

# NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG ENZYME PROTEASE TỪ VI KHUẨN (*Bacillus subtilis*) ĐỂ THỦY PHÂN PHỤ PHẨM CÁ TRA

Trần Thị Hồng Nghi, Lê Thanh Hùng, Trương Quang Bình\*

Khoa Thủy Sản, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM

Email: hongnghidh05ct@gmail.com; lthungts@yahoo.com.vn; tqbinh@hcmuaf.edu.vn.

## ABSTRACT

Microbe extracted protease was used extensively in many industries especially in food industry for obtaining protein and in waste treatment. The application of protease from microbe especially from *Bacillus subtilis* to recover protein from the by-products of catfish processing industry in Mekong delta is a promising approach for solving the environmental problems as well as increasing the economic efficiency. This experiment was conducted to investigate the activity of protease extracted from *Bacillus subtilis* on the by-products of Tra fish. The result has showed that the optimum conditions for the activity of protease from *Bacillus subtilis* is at temperature 50°C; pH 7,6; water content 30%; salt concentration 2%, 50UI of enzyme and a hydrolyzing time of 18 hours. The obtained protein solution was then used to produce fish sauce-like product. The quality of product is relatively good ranking at grade 1 according to the quality standard of fish sauce. Tra fish fat was also obtained with the rate of 28,5%, the quality is also acceptable in comparison with Tra fish fat obtained from fry and centrifugal method. However, the odor of obtained protein solution is uncomfortable due to the impurities and need to be improved.

## GIỚI THIỆU

Hiện nay việc xử lý chất thải trong các nhà máy chế biến thủy sản đang được đặc biệt quan tâm. Đối với vùng Đồng Bằng Sông Cửu Long, nơi có ngành nuôi trồng và chế biến thủy sản phát triển, vấn đề xử lý phụ phẩm cá Tra hiệu quả, kinh tế và thân thiện với môi trường ngày càng trở nên cấp thiết. Tỷ lệ khả dụng trong công nghiệp thực phẩm của cá Tra là tương đối thấp do đó nếu sản lượng cá nguyên liệu đạt 1 triệu tấn thì các nhà máy chế biến phải thải ra thị trường hơn 600.000 tấn phụ phẩm cá Tra (Nguyễn Trọng Cẩn, 2006; VASEP, 2006). Đây là nguồn phụ phẩm khổng lồ và nếu không có cách giải quyết ổn thỏa số lượng phụ phẩm này của các doanh nghiệp chế biến thì Đồng Bằng Sông Cửu Long sẽ nhanh chóng bị ô nhiễm. Những năm gần đây, việc tận dụng các phụ phẩm từ các nhà máy chế biến thủy sản để chế biến ra những mặt hàng giá trị gia tăng, đặc biệt là đối với phụ phẩm từ cá Tra, cá Basa cũng đã được sự quan tâm đầu tư của các doanh nghiệp chế biến thủy sản. Đầu, xương sống, ruột, kỳ vi của cá tra được tận dụng tối đa chế biến thành thức ăn công nghiệp phục vụ chăn nuôi sau khi đã nấu lấy mỡ. Bao tử, bong bóng cá bán cho những đại lý chuyên thu mua sấy khô cung cấp cho các nhà hàng. Da cá xuất khẩu sang Châu Âu phục vụ công nghiệp dược phẩm, mỹ phẩm. Riêng mỡ cá chiếm từ 15 – 20% trọng lượng được các cơ sở chế biến nấu thành mỡ nước cung ứng cho thị trường.

Bên cạnh việc tạo ra sản phẩm giá trị gia tăng từ phụ phẩm của cá Tra, phương pháp xử lý nguồn phụ phẩm này bằng các biện pháp sinh học cũng đang rất được quan tâm, đặc biệt là sử dụng enzyme thủy phân để thu hồi protein do tạo ra những sản phẩm có nhiều công dụng và giá trị dinh dưỡng cao (Min-Tian Gao và ctv, 2005).

Việc sử dụng enzyme protease từ *Bacillus subtilis*, một loại vi khuẩn có khả năng thích nghi cao, có thể tổng hợp được nhiều loại enzyme cần thiết trong quá trình sống để thích ứng với nhiều hoàn cảnh và điều kiện môi trường (E.El Mayday và ctv., 1989) như: amylase,

hemicellulase, glucanase, xylanase, protease...cho việc thủy phân phụ phẩm cá Tra đang được quan tâm nghiên cứu và có nhiều triển vọng để ứng dụng trong sản xuất trên thực tế.

Mục tiêu của nghiên cứu này là tìm điều kiện tốt nhất cho việc thủy phân protein cá Tra bằng enzyme protease từ vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Sau đó thử nghiệm sản xuất nước mắm từ nguồn dịch đậm thu hồi được ở điều kiện thủy phân tốt nhất của enzyme protease từ vi khuẩn *Bacillus subtilis*.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

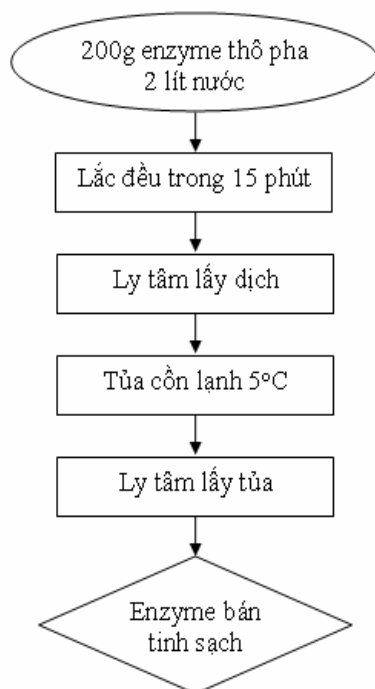
Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Thủy Sản, Viện Nghiên Cứu Công nghệ Sinh học và Công nghệ Môi Trường trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.

*Bacillus subtilis* là trực khuẩn, Gram (+), có khả năng sinh catalase, hiếu khí hay kỵ khí tùy ý, thường được tìm thấy trong đất có nội bào tử có khả năng chịu nhiệt, tia bức xạ, chất sát khuẩn, chất hút ẩm (E. M. El – Safey và U. M. Abdul-Raouf, 2004; M. Paul và ctv., 2006 và Aertsen và ctv., 2005).

Enzyme protease thô từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* 43 được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Bộ môn Công Nghệ Sinh Học trường Đại Học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh với một số đặc tính như nhiệt độ tối ưu ở 50°C, tỷ lệ tủa enzyme : cồn là 1: 3, thời gian tủa là 30 phút, tỷ lệ nước : enzyme là 1:1, hoạt tính là 12 UI/g.

Phụ phẩm cá Tra được cung cấp bởi Công ty Vĩnh Hoàn tỉnh Đồng Tháp.

Canh trường thu nhận được từ nuôi cấy bán rắn được tiến hành tủa để thu enzyme protease bán tinh sạch với tác nhân tủa là ethanol 96%. Quy trình tinh sạch enzyme được thực hiện như sau:



Sơ đồ 1. Quy trình tinh sạch enzyme protease thô từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* 43

## **Thí nghiệm 1: khảo sát và chọn lọc điều kiện thủy phân thích hợp**

### ***Khảo sát thành phần của cơ chất dùng để thủy phân***

Tiến hành đo các chỉ tiêu nitrogen tổng số, nitrogen formol và nitrogen NH<sub>3</sub> nhằm xác định nguồn nguyên liệu có đủ khả năng thủy phân tạo ra dịch đậm có chất lượng tốt.

### ***Khảo sát tỷ lệ nước***

Với điều kiện tối ưu của enzyme protease (nhiệt độ 50<sup>0</sup>C, pH =7,6), 100g cơ chất được thủy phân với nồng độ enzyme 50UI trong 24 giờ, với các tỷ lệ nước khảo sát như sau: 0%, 30%, 50%, 70%, 100%. Sản phẩm sau thủy phân sẽ được tiến hành đo các chỉ số đạm để tính hiệu suất thủy phân và hiệu suất thu nhận đạm hòa tan. Từ đó, chọn ra tỷ lệ nước tối ưu để tiến hành khảo sát tiếp theo. Đồng thời, tỷ lệ mỡ thu được cũng được khảo sát ở các tỷ lệ nước khác nhau nhằm tìm hiểu nước có hoặc không có ảnh hưởng đến tỷ lệ thu hồi mỡ.

### ***Khảo sát nồng độ muối***

Với các tỷ lệ nước tối ưu đã xác định và điều kiện thủy phân như trên, tiến hành thủy phân với các nồng độ khảo sát như sau: 1%, 2%, 3%, 4%, 5%.

Sản phẩm sau thủy phân sẽ được tiến hành đo các chỉ tiêu đạm để tính hiệu suất thủy phân và hiệu suất thu nhận đạm hòa tan. Từ đó, chọn ra nồng độ muối tối ưu để tiến hành khảo sát tiếp theo.

### ***Khảo sát nồng độ enzyme thủy phân***

Với các điều kiện tỷ lệ nước và nồng độ muối đã xác định và điều kiện thủy phân như trên, tiến hành thay đổi nồng độ enzyme với các hoạt độ khảo sát như nhau: không có enzyme, 25UI, 50UI, 75UI, 100UI, 125UI.

Sản phẩm sau thủy phân sẽ được tiến hành đo các chỉ số đạm để tính hiệu suất thủy phân và hiệu suất thu nhận đạm hòa tan. Từ đó, chọn ra hoạt độ enzyme tối ưu để tiến hành các khảo sát tiếp theo. Đồng thời, tính tỷ lệ mỡ thu được ở các hoạt độ enzyme khác nhau nhằm biết được hoạt độ enzyme có hoặc không có ảnh hưởng đến tỷ lệ thu hồi mỡ.

### ***Khảo sát thời gian thủy phân***

Với các điều kiện đã xác định ở các thí nghiệm trên, tiến hành khảo sát thời gian thủy phân từ 2 giờ đến 24 giờ.

Dịch sau thủy phân sẽ được tiến hành đo các chỉ tiêu đạm để tính hiệu suất thủy phân và hiệu suất thu nhận đạm hòa tan. Từ đó, chọn ra thời gian tối ưu để tiến hành thủy phân với khối lượng lớn. Tỷ lệ mỡ thu được cũng được khảo sát ở các thời gian khác nhau nhằm biết được thời gian có hoặc không có ảnh hưởng đến tỷ lệ thu hồi mỡ.

### ***Hiệu suất thủy phân và hiệu suất thu nhận đạm hòa tan được tính như sau***

$$\text{Hiệu suất thủy phân (\%)} = \frac{\text{Đạm hòa tan (g)}}{\text{Đạm tổng số (g)}} \times 100$$

$$\text{Hàm lượng đạm formol trong dịch sau thủy phân (\%)} = \frac{N_F \cdot 100}{N_{TS} \cdot (100 - \text{độ ẩm})} \times 100$$

Trong đó:

- $N_F$ : hàm lượng đạm formol trong dịch sau khi thủy phân
- $N_{TS}$ : hàm lượng đạm tổng số trong dịch thủy phân sau thủy phân
- $N_{TS}$  nguyên liệu: hàm lượng đạm tổng số của nguyên liệu trước khi thủy phân.
- Nitrogen tổng số được xác định bằng phương pháp Kjeldahl
- Nitrogen formol được xác định bằng phương pháp Sorensen
- Nitrogen  $NH_3$  được xác định bằng hệ thống máy Kjeldahl (Tổng Cục Tiêu Chuẩn – Đo Lường- Chất Lượng, 1990)

## **Thí nghiệm 2: thử nghiệm sản xuất nước mắm từ dịch thủy phân thu được ở điều kiện tối ưu**

Dịch thu được sau thủy phân ở các điều kiện tối ưu được dùng để sản xuất thử nghiệm nước mắm ngăn ngày. Chất lượng nước mắm được đánh giá bằng phương pháp cảm quan với các chỉ tiêu đánh giá gồm: màu sắc, mùi, vị và độ trong. Các chỉ tiêu được đánh giá bằng phương pháp cho điểm với 12 cảm quan viên.

### **Phương pháp xử lý số liệu**

Các số liệu thu được được xử lý thống kê bằng Excel và phần mềm Stagraphic 7.0.

## **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **Kết quả khảo sát và chọn lọc điều kiện thủy phân thích hợp**

#### *Kết quả khảo sát thành phần của cơ chất dùng để thủy phân*

Thành phần khối lượng phụ phẩm và hàm lượng các loại đạm có trong phụ phẩm cá Tra được trình bày trong bảng 1 và 2.

Bảng 1. Thành phần khối lượng của phụ phẩm cá dùng để thủy phân

Đầu, xương, vây đuôi (%)	Mỡ bụng (%)	Nội tạng (%)	Mỡ lá (%)
64,23	18,71	10,97	6,1

Bảng 2. Hàm lượng các loại đạm có trong phụ phẩm cá

Chỉ tiêu phân tích	Hàm lượng
Độ ẩm (%)	66
Nitrogen formol (g/100g NL)	0,1
Nitrogen tổng số (g/100g NL)	2,25
Protein tổng (%) ( $N_{TS} \cdot 6,25$ )	14,1
Nitrogen $NH_3$ (g/100g NL)	0,1

Phụ phẩm cá Tra có hàm lượng mỡ khá cao, mỡ bụng chiếm 18,71% và mỡ lá chiếm 6,1%. Lượng đạm trong loại nguyên liệu này chiếm tỉ lệ tương đối cao cùng với khối lượng phụ phẩm tương đối lớn thì việc thu hồi lại lượng đạm này để nâng cao hiệu quả kinh tế là cần thiết.

### **Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nước đến quá trình thủy phân**

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nước đến quá trình thủy phân được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ nước đến hiệu suất thủy phân và hiệu suất thu nhận đạm hòa tan.

Nước	0%	30%	50%	70%	100%
<b>Chi tiêu</b>					
N <sub>F</sub> (g/l)	7,93 <sup>c</sup>	12,14 <sup>a</sup>	9,04 <sup>b</sup>	6 <sup>d</sup>	5,49 <sup>d</sup>
N <sub>TS</sub> (g/l)	17,37 <sup>a</sup>	14,97 <sup>b</sup>	13,9 <sup>c</sup>	10 <sup>d</sup>	9,77 <sup>d</sup>
N <sub>NH3</sub> (g/l)	1,1 <sup>a</sup>	0,66 <sup>b</sup>	0,49 <sup>bc</sup>	0,36 <sup>bc</sup>	0,27 <sup>c</sup>
HSTP (%)	39,32 <sup>d</sup>	76,67 <sup>a</sup>	61,36 <sup>b</sup>	56,73 <sup>c</sup>	53,4 <sup>c</sup>
HSTN <sub>dht</sub> (%)	77,2 <sup>a</sup>	66,53 <sup>b</sup>	61,78 <sup>c</sup>	44,44 <sup>d</sup>	43,42 <sup>d</sup>

(Ghi chú: Trong cùng một hàng ngang, các giá trị trung bình không cùng mẫu tự thì khác biệt ở mức ý nghĩa 95%).

Hàm lượng đạm formol tăng nhanh từ 0% đến 30% và đạt tỷ lệ cao nhất ở 30% khoảng 12 (g/l) khác biệt có ý nghĩa so với tỉ lệ nước ở các nghiệm thức khác. Cũng ở tỷ lệ 30% nước thì hiệu suất thủy phân là cao nhất (khoảng 77%) và cũng khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức khác. Trong khi đó ở hiệu suất thu nhận đạm hòa tan ở tỷ lệ nước 30% là khoảng 67% chỉ thấp hơn so với hiệu suất ở tỷ lệ nước là 0% (77%). Tuy nhiên, xét về cả hai mặt số lượng và chất lượng của dung dịch đạm thu được thì tỷ lệ nước ở 30% là nghiệm thức tốt nhất.

Tỷ lệ mỡ thu hồi cũng được khảo sát ở giai đoạn này. Kết quả được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ nước đến tỷ lệ mỡ thu hồi

Tỷ lệ nước (%)	Hàm lượng (%)
0	14,97 <sup>b</sup>
30	29,33 <sup>a</sup>
50	29,5 <sup>a</sup>
70	29,87 <sup>a</sup>
100	30,1 <sup>a</sup>

(Ghi chú: các giá trị trung bình không cùng mẫu tự thì khác biệt ở mức ý nghĩa 95%).

Tỷ lệ nước 0% có tỷ lệ mỡ thu được là thấp nhất, có sự khác biệt thống kê ở mức độ tin cậy 95% so với các tỷ lệ nước khác. Nguyên nhân do tỷ lệ nước 0%, nguyên liệu chưa thủy phân hết nên mỡ chưa tách ra triệt để. Các tỷ lệ nước còn lại mặc dù có sự thay đổi nhưng không đáng kể và không có sự khác biệt về mặt thống kê ở mức độ 95%. Do đó, tỷ lệ nước là 30% được chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

### Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ muối bổ sung vào trong quá trình thủy phân

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ muối bổ sung vào trong quá trình thủy phân được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến quá trình thủy phân phụ phẩm cá Tra

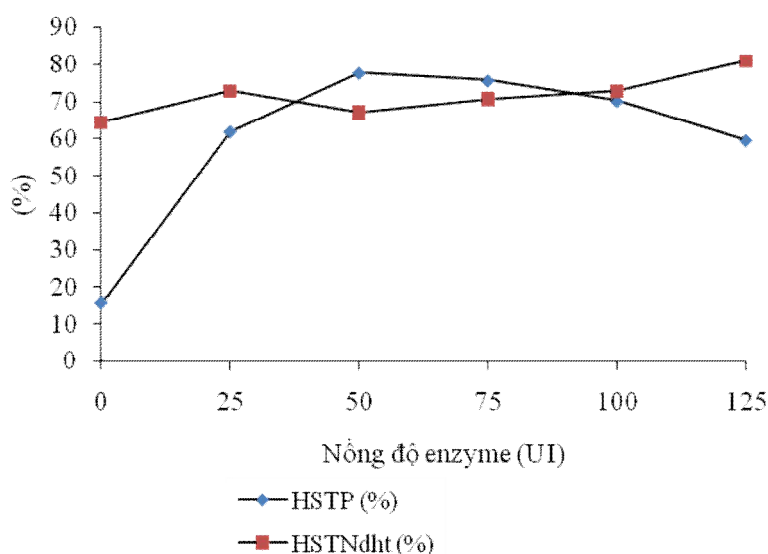
Tỉ lệ muối	1%	2%	3%	4%	5%
<b>Chi tiêu</b>					
$N_F$ (g/l)	9,25 <sup>c</sup>	11,47 <sup>a</sup>	10,01 <sup>b</sup>	9,26 <sup>c</sup>	9,27 <sup>bc</sup>
$N_{TS}$ (g/l)	17,2 <sup>ab</sup>	15,1 <sup>c</sup>	16,6 <sup>b</sup>	17,7 <sup>a</sup>	18,27 <sup>a</sup>
$N_{NH_3}$ (g/l)	0,99 <sup>a</sup>	0,89 <sup>a</sup>	0,75 <sup>b</sup>	0,61 <sup>c</sup>	0,48 <sup>d</sup>
HSTP (%)	48,02 <sup>c</sup>	70,07 <sup>a</sup>	55,78 <sup>b</sup>	48,87 <sup>c</sup>	50,3 <sup>c</sup>
HSTN <sub>dht</sub> (%)	76,44 <sup>ab</sup>	67,11 <sup>c</sup>	73,78 <sup>b</sup>	78,67 <sup>a</sup>	81,2 <sup>a</sup>

(Ghi chú: Trong cùng một hàng ngang, các giá trị trung bình không cùng mẫu tự thì khác biệt ở mức ý nghĩa 95%).

Hàm lượng đạm formol và hiệu suất thủy phân tăng nhanh từ 1% đến 2% và đạt giá trị cao nhất ở nồng độ muối 2% (11,5 g/l và 70% tương ứng) và có sự khác biệt có ý nghĩa so với tất cả các nghiệm thức còn lại, sau đó hiệu suất thủy phân giảm rất nhanh ở nồng độ muối từ 3% đến 5%. Kết quả này cho thấy nồng độ muối bổ sung thích hợp là 2% vì cho hiệu suất thủy phân cũng như chất lượng đạm là cao nhất. Do đó, chúng tôi chọn nồng độ muối là 2% cho các khảo sát tiếp theo.

### Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme bổ sung vào quá trình thủy phân

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme bổ sung vào quá trình thủy phân ở bảng 3.6 cho thấy hiệu suất thủy phân tuân theo phương trình động học Michaelis – Menten, hoạt động của enzyme sẽ không tăng đồng biến với nồng độ enzyme (Roman Buckow, 2006) (biểu đồ 1): hiệu suất thủy phân tăng lên rất nhanh trong khoảng 0UI đến 50UI (từ khoảng 7% lên đến 78%) và đạt đỉnh ở 50UI sau đó ổn định và giảm nhẹ khi tăng nồng độ enzyme đến 125UI.



Biểu đồ 1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến hiệu suất thủy phân và hiệu suất thu nhận đạm hòa tan

Theo nồng độ enzyme bổ sung, tỷ lệ đạm formol thu được cũng chia thành ba phân khúc: tăng dần từ 0UI đến 50UI sau đó ổn định từ 50UI đến 100UI và sau đó giảm dần ở nồng độ cao hơn. Hàm lượng đạm formol thu được cao nhất ở nồng độ 75UI, tuy nhiên sự khác biệt này là không có ý nghĩa với mức độ tin cậy 95% so với nồng độ 50UI. Xét hai chỉ số quan trọng nhất là đạm formol, hiệu suất thủy phân cũng như tính kinh tế khi bổ sung hàm lượng enzyme thì hoạt độ 50UI được chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 6. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến quá trình thủy phân phụ phẩm cá Tra

Enzyme (UI)	0	25	50	75	100	125
<b>Chỉ tiêu</b>						
N <sub>F</sub> (g/l)	5,53 <sup>d</sup>	10,79 <sup>c</sup>	12,44 <sup>a</sup>	12,76 <sup>a</sup>	12,3 <sup>a</sup>	11,64 <sup>b</sup>
N <sub>TS</sub> (g/l)	14,5 <sup>d</sup>	16,4 <sup>b</sup>	15,1 <sup>cd</sup>	15,9 <sup>bc</sup>	16,4 <sup>b</sup>	18,2 <sup>a</sup>
N <sub>NH<sub>3</sub></sub> (g/l)	3,27 <sup>a</sup>	0,64 <sup>b</sup>	0,71 <sup>b</sup>	0,74 <sup>b</sup>	0,8 <sup>b</sup>	0,82 <sup>b</sup>
HSTP (%)	15,48 <sup>d</sup>	61,89 <sup>c</sup>	77,68 <sup>a</sup>	75,6 <sup>ab</sup>	70,12 <sup>b</sup>	59,45 <sup>c</sup>
HSTN <sub>dht</sub> (%)	64,44 <sup>d</sup>	72,89 <sup>b</sup>	67,11 <sup>cd</sup>	70,67 <sup>bc</sup>	72,89 <sup>b</sup>	80,89 <sup>a</sup>

(Ghi chú: Trong cùng một hàng ngang, các giá trị trung bình không cùng mẫu tự thì khác biệt ở mức ý nghĩa 95%).

Tỷ lệ mỡ thu hồi được khi bổ sung các nồng độ enzyme khác nhau cũng được khảo sát và kết quả được trình bày trong bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến tỷ lệ thu mỡ

Nồng độ enzyme (UI)	Hàm lượng (%)
0	24,43 <sup>b</sup>
25	30,77 <sup>a</sup>
50	30,83 <sup>a</sup>
75	30,33 <sup>a</sup>
100	30,27 <sup>a</sup>
125	30 <sup>a</sup>

(Ghi chú: các giá trị trung bình không cùng mẫu tự thì khác biệt ở mức ý nghĩa 95%).

Khi không bổ sung enzyme hàm lượng mỡ thu được rất thấp và có sự khác biệt về mặt thống kê ở mức độ tin cậy 95% so với các nghiệm thức còn lại. Nguyên nhân có thể là khi không bổ sung enzyme thì sau 24 giờ lượng mỡ tách ra khỏi nguyên liệu rất thấp do tốc độ thủy phân chậm. Các hoạt độ enzyme khác thì tỷ lệ mỡ thu hồi có sự thay đổi nhưng không có sự khác biệt về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

### Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên quá trình thủy phân

Hiệu suất thủy phân tăng dần từ 2 giờ đến 18 giờ và đạt giá trị cao nhất 80,84% sau đó giảm nhẹ và có xu hướng ổn định. Đồng thời, hiệu suất thu nhận đạm hòa tan và tỷ lệ thu hồi đạm formol cũng đạt giá trị cao nhất ở 18 giờ (14,17 g/l và 74% tương ứng) (bảng 8) Do đó, thời gian thủy phân được chọn là 18 giờ để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 8. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân lên quá trình thủy phân

Chỉ tiêu	N <sub>F</sub> (g/l)	N <sub>TS</sub> (g/l)	N <sub>NH<sub>3</sub></sub> (g/l)	HSTP (%)	HSTN <sub>dht</sub> (%)
<b>Thời gian (giờ)</b>					
2	6,74 <sup>k</sup>	15,13 <sup>f</sup>	0,47 <sup>c</sup>	41,44 <sup>h</sup>	67,24 <sup>f</sup>
4	8,57 <sup>j</sup>	15,37 <sup>ef</sup>	0,49 <sup>c</sup>	52,57 <sup>g</sup>	68,31 <sup>ef</sup>
6	9,32 <sup>i</sup>	15,83 <sup>de</sup>	0,72 <sup>b</sup>	54,33 <sup>fg</sup>	70,36 <sup>ed</sup>

Chi tiêu Thời gian (giờ)	N <sub>F</sub> (g/l)	N <sub>TS</sub> (g/l)	N <sub>NH<sub>3</sub></sub> (g/l)	HSTP (%)	HSTN <sub>dht</sub> (%)
8	9,83 <sup>h</sup>	15,97 <sup>cd</sup>	0,75 <sup>ab</sup>	56,86 <sup>ef</sup>	70,98 <sup>cd</sup>
10	10,16 <sup>fg</sup>	16,03 <sup>bcd</sup>	0,78 <sup>ab</sup>	58,52 <sup>e</sup>	71,24 <sup>bcd</sup>
12	10,47 <sup>ef</sup>	16,1 <sup>bcd</sup>	0,79 <sup>ab</sup>	60,12 <sup>e</sup>	71,56 <sup>bcd</sup>
14	10,62 <sup>e</sup>	16,3 <sup>abcd</sup>	0,81 <sup>ab</sup>	60,18 <sup>e</sup>	72,44 <sup>abc</sup>
16	12,12 <sup>d</sup>	16,43 <sup>abc</sup>	0,7 <sup>b</sup>	69,51 <sup>d</sup>	73,02 <sup>abc</sup>
18	14,17 <sup>a</sup>	16,6 <sup>a</sup>	0,75 <sup>ab</sup>	80,84 <sup>a</sup>	73,78 <sup>a</sup>
20	13,66 <sup>b</sup>	16,6 <sup>a</sup>	0,78 <sup>ab</sup>	77,59 <sup>ab</sup>	73,78 <sup>a</sup>
22	13,28 <sup>b</sup>	16,47 <sup>ab</sup>	0,82 <sup>ab</sup>	75,65 <sup>bc</sup>	73,2 <sup>ab</sup>
24	12,6 <sup>c</sup>	16,27 <sup>abcd</sup>	0,86 <sup>a</sup>	72,16 <sup>cd</sup>	72,31 <sup>abcd</sup>

(Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình không cùng mẫu tự thì khác biệt ở mức ý nghĩa 95%).

### Kết quả thí nghiệm 2: ứng dụng sản xuất nước mắm từ dịch thủy phân nguyên liệu với các điều kiện đã được chọn

Từ những điều kiện tối ưu đã được xác định từ các thí nghiệm trên (nhiệt độ 50<sup>0</sup>C, pH 7,6, 2% NaCl, nồng độ enzyme 50UI, 30% nước, thời gian thủy phân 18 giờ), một khối lượng cơ chất lớn hơn (1kg) được thủy phân để thu hồi dịch đậm dùng để sản xuất nước mắm.

Quy trình sản xuất thử nghiệm nước mắm từ dịch thủy phân phụ phẩm cá Tra được trình bày trong sơ đồ 1.

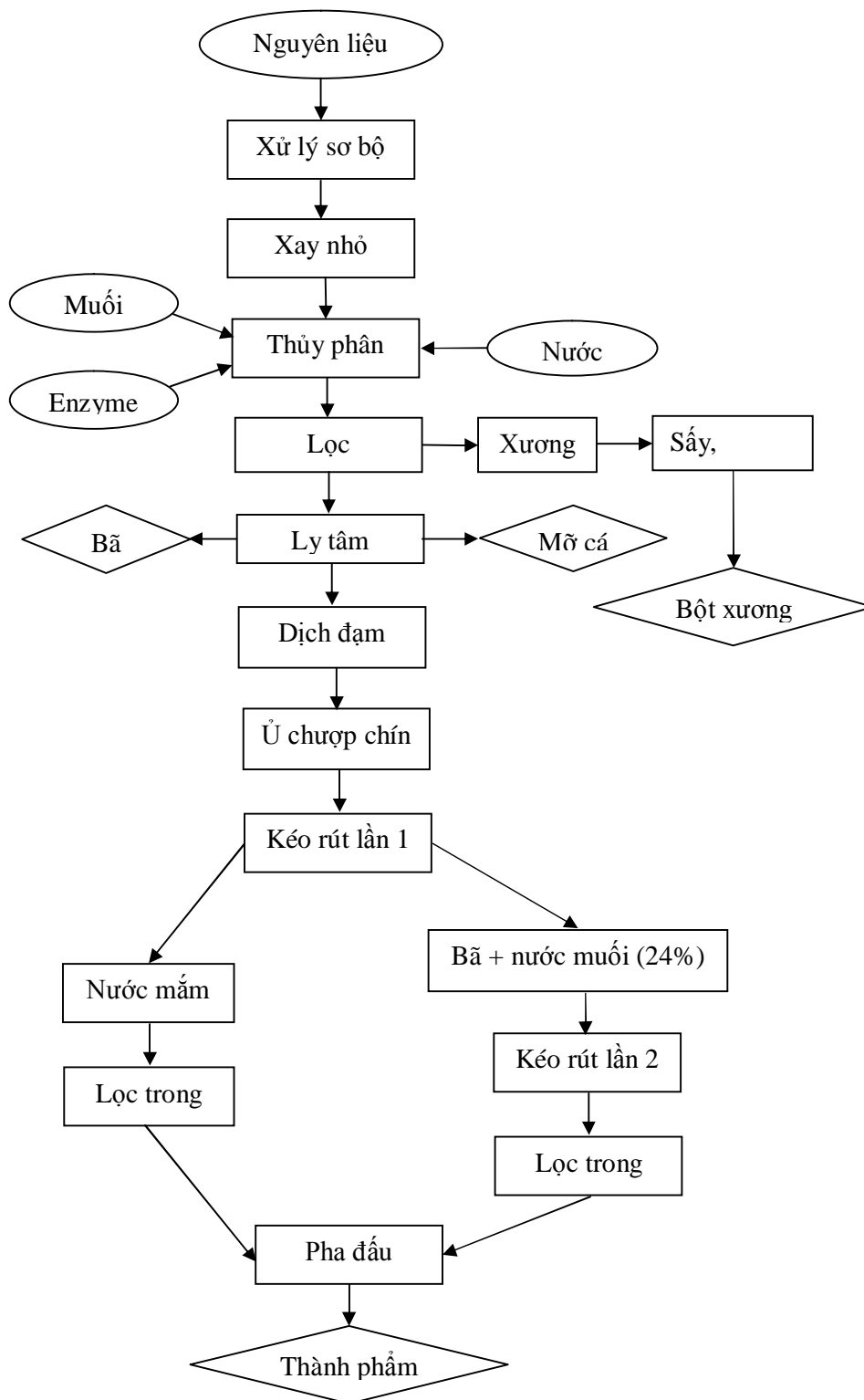
Chất lượng nước mắm ở các tỷ lệ bã chượp khác nhau được đánh giá bằng phương pháp cảm quan và được trình bày trong bảng 9.

Bảng 9. Kết quả đánh giá các chỉ tiêu cảm quan của nước mắm cá Tra có tỷ lệ bã chượp lần lượt là 10%, 20% và 30%.

Chi tiêu chất lượng	Hệ số quan trọng	10%		20%		30%	
		Trung bình	Điểm có trọng lượng	Trung bình	Điểm có trọng lượng	Trung bình	Điểm có trọng lượng
Màu sắc	0,8	4,58	3,67	4,75	3,8	4,33	3,46
Mùi	1,2	3,67	4,4	4	4,8	3,83	4,6
Vị	1,2	3,17	3,8	3,92	4,7	3,25	3,9
Độ trong	0,8	3,83	3,01	4,08	3,26	4,25	3,4
Điểm số chung			14,936		16,568		15,36

Theo kết quả đánh giá cảm quan thì mẫu nước mắm có tỷ lệ bã chượp là 20% có điểm số chung cao nhất là 16,57 điểm. Với điểm này mẫu được xếp loại khá theo mức chất lượng đối với sản phẩm không dùng danh hiệu hạng ưu và hàm lượng đạm tổng số đạt 16 (g/l) được xếp hạng 1 theo yêu cầu chất lượng và kỹ thuật của sản phẩm nước mắm. Như vậy, tỷ lệ bã chượp 20% có thể được áp dụng vào quy trình sản xuất nước mắm.





Sơ đồ 2. Quy trình sản xuất thử nghiệm nước mắt từ dịch thủy phân phụ phẩm cá Tra

Tỷ lệ mỡ cá thu được từ quá trình thủy phân trong điều kiện tối ưu là 28,3%. Kết quả đánh giá chất lượng mỡ cá được trình bày trong bảng 10.

Bảng 10. Chất lượng mỡ cá sau thủy phân

Chỉ tiêu	Kết quả
Chỉ số acid, $X_A$ (mg KOH/g)	0,41
Chỉ số Peroxyt, $X_P$ (ml $Na_2S_2O_3$ )	0,47
Chỉ số Iod, $X_I$ (gI <sub>2</sub> /100g)	29,24
Tỷ trọng	0,84

Qua so sánh sơ bộ chất lượng mỡ thô thu được từ việc thủy phân cá Tra bằng enzyme protease với phương pháp rán và ly tâm ở bảng 11 thì mỡ thô thu được từ việc thủy phân bằng enzyme có chất lượng khá tốt.

Bảng 11. Ảnh hưởng của phương pháp khai thác đến chất lượng mỡ thô

Phương pháp	Phương pháp rán	Phương pháp ly tâm
Chỉ tiêu		
Chỉ số acid, $X_A$ (mg KOH/g)	3,04	0,4
Chỉ số Peroxyt, $X_P$ (ml $Na_2S_2O_3$ )	30,8	1,87
Chỉ số Iod, $X_I$ (gI <sub>2</sub> /100g)	65,35	68,72

(Hoàng Ngọc Song, 2006)

## KẾT LUẬN, ĐỀ NGHỊ

Bước đầu nghiên cứu tận dụng phụ phẩm của cá Tra bằng enzyme protease từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* cho thấy có nhiều ưu điểm như quá trình thủy phân tương đối đơn giản, hiệu suất cao, có thể thu hồi được nhiều sản phẩm khác nhau và chi phí tương đối thấp.

Điều kiện tối ưu cho việc thủy phân phụ phẩm cá Tra từ enzyme protease từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* như sau nhiệt độ 50<sup>0</sup>C, pH = 7,6, tỷ lệ nước 30%, nồng độ muối 2%, hoạt độ enzyme 50UI và thời gian thủy phân là 18 giờ.

Sản phẩm nước mắm thu được khi ủ ở tỷ lệ bã chượp 20% có hàm lượng đạm formol 14,5 g/l, đạm tổng số 16 g/l, đạm NH<sub>3</sub> 1,49 g/l và acid amin 12,81 g/l. Kiểm tra chỉ tiêu vi sinh đạt tiêu chuẩn và cảm quan đạt nước mắm loại khá, hạng nhất.

Khối lượng mỡ cá thu được chiếm tỷ lệ khoảng 28,5% với chất lượng tương đối tốt so với việc thu hồi bằng phương pháp rán và ly tâm.

Tuy nhiên trong quá trình thủy phân một số vấn đề cũng cần phải khắc phục để nâng cao chất lượng của sản phẩm sau thủy phân như mùi hôi trong quá trình thủy phân cũng như trong sản phẩm cuối cùng, chất lượng dịch thủy phân chưa cao do còn chứa nhiều tạp chất dẫn đến làm giảm chất lượng của sản phẩm cuối cùng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tài liệu tiếng Việt

Hoàng Ngọc Song, 2006. *Nghiên cứu ứng dụng mỡ cá da trơn. Luận văn tốt nghiệp Đại học, khoa công nghệ hóa học và dầu khí trường Đại Học Bách Khoa TP.HCM.*

Tổng Cục Tiêu Chuẩn – Đo Lường- Chất Lượng, 1990. *Phương pháp xác định hàm lượng nitrogen tổng số, nitrogen amin, nitrogen amôn và Protein tổng số*. TCVN 3706 – 1990, Hà Nội, Việt Nam.

Nguyễn Trọng Cẩn, Đỗ Minh Phụng, Nguyễn Anh Tuấn, 2006. *Nguyên liệu chế biến thủy sản*. NXB Nông Nghiệp.

#### **Tài liệu tiếng nước ngoài**

Buckow, R. (2006). Pressure And Temperature Effects On The Enzymatic Conversion Of Biopolymers. PhD Thesis. *Department Of Food Process Engineering And Food Biotechnology*. Berlin, The Berlin University Of Technology.

E.El Mayday, D. Paquet, J.P. Ramet and G. Linden, 1986. Proteolytic activity of a *Bacillus subtilis* neutral protease preparation upon caseins and whey proteins of cow's milk. *Journal of Dairy Science*, Vol. 69, No.2, 305 – 310.

E. M. El – Safey and U. M. Abdul-Raouf, 2004. Production, purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *Botany and Microbiology Department, Faculty of Science*, Al-Azhar University, Cairo.

Min – Tian Gao, MaKaTo Hirata, Eiichi Toorisaka, Tadashi Hano, 2005. *Acid hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation*. *Bioresource Technology* 97 (2006): 2414 – 2420.

M. Paul, B. Setlow and P. Setlow, 2006. *Killing of spores of Bacillus subtilis by tert-butyl hydroperoxide plus a TAML\_ activator*. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.

Abram Aertsen, Isabelle Van Opstal, Suzy C. Vanmuysen, Elke Y. Wuytack, Chris W. Michiels, 2005. *Screening for Bacillus subtilis mutants deficient in pressure induced spore germination: identification of ykvU as a novel germination gene*. *FEMS Microbiology Letters* 243 (2005) 385–391.

#### **Tài liệu internet**

Hiệp hội chế biến và xuất khẩu thủy sản Việt Nam (VASEP), 2006. Web site <[www.vasep.com.vn](http://www.vasep.com.vn)>.