả 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.

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

Mật độ tổng vi khuẩn sau 8 ngày nuôi dưỡng tôm (tôm 20 ngày tuổi) khoảng 4,0 – 4,8 x 10³ CFU/mL; 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. Khi 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 x 10³ CFU/mL nhỏ hơn mức 10⁷ CFU/mL và không gây hại cho tôm nuôi.

3.8.2.2. Tổng số vi khuẩn vibrio

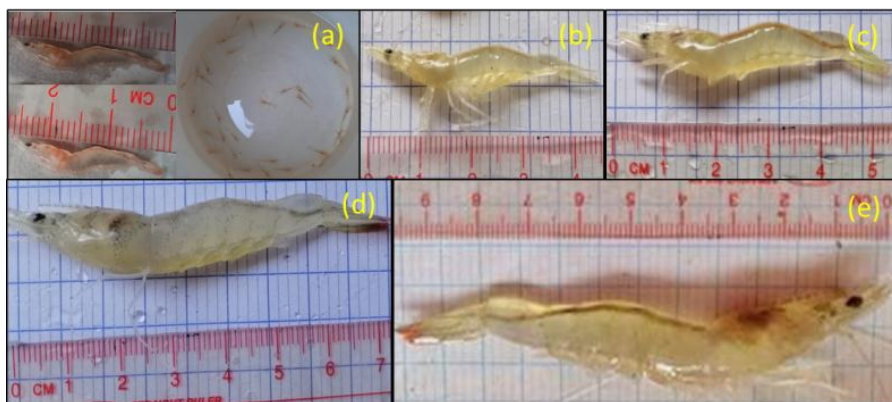
Sau khi nuôi tôm thử nghiệm 8 ngày (tôm 20 ngày tuổi), nghiệm thức 1 có mật độ Vibrio cao nhất 0,14 x 10³ CFU/mL. Sau 15 ngày nuôi (tôm 27 ngày tuổi), mật độ vi khuẩn cao nhất ở nghiệm thức 1 với mật độ 0,58 x 10³ CFU/mL, nhưng không khác biệt giữa nghiệm thức 4 và 5. Khi nuôi thử nghiệm tôm đến ngày thứ 36 (PL-48) thì mật độ tổng vi tăng lên rõ rệt trong khoảng 2,57–3,81x10³ CFU/mL và chiếm tỷ lệ 6,3 – 9,1 % so với tổng số vi khuẩn trong môi trường nuôi tôm. Khi phân tích lần cuối thí nghiệm (tôm 55 ngày tuổi) thì nghiệm thức 4 và nghiệm thức 5 có mật độ vibrio thấp nhất là 0,09 x 10³ CFU/mL, khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05) so với nghiệm thức 1, 2. 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.

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

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 Khi bổ sung 5% hỗn hợp FPH và HA (với tỷ lệ 80 : 20) vào thức ăn tôm, tôm tăng trưởng thêm 0,97g tương ứng với 123,5% về khối lượng so với khi không bổ sung.



Hình 3.14. Tôm thẻ chân trắng nghiệm thứ 4 (a) 20 ngày tuổi, (b) 27 ngày tuổi, (c) 34 ngày tuổi, (d) 41 ngày tuổi và (e) 55 ngày tuổi.

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 tốc độ tăng trưởng chiều dài tôm khi bổ sung 5% hỗn hợp FPH và HA (với tỷ lệ 80 : 20) vào thức ăn tôm, tôm tăng trưởng thêm 7,37 mm tương ứng với 112% về chiều dài so với khi không bổ sung.

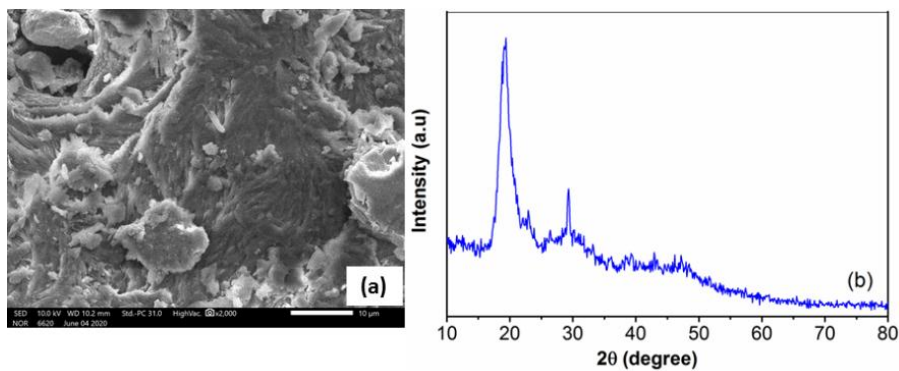
3.8.3.3. Tỷ lệ sống và năng suất của tôm 55 ngày tuổi

Tỷ lệ sống (%) và năng suất của tôm sau khi kết thúc thí nghiệm 55 ngày nuôi tôm khi bổ sung 5 % hỗn hợp dịch FPH và HA vào thức ăn tôm lần lượt là $97,30 \pm 2,85\%$ và $3,52 \pm 0,35$ kg/m².

3.8.3.4. Đánh giá chất lượng tôm nuôi 55 ngày tuổi

Gây sốc tôm 55 ngày tuổi bằng formol, thời gian 30 phút cho 100 cá thể tôm 55 ngày tuổi, kết quả có tỷ lệ tôm sống đạt 100%. 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:



Hình 3.15. Ảnh SEM và XRD của vỏ tôm thẻ chân trắng post 55 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 pprotein thủy phân từ phế liệu cá Tra bằng enzyme Alcalase và Lipase. 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. 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.

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 có thêm thử nghiệm bổ sung hỗn hợp dịch protein thủy phân và hydroxyapatite thu nhận từ phế liệu cá Tra vào thức ăn cho các đối tượng khác

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

Danh mục các báo cáo Hội nghị, Hội thảo:

1. **Phạm Việt 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. **Phạm 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. **Phạm Việt Nam**, Nguyen Van Hoa, Tran Thi Lan Anh, Trang Sĩ 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. **Phạm Việt Nam**, Nguyen Van Hoa, Tran Thi Lan Anh, Trang Sĩ 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. **Phạm Việt Nam**, Nguyen Van Hoa, Trang Sĩ Trung (2019). Properties of hydroxyapatites prepared from different fish bones: a comparative study. *Ceramics International*, 45 (16) 20141-20147.
3. Nguyễn Lê Bá Quảng, **Phạm Việt Nam**, Phạm Anh Đạt, Nguyễn Văn Hòa (2018). Thu nhận và xác định tính chất của hydroxyapatit 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. **Phạm Việt Nam**, Tran Vy Hich, Nguyen Van Hoa, Dinh Van Khuong, Trang Sĩ Trung (10/2020). Improved growth of juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) supplemented by Tra-fish protein hydrolysate and hydroxyapatit mixture. *Aquaculture Research* (Under Review).