

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**

PHÙNG VÕ CẨM HỒNG

**NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN SẢN PHẨM THỰC PHẨM TỪ
NGUYÊN LIỆU CÁ SÁU BẰNG KỸ THUẬT HÓA SINH**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9.42.02.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TP. Hồ Chí Minh - Năm 2022

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**

PHÙNG VÕ CẨM HỒNG

**NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN SẢN PHẨM THỰC PHẨM TỪ
NGUYÊN LIỆU CÁ SÁU BẰNG KỸ THUẬT HÓA SINH**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9.42.02.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. Lê Trung Thiên

PGS.TS Lê Đình Đôn

TP. Hồ Chí Minh - Năm 2022

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin trân trọng cảm ơn Đảng ủy – Ban Giám hiệu Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian học tập, nghiên cứu và thực hiện luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn tới Quý Thầy Cô trong Khoa Khoa học Sinh học và Khoa Công nghệ Hóa học và Thực Phẩm – Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM đã truyền đạt những kiến thức quý báu trong suốt thời gian khóa học.

Để hoàn thành được luận án này, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **PGS.TS Lê Trung Thiên** và **PGS.TS Lê Đình Đôn**, những người Thầy tâm huyết đã nhiệt tình hướng dẫn, động viên khích lệ, chỉ bảo và giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin được tỏ lòng biết chân thành đến TS. Bùi Ngọc Hùng; PGS.TS Lê Anh Đức và quý Thầy Cô Phòng Sau đại học Trường Đại học Nông Lâm Tp.HCM đã khích lệ và hỗ trợ tôi rất nhiều trong việc hoàn thành luận án này.

Đặc biệt, xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành nhất đến Ban Lãnh đạo Công ty TNHH Cá Sấu Hoa Cà (Quận 12, Tp. HCM) đã tạo điều kiện và hỗ trợ tôi rất nhiều trong các nghiên cứu này.

Tôi xin cảm ơn Ban Lãnh đạo, Quý Thầy cô, cán bộ nhân viên, đồng nghiệp tại Viện Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường – Trường Đại Học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh đã giúp đỡ, tạo điều kiện cho tôi hoàn thành được luận án.

Cuối cùng tôi xin dành tất cả sự yêu thương và lời cảm ơn chân thành nhất đến gia đình Ba mẹ, anh xã, các anh chị, các con, cháu và bạn bè đã luôn động viên giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu cũng như trong thời gian thực hiện luận án.

Tháng 05 năm 2022
Phùng Võ Cẩm Hồng

LỜI CAM ĐOAN

Tôi cam đoan những công bố trong luận án này là trung thực và là một phần trong đề tài cấp bộ mã số B2016 – NLS – 03 do tôi làm chủ nhiệm và đề tài cấp Sở Khoa học và Công Nghệ về “Phát triển các sản phẩm thực phẩm có giá trị gia tăng từ cá sấu” mà nghiên cứu sinh cũng là thành viên chính của đề tài và được sự cho phép của chủ nhiệm đề tài đồng thời cũng chính là hướng dẫn khoa học của luận án. Những số liệu trong luận án được phép công bố với sự đồng ý của cơ quan giao nhiệm vụ (duyet đề tài và cấp kinh phí).

Tác giả luận án

PHÙNG VĨ CẨM HỒNG

TÓM TẮT

Tên luận án: Nghiên cứu phát triển sản phẩm thực phẩm từ nguyên liệu cá sấu bằng kỹ thuật hóa sinh.

Tên tác giả: PHÙNG VÕ CẨM HỒNG

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9.42.02.01

Mục tiêu và đối tượng nghiên cứu

Mục tiêu: Cải tiến quy trình nấu cao xương cá sấu. Thiết lập được quy trình sản xuất sản phẩm: bột protein thịt cá sấu thủy phân, cao collagen xương cá sấu và đánh giá tác dụng hỗ trợ sức khỏe của sản phẩm dinh dưỡng lên sức khỏe chuột.

Đối tượng nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện trên mẫu nguyên liệu từ xương và thịt của cá sấu xiêm (*Crocodylus siamensis*).

Phương pháp nghiên cứu

- Luận án đã sử dụng nhiều phương pháp phân tích hiện đại để đánh giá các chỉ tiêu hóa lý, hóa sinh như kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp, điện di, quang phổ hấp thụ nguyên tử, phương pháp Kjeldahl, Bradford.
- Đánh giá tác dụng hỗ trợ sức khỏe của sản phẩm cao xương cá sấu lên cơ thể chuột bằng mô hình bơi kiệt sức Brekhman; Xác định LD₅₀ của sản phẩm cao xương cá sấu trên chuột nhắt trắng theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon. Đánh giá độc tính bán trường diễn của chuột thông phân tích đánh giá các chỉ tiêu huyết học và sinh hóa.

Kết quả và kết luận

✓ Sau khi so sánh và phân tích các thông số, qui trình nấu cao xương nhằm nâng cao hiệu suất trích ly collagen từ xương cá sấu của nghiên cứu này được chọn như sau: Trích ly collagen 2 lần ở 121°C, mỗi lần thực hiện 2 giờ. Dung dịch sau khi trích ly được cô đặc ở áp suất 0,8kg.cm⁻², 95°C. Sản phẩm nấu thử nghiệm được so sánh với sản phẩm của công ty ngoài thị trường thông qua các chỉ tiêu phân tích hóa lý: thời gian trích ly của nghiên cứu ngắn hơn (4 giờ so với 168 giờ), nhưng cho hiệu suất trích ly cao hơn (13,86% so với 7,28%) và hàm lượng collagen cao hơn (64,31% so với 61,37%). Ngoài ra, màu của sản phẩm nấu thử nghiệm đã được cải thiện, giảm độ màu so với nấu truyền thống, nhờ rút ngắn thời gian trích và cô đặc ở áp suất thấp, nhiệt độ thấp.

✓ So sánh mức độ thủy phân khi sử dụng ba loại enzyme khác nhau cho thấy enzyme neutral có hiệu quả thủy phân tốt hơn enzyme alcalase và flavourzyme đối với cơ chất là thịt cá sấu. Sau đó, tối ưu hóa quá trình thủy phân protein bằng enzyme neutral cho thấy với điều kiện: nhiệt độ: 61,8°C, pH: 7,5 và tỷ lệ enzyme /cơ chất: 3,3% sẽ cho mức độ thủy phân protein cao nhất là 39,70% và hoạt tính bất giữ gốc DPPH là 80%.

✓ Quá trình sấy phun dịch thủy phân protein từ thịt cá sấu đạt tốt nhất khi bổ sung chất trợ sấy maltodextrin với tỷ lệ 19,46% và nhiệt độ không khí sấy là 142,71°C. Với tốc độ bơm dòng nhập liệu được giữ cố định 10 ml.phút⁻¹, hiệu suất thu hồi bột sẽ đạt 69,51%, hiệu suất thu hồi protein đạt 76,94%. Trong điều kiện trên, các chỉ tiêu chất lượng của bột như độ ẩm, hoạt tính kháng oxy hóa lần lượt đạt giá trị 5,33% và 1,87 mg.ml⁻¹.

✓ Đối với sản phẩm bột dinh dưỡng có bổ sung 40% đường, 1,5% acid ascorbic và 12% bột gừng cho có kết quả cảm quan (màu, mùi, vị) tốt nhất. Sản phẩm sau khi phối trộn từ cao xương và thịt cá sấu thủy phân được phân tích lý hóa, hóa sinh và vi sinh cho thấy có hàm lượng dinh dưỡng cao, đạt tiêu chuẩn an toàn về vi sinh vật và kim loại nặng.

✓ Cao cá sấu và nhóm sản phẩm dinh dưỡng bổ sung cao xương cá sấu không thể hiện độc tính cấp và bán trường diễn trên chuột thí nghiệm với liều uống cao nhất là 37 g.kg⁻¹ cao loại tủy, 36,75 g.kg⁻¹ bột thủy phân, 36,65 g.kg⁻¹ bột dinh dưỡng.

✓ Nhóm sản phẩm bột dinh dưỡng cá sấu liều 1,84 g.kg⁻¹ và 3,68 g.kg⁻¹ đều thể hiện tác dụng hỗ trợ sức khỏe cao khi thử nghiệm trên mô hình chuột bơi kiệt sức và tác dụng tạo độ bền chắc cho xương chuột thí nghiệm. Kết quả này không khác biệt so với nhóm cao thô xương cá sấu.

Hướng dẫn khoa học

Nghiên cứu sinh

PGS.TS Lê Trung Thiên PGS.TS Lê Đình Đôn

Phùng Võ Cẩm Hồng

SUMMARY

Thesis title: Development of food products from crocodile meat and bones by using biochemical techniques

PhD candidate PHUNG VO CAM HONG

Field of study Biotechnology **Code:** 9.42.02.01

Research objectives and objects

Research objectives: To improve the cooking process for collagen extraction from crocodile bone; To establish production process for products: hydrolysate protein from crocodile meat and collagen extraction from crocodile bone; To evaluate the pharmacology effects and safety of nutritional products were assessed on laboratory mice.

Research object: the study was carried out on material samples from the bone and meat of Siamese crocodile (*Crocodylys siamensis*).

Research methods

- It was an experimental study using modern analytical methods to evaluate physicochemical and biochemical parameters such as chromatography technique, electrophoresis, atomic absorption spectroscopy, Kjeldahl method, Bradford method.

- It was evaluated of pharmacological effects of nutritional supplement products on mice by Brekhman exhaustion swimming model, determined of LD₅₀ of nutritional supplement products in mice by Litchfield-Wilcoxon method, and assessed of sub-chronic toxicity of mice by hematological and biochemical factors.

Results and conclusions

- ✓ According to the results of the experiments, the collagen extraction process from crocodile bone was recommended as following: The result of the experiment the authors recommended testing the cooking process. Extract 2 times at 121°C, 2 hours each time cook. After extraction, the solution is concentrated in pressure - 0.8kg.cm⁻², at 95°C. The cooking test product to be compared with the Company through analysis. Time cooking at 4 hours was compared to 168 hours of company, the extraction time is shorter than the

company's, but the recovery yield (13.86%) is higher than 7.28% of company. Besides that, collagen extraction is also higher than 64.31% compared to the Company 61.37%. The color of the cooked testing has improved. It reduced compared to traditional cooking by shortening extracted and condensed at low temperature, low pressure.

- ✓ When conducting protein hydrolysate from crocodile meat, the neutral enzyme had the highest degree of hydrolysis comparing to ones of the alcalase and flavourzyme enzymes. The optimal conditions of neutral enzyme of 61.8°C, pH of 7.5, and enzyme/ substrate ratio at 3.3% resulted in maximum degree of hydrolysis (39,70%) and the highest of DPPH radical scavenging activity (80%).
- ✓ The spray drying process of protein hydrolysate from crocodile meat had the best results when the conditions of spray-dried powder were found at maltodextrin concentration of 19.47%, inlet air temperature of 142.71°C, and input feed flow rate of 10 mL.min⁻¹. These conditions correspond to the recovery of dry matter of 69.51%, protein recovery yield of 76.94%, powder humidity of 5.33%, and powder antioxidant activity of 1.87 mg.mL⁻¹.
- ✓ A nutritional supplement powder was added to sugar of 40%, ascorbic acid of 1.5%, and ginger powder of 12% for the best organoleptic results. Products from collagen extraction of crocodile bone and protein hydrolysate of crocodile meat had high nutritional content. They reached the limits of quality control standards about microbiological contamination and heavy metal content.
- ✓ The experiments were conducted to evaluate the acute and sub-chronic toxicity of collagen extraction and spray drying powder products from crocodile bone in mice. Both toxicity tests were not determined toxic in mice at the highest dose of 37 g.kg⁻¹ of collagen extraction of crocodile bone, 36.75 g.kg⁻¹ of hydrolysate powder, and 36.65 g/kg⁻¹ of nutritional supplement powder.
- ✓ Nutritional supplement powder from crocodile bone, which added at dose of 1.84 g.kg⁻¹ and 3.68 g.kg⁻¹ showed high pharmacological effects with the

forced swim test in mice. It also created effects on strength for the bones of laboratory mice. This result was not significantly different compared to collagen extraction of crocodile bones without additives.

Supervisors

PhD. candidate

Assoc.Prof.Dr. Le Trung Thien

Phung Vo Cam Hong

Assoc.Prof.Dr. Le Dinh Don

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	I
TÓM TẮT	III
SUMMARY	V
MỤC LỤC	VIII
DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT	XV
DANH SÁCH CÁC BẢNG	XVII
DANH SÁCH CÁC HÌNH	XX
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1 Tổng quan về cá sấu	5
1.1.1 Phân loại khoa học	5
1.1.2 Vị trí, phân loại và phân bố của cá sấu.....	5
1.1.2.1 Cá sấu Hoa Cà (<i>crocodylus prosus</i>)	6
1.1.2.2 Cá sấu Xiêm (<i>crocodylus siamensis</i>)	6
1.1.3 Tình hình chăn nuôi cá sấu trên thế giới và Việt Nam.....	6
1.1.3.1 Tình hình nuôi cá sấu trên thế giới.....	6
1.1.3.2 Tình hình nuôi cá sấu tại Việt Nam.....	7
1.2 Sản phẩm từ cá sấu	8
1.2.1 Da cá sấu	8
1.2.2 Thịt cá sấu	8
1.2.3 Các sản phẩm phụ khác của cá sấu	9
1.3 Thành phần dinh dưỡng chính trong thịt cá sấu	9
1.4 Tổng quan về xương.....	10
1.4.1 Cấu trúc của xương	10
1.4.2 Một số ứng dụng của xương cá sấu.....	11
1.5 Tổng quan về collagen.....	13
1.5.1 Giới thiệu collagen	13
1.5.2 Phân loại collagen	13
1.5.3 Cấu trúc collagen.....	13

1.5.4 Một số tính chất của collagen.....	17
1.5.4.1 Hoạt tính kháng oxi hóa	17
1.5.4.2 Khả năng trương nở và hòa tan	17
1.5.4.3 Tác dụng với kiềm và acid	18
1.5.4.4 Sự biến tính	18
1.5.4.5 Điểm đẳng điện (pI)	18
1.5.5 Các phương pháp trích ly collagen.....	18
1.5.5.1 Trích ly collagen bằng phương pháp sinh học	18
1.5.5.2 Trích ly collagen bằng phương pháp hóa học	19
1.5.5.3 Trích ly kết hợp giữa sinh học và hóa học	19
1.5.5.4 Trích ly collagen bằng phương pháp vật lý.....	19
1.5.6 Ứng dụng kỹ thuật mới trong trích ly collagen.....	19
1.5.6.1 Sóng siêu âm	19
1.5.6.2 Vi sóng	20
1.5.7 Các phương pháp xác định hàm lượng collagen	21
1.5.8 Ứng dụng của collagen.....	22
1.5.8.1 Ứng dụng trong mỹ phẩm	22
1.5.8.2 Ứng dụng trong dược phẩm và y học	22
1.5.8.3 Ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm.....	23
1.5.8.4 Trong công nghệ sản xuất kẹo.....	23
1.5.8.5 Trong công nghiệp sản xuất sữa và các sản phẩm từ sữa.....	23
1.5.8.6 Trong công nghiệp sản xuất đồ uống	23
1.6 Tổng quan về thủy phân	24
1.6.1 Các phương pháp thủy phân protein	24
1.6.1.1 Thủy phân bằng acid	24
1.6.1.2 Thủy phân bằng kiềm.....	25
1.6.1.3 Thủy phân bằng enzyme	25
1.6.2 Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân bằng enzyme protease.....	25
1.6.2.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ	25
1.6.2.2 Ảnh hưởng của pH	26
1.6.2.3 Ảnh hưởng nồng độ enzyme và nồng độ cơ chất.....	26

1.6.2.4 Ảnh hưởng của thời gian thủy phân	26
1.6.2.5 Ảnh hưởng của diện tích tiếp xúc	26
1.6.3 Ứng dụng protein thủy phân.....	27
1.7 Tổng quan về enzyme protease	28
1.7.1 Giới thiệu chung về enzyme protease	29
1.7.2 Phân loại protease.....	29
1.7.3 Cơ chế xúc tác của enzyme protease.....	30
1.7.4 Phương pháp thủy phân bằng enzyme protease	31
1.8 Tình hình nghiên cứu thủy phân protein dùng enzyme	31
1.8.1 Trên thế giới	31
1.8.2 Trong nước	34
1.9 Tổng quan về sấy phun	35
1.9.1 Nguyên lý sấy phun.....	35
1.9.2 Chất trợ sấy.....	35
1.9.3 Cơ chế làm giảm hiện tượng bám dính của chất trợ sấy	35
1.9.4 Các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm bột sấy phun	36
1.9.4.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ	36
1.9.4.2 Ảnh hưởng của tốc độ bơm dòng nguyên liệu	36
1.9.4.3 Ảnh hưởng của hàm lượng chất trợ sấy	36
1.9.5 Tình hình nghiên cứu quá trình sấy phun trong nước và trên thế giới.....	37
1.10 Ứng dụng kết quả nghiên cứu tác dụng hỗ trợ sức khỏe của sản phẩm trên động vật thí nghiệm	38
1.10.1 Các nghiên cứu ngoài nước	39
1.10.2 Các nghiên cứu trong nước	40
CHƯƠNG 2 . VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU 42	
2.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	42
2.2 Nguyên vật liệu	42
2.3 Thiết bị và dụng cụ.....	43
2.4 Nội dung nghiên cứu	43
2.5 Phương pháp nghiên cứu.....	44
2.5.1 Xác định thành phần trong xương cá sấu	44

2.5.2 Cải thiện qui trình nấu cao truyền thống từ xương cá sấu	45
2.5.2.1 Sơ bộ đánh giá ảnh hưởng của các cách xử lý đến hàm lượng collagen trích ly	46
2.5.2.2 So sánh các phương pháp trích ly collagen từ xương cá sấu khi nấu ở áp suất khí quyển.....	48
2.5.2.3 So sánh các phương pháp trích ly collagen từ xương cá sấu khi nấu ở áp suất cao	49
2.5.2.4 Khảo sát thời gian nấu cần thiết ở áp suất khí quyển và áp suất cao	50
2.5.2.5 Khảo sát ảnh hưởng của áp suất chân không đến quá trình cô đặc dịch collagen.....	51
2.5.2.6 Đề xuất quy trình nấu cao xương cá sấu cải tiến.....	51
2.5.3 Nghiên cứu thủy phân protein thịt cá sấu.....	52
2.5.3.1 Khảo sát ảnh hưởng của loại enzyme đến mức độ thủy phân protein thịt cá sấu.....	53
2.5.3.2 Tối ưu hóa quá trình thủy phân bằng enzyme lựa chọn	55
2.5.4 Nghiên cứu sấy phun dịch protein thịt cá sấu thủy phân thành bột	56
2.5.4.1 Khảo sát ảnh hưởng của các thông số sấy phun đến các chỉ tiêu chất lượng của bột sấy phun	57
2.5.4.2 Tối ưu hóa nhiệt độ không khí sấy và nồng độ maltodextrin để quá trình sấy phun dịch thủy phân hiệu quả nhất	57
2.5.5 Nghiên cứu công thức sản phẩm dinh dưỡng bổ sung cao cá sấu.....	58
2.5.5.1 Nghiên cứu công thức sản phẩm dinh dưỡng bổ sung cao cá sấu.....	58
2.5.5.2 Đánh giá cảm quan sản phẩm, thành phần hoá lý, khoáng và vi sinh của sản phẩm bổ sung cao cá sấu	61
2.5.6 Nghiên cứu độc tính của sản phẩm bổ sung cao cá sấu	61
2.5.6.1 Xác định độc tính cấp.....	61
2.5.6.2 Xác định độc tính bán trường diễn.....	62
2.5.7 Nghiên cứu tác dụng hỗ trợ sức khỏe của sản phẩm bổ sung cao cá sấu.....	63
2.5.7.1 Đánh giá khả năng tăng lực (mô hình chuột bơi kiệt sức Brekhman)	63
2.5.7.2 Đánh giá khối lượng chuột và chiều dài cơ thể chuột.....	65

2.5.7.3 Đánh giá ảnh hưởng của sản phẩm bổ sung cao cá sấu lên xương chuột (chiều dài, độ chắc và độ đàn hồi của xương).....	65
2.6 Các phương pháp phân tích	65
2.6.1 Phân tích hóa lý	65
2.6.1.1 Phân tích hàm lượng collagen trong xương bằng kỹ thuật HPLC	65
2.6.1.2 Phân tích tổng protein bằng phương pháp Kjeldahl.....	66
2.6.1.3 Phân tích protein hòa tan bằng phương pháp Bradford	66
2.6.1.4 Phân tích mức độ thủy phân protein dùng phương pháp kết tủa với TCA	66
2.6.1.5 Xác định hoạt tính kháng oxy hóa bằng gốc tự do ABTS	66
2.6.1.6 Xác định khả năng bắt gốc tự do DPPH.....	66
2.6.1.7 Hàm lượng tro toàn phần bằng phương pháp nung ở 600°C	66
2.6.1.8 Hàm lượng ẩm bằng phương pháp sấy ở 105°C	67
2.6.1.9 Hiệu suất thu hồi vật chất khô và thu hồi protein	67
2.6.1.10 Phân tích màu	67
2.6.1.11 Phân tích cảm quan, khoáng chất và kim loại nặng	67
2.6.2 Phân tích vi sinh	67
2.7 Xử lý số liệu	68
CHƯƠNG 3 . KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	69
3.1 Thành phần hóa lý trong xương cá sấu.....	69
3.1.1 Thành phần cơ bản của xương nguyên liệu.....	69
3.1.2 Thành phần amino acid và hàm lượng collagen của xương nguyên liệu.....	69
3.1.3 Thành phần khoáng chất, kim loại trong xương cá sấu nguyên liệu.....	71
3.2 Cải thiện qui trình nấu cao truyền thống để nâng cao hàm lượng collagen thu được trong cao cá sấu	72
3.2.1 Kết quả sơ bộ đánh giá ảnh hưởng của các xử lý đến quá trình trích ly collagen.....	72
3.2.1.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình trích ly collagen.....	72
3.2.1.2 Ảnh hưởng của siêu âm đến quá trình trích ly collagen.....	73
3.2.1.3 Ảnh hưởng của vi sóng đến quá trình trích ly collagen	74
3.2.1.4 Ảnh hưởng của áp suất cao đến quá trình trích ly collagen	76
3.2.2 So sánh các phương pháp xử lý khi nấu ở áp suất khí quyển	77

3.2.3 So sánh các phương pháp xử lý khi nấu ở áp suất cao.....	78
3.2.4 Thời gian cần khi nấu ở điều kiện áp suất khí quyển và áp suất cao	79
3.2.5 Ảnh hưởng của áp suất chân không đến quá trình cô đặc dịch collagen	81
3.2.6 Quy trình nấu cao xương cá sấu cải tiến	82
3.2.7 Thành phần hóa lý, hàm lượng amino acid mẫu cao khi áp dụng quy trình nấu đề xuất	83
3.2.8 Thành phần chất khoáng, kim loại trong cao sau khi áp dụng quy trình nấu đề xuất	85
3.3 Nghiên cứu thủy phân protein thịt cá sấu.....	86
3.3.1 Ảnh hưởng của các enzyme đến quá trình thủy phân protein thịt cá sấu.....	86
3.3.1.1 Thủy phân bằng enzyme neutral	87
3.3.1.2 Thủy phân bằng enzyme alcalase.....	90
3.3.1.3 Thủy phân bằng flavourzyme.....	92
3.3.1.4 So sánh ba loại enzyme	95
3.3.2 Tối ưu hóa thủy phân protein thịt cá sấu bằng enzyme neutral	96
3.3.3 Hoàn thiện quy trình thủy phân protein từ thịt cá sấu	103
3.4 Nghiên cứu sấy phun dịch protein thịt cá sấu thủy phân thành bột	104
3.4.1 Khảo sát ảnh hưởng của maltodextrin đến hiệu suất thu hồi chất khô, protein và các đặc tính của bột sấy phun	104
3.4.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ không khí sấy đến hiệu suất thu hồi chất khô, protein và đặc tính của bột sấy phun	106
3.4.3 Ảnh hưởng của tốc độ dòng nhập liệu đến hiệu suất thu hồi chất khô, protein và các đặc tính của bột sau sấy phun.....	109
3.4.4 Tối ưu hóa các điều kiện sấy phun để đạt hiệu suất thu hồi chất khô và protein cao nhất, hàm lượng ẩm thấp nhất	110
3.5 Nghiên cứu công thức sản phẩm dinh dưỡng có bổ sung cao cá sấu.....	114
3.5.1 Công thức sản phẩm dinh dưỡng từ cao cá sấu.....	114
3.5.1.1 Hàm lượng đường bổ sung	114
3.5.1.2 Hàm lượng acid ascorbic bổ sung vào sản phẩm	115
3.5.1.3 Kết quả khảo sát tỷ lệ bột gừng.....	116
3.5.1.4 Mẫu sản phẩm thử nghiệm	116

3.5.2 Kết quả đánh giá cảm quan, thành phần hoá lý, khoáng và vi sinh của sản phẩm bột dinh dưỡng.....	117
3.5.2.1 Đánh giá cảm quan sản phẩm bột dinh dưỡng	117
3.5.2.2 Thành phần cơ bản của sản phẩm bột dinh dưỡng bổ sung	118
3.5.2.3 Hàm lượng amino acid và collagen của sản phẩm bột dinh dưỡng bổ sung	118
3.5.2.4 Thành phần khoáng chất và kim loại trong sản phẩm bột dinh dưỡng	120
3.5.2.5 Hàm lượng vi sinh các sản phẩm bột dinh dưỡng.....	121
3.6 Nghiên cứu độc tính của các sản phẩm cao xương cá sấu	122
3.6.1 Nghiên cứu độc tính cấp của các sản phẩm cao xương cá sấu.....	122
3.6.1.1 Biến động về khối lượng	122
3.6.1.2 Đặc điểm sinh lý của chuột sau thử nghiệm và giá trị LD ₅₀	123
3.6.2 Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của các sản phẩm cao xương cá sấu	124
3.6.2.1 Thông số huyết học trong máu chuột sau khi sử dụng các sản phẩm cao xương cá sấu	124
3.6.2.2 Thông số chức năng gan.....	127
3.6.2.3 Thông số chức năng thận.....	129
3.6.2.4 Chỉ tiêu cholesterol và triglycerid trong máu chuột thí nghiệm.....	130
3.6.2.5 Khối lượng tim, gan, thận và khảo sát vi thể	132
3.7 Nghiên cứu tác dụng hỗ trợ sức khỏe của sản phẩm cao xương cá sấu ..	135
3.7.1 Đánh giá khả năng tăng lực (mô hình chuột bơi kiệt sức Brekhman)	135
3.7.2 Đánh giá khối lượng chuột và chiều dài cơ thể chuột.....	136
3.7.3 Đánh giá ảnh hưởng của sản phẩm cao lên độ bền chắc của xương chuột .	137
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	139
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	142
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	143
PHỤ LỤC	151

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Hành chính

AOAC	Association of Official Analytical Chemists (Hiệp hội các nhà phân tích hóa học)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Tổ chức Nông lương Liên hợp quốc (FAO))
NNPTNT	Nông Nghiệp Phát Triển Nông Thôn

Hóa chất – Phương pháp

BC	Blood Cell (tế bào máu)
CRD	Complete Randomized Design (kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên)
DH	Degree of hydrolysis (mức độ thủy phân)
DE	Dextrose equivalence (đương lượng dextrose)
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
GA	Gum Abrabic
GOT	Glutamat Oxaloacetat Transaminase
GPT	Glutamat Pyruvat Transaminase
HCT	Hematocrit
HGB	Hemoglobin
LD ₅₀	Lethal Dose, 50% (liều gây chết, 50%)
LOD	Limit of Detection (giới hạn phát hiện)
LOQ	Limit of Quantitation (giới hạn định lượng)
OD	Optical density (mật độ quang)
RSD	Ralative standard deviation (độ lệch chuẩn tương đối)
S/N	Signal/Noise (tín hiệu/ nhiễu nền)
SD	Standard deviation (độ lệch chuẩn)
TCA	Trichloroacetic Acid
v/ w	Thể tích/ khối lượng
WPC	Whey Protein Concentration
WPI	Whey Protein Isolate

Thiết bị

AAS	Atomic Absorption Spectrophotometric (quang phổ hấp thụ nguyên tử)
HPLC	High performance liquid chromatography (sắc ký lỏng cao áp)
UV – VIS	Ultraviolet – Visible Spectroscopy (quang phổ tử ngoại khả kiến)

Nhóm khác

BDD	Bột collagen thủy phân + bột protein thủy phân bổ sung gừng, đường
BTP	Bột collagen thủy phân + bột protein thủy phân
CCLT	Cao từ xương chưa loại tủy
CLT	Cao từ xương đã loại tủy
CTV	Cộng tác viên
ĐC	Đối chứng
KPH	Không phát hiện
TB	Trung bình
XCLT	Xương chưa loại tủy
XLT	Xương loại tủy

DANH SÁCH CÁC BẢNG

Bảng 1-1. Thành phần hóa học từ các bộ phận thịt của cá sấu sông Nile (g.kg^{-1}) ...	9
Bảng 1-2. Hàm lượng amino acid của thịt nạc cá sấu (g.kg^{-1} , trên vật chất khô)..	10
Bảng 1-3. Hàm lượng amino acid tự do trong dịch trích từ xương cá sấu trích bằng phương pháp acid acetic và enzyme pepsin	16
Bảng 1-4. Thành phần của collagen từ gân bò và xương gà.....	17
Bảng 1-5. Hệ số ngoại suy giữa người và các loài động vật thí nghiệm về liều có hiệu quả tương đương	39
Bảng 2-1. Chỉ tiêu phân tích trong các thí nghiệm về nấu trích ly collagen	46
Bảng 2-2. Ảnh hưởng phương pháp xử lý ở các nhiệt độ và thời gian nấu khác nhau	50
Bảng 2-3. Bố trí thí nghiệm lựa chọn enzyme protease.....	53
Bảng 2-4. Bố trí thí nghiệm thủy phân với enzyme neutral	54
Bảng 2-5. Bố trí thí nghiệm thủy phân với enzyme alcalase	54
Bảng 2-6. Bố trí thí nghiệm thủy phân với enzyme flavourzyme	54
Bảng 2-7. Bảng mã hóa giá trị của các yếu tố nhiệt độ, pH và tỷ lệ enzyme.	55
Bảng 2-8. Ma trận mã hóa thí nghiệm Box-Behken.....	55
Bảng 3-1. Thành phần hóa lý của xương trước và sau loại tủy	69
Bảng 3-2. Thành phần amino acid trong xương trước và sau loại tủy	70
Bảng 3-3. Hàm lượng hydroxylprolin và collagen trong mẫu xương trước và sau loại tủy	71
Bảng 3-4. Kết quả phân tích một số thành phần khoáng chất, kim loại trong mẫu xương cá sấu trước và sau loại tủy.....	71
Bảng 3-5. Thành phần hóa lý mẫu cao nấu thử nghiệm	83
Bảng 3-6. Thành phần amino acid trong mẫu cao nghiên cứu từ xương cá sấu....	84
Bảng 3-7. Hàm lượng Hydroxylprolin và collagen trong mẫu cao từ xương cá sấu	85
Bảng 3-8 Thành phần chất khoáng, kim loại trong mẫu cao nghiên cứu	85
Bảng 3-9. Mức độ thủy phân sau 9 giờ của ba enzyme ở điều kiện thủy phân (tỷ lệ enzyme, nhiệt độ, pH) đã thăm dò	95

Bảng 3-10. Các mức thí nghiệm với ba biến $X_1(T)$, $X_2(pH)$, $X_3 (E/S)$	96
Bảng 3-11. Bảng bố trí thí nghiệm.	97
Bảng 3-12. Hệ số hồi quy và giá trị p của các chỉ tiêu theo dõi	98
Bảng 3-13. Kết quả dự đoán và thực tế các đáp ứng theo dõi	102
Bảng 3-14 Ảnh hưởng của nồng độ maltodextrin đến việc thu hồi chất khô, thu hồi protein, tổng hàm lượng protein và độ ẩm của bột sấy phun.....	104
Bảng 3-15. Ảnh hưởng của nhiệt độ không khí sấy đến hiệu suất thu hồi chất khô, protein, tổng protein, độ ẩm và khả năng kháng oxy hóa của bột sấy phun.....	107
Bảng 3-16. Ảnh hưởng của dòng nhập liệu đến hiệu suất thu hồi chất khô, protein, protein tổng, độ ẩm của bột sấy phun	109
Bảng 3-17. Ảnh hưởng của nhiệt độ không khí sấy và nồng độ maltodextrin đến hiệu suất thu hồi chất khô, protein, độ ẩm của bột sấy phun	111
Bảng 3-18. Phương trình hồi quy dạng đường cong của bề mặt các đáp ứng.....	112
Bảng 3-19. Giá trị thực tế và giá trị dự đoán tối ưu của các đáp ứng.....	114
Bảng 3-20 Đánh giá cảm quan khi khảo sát ở các nồng độ đường 38%, 40% và 42%	115
Bảng 3-21. Ảnh hưởng của tỉ lệ acid ascorbic đến vị sản phẩm.....	115
Bảng 3-22. Ảnh hưởng tỉ lệ bột gừng đến chất lượng cảm quan sản phẩm	116
Bảng 3-23. Thành phần của gói thành phẩm 5g	117
Bảng 3-24. Kết quả đánh giá cảm quan bột thủy phân đối chứng và bột dinh dưỡng (Bột collagen và bột protein bổ sung đường, gừng).....	117
Bảng 3-25. Kết quả phân tích một số thành phần hóa lý của bột thủy phân đối chứng và bột dinh dưỡng	118
Bảng 3-26 Hàm lượng amino acid trong bột thủy phân đối chứng và bột dinh dưỡng	119
Bảng 3-27 Hàm lượng Hydroxylprolin và collagen trong mẫu bột thủy phân đối chứng và bột dinh dưỡng	119
Bảng 3-28. Thành phần khoáng chất, hàm lượng kim loại trong mẫu bột thủy phân đối chứng và bột dinh dưỡng	120

Bảng 3-29. Hàm lượng vi sinh trong các sản phẩm bột dinh dưỡng và đối chứng	121
Bảng 3-30. Khối lượng của chuột trước và sau thử nghiệm độc tính cấp	122
Bảng 3-31. Phân suất tử vong của chuột trong thí nghiệm độc tính cấp tính	123
Bảng 3-32. Số lượng hồng cầu trong máu chuột ở các lô thí nghiệm	125
Bảng 3-33. Hàm lượng hemoglobine trong máu chuột các thí nghiệm	125
Bảng 3-34. Hàm lượng hematocrit trong máu chuột ở các thí nghiệm	126
Bảng 3-35. Số lượng bạch cầu trong máu chuột ở các lô thí nghiệm	126
Bảng 3-36. Số lượng tiểu cầu trong máu chuột ở các lô thí nghiệm	127
Bảng 3-37. Nồng độ bilirubin trong máu chuột ở các lô thí nghiệm	128
Bảng 3-38. Chỉ số GOT trong máu chuột ở các lô thí nghiệm	128
Bảng 3-39. Chỉ số GPT trong máu chuột ở các lô thí nghiệm	128
Bảng 3-40. Hàm lượng protein toàn phần trong máu chuột ở các lô thí nghiệm	129
Bảng 3-41. Chỉ số urea trong máu chuột ở các lô thí nghiệm	129
Bảng 3-42. Chỉ số Creatinin trong máu chuột ở các lô thí nghiệm	130
Bảng 3-43. Chỉ số cholesterol trong máu chuột ở các lô thí nghiệm	131
Bảng 3-44. Chỉ số Triglycerid trong máu chuột ở các lô thí nghiệm	131
Bảng 3-45. Tỉ trọng gan, tim, thận so với khối lượng cơ thể chuột ở các lô thí nghiệm	132
Bảng 3-46. Lực gãy xương của các lô chuột thí nghiệm khi dùng sản phẩm cao	137

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình 1.1. Xương cá sấu đã loại tủy, chất béo và thịt.....	11
Hình 1.2 Cấu trúc của collagen	15
Hình 1.3. Sản phẩm bổ sung collagen của công ty cá sấu Hoa Cà: Siro, kẹo và rượu	24
Hình 1.4. Phản ứng phân cắt mạch peptide.	24
Hình 1.5: Các sản phẩm trung gian của quá trình thủy phân protein	31
Hình 2.1. (a) Thịt cá sấu đông lạnh (b) Mẫu xương cá sấu với kích thước ≤ 4 mm	42
Hình 2.2. Sơ đồ nấu trích ly collagen và các thí nghiệm.....	45
Hình 2.3. Sơ đồ quy trình thủy phân protein thịt cá sấu.....	52
Hình 2.4. Qui trình chế biến thí nghiệm	59
Hình 2.5. Chuột trong mô hình bơi kiệt sức	64
Hình 3.1. Hàm lượng collagen, độ sáng, mức độ thủy phân trong dịch trích khi nấu trích mẫu trong 8 giờ, ở các nhiệt độ khác nhau	73
Hình 3.2. Hàm lượng collagen, độ sáng, mức độ thủy phân trong dịch trích khi nấu trích mẫu xương ở 100°C, khác thời gian siêu âm	74
Hình 3.3. Hàm lượng collagen, độ sáng, mức độ thủy phân trong dịch trích khi nấu trích mẫu xương ở 100°C, xử lý vi sóng trong 10 phút, nấu ở 8 giờ, khác công suất vi sóng	75
Hình 3.4. Hàm lượng collagen, độ sáng, mức độ thủy phân trong dịch trích khi nấu trích mẫu xương ở 100°C, khác thời gian nấu.....	76
Hình 3.5. Hàm lượng collagen, độ sáng, DPPH, mức độ thủy phân trong dịch trích khi so sánh các phương pháp xử lý mẫu khác nhau: ở 100°C, khác thời gian nấu.	78
Hình 3.6. Hàm lượng collagen, độ sáng, DPPH, mức độ thủy phân trong dịch trích khi nấu trích mẫu xương ở 121°C, áp suất cao, khác thời gian nấu....	79
Hình 3.7. Hiệu quả của việc xử lý vi sóng khi sử dụng số lần nấu trích khác nhau của mẫu xương cá sấu	80

Hình 3.8. Hàm lượng collagen trong dịch trích khi nấu mẫu xương trong 2 giờ/ 110°C, không xử lý vi sóng.	81
Hình 3.9. Hàm lượng DPPH, độ sáng, thời gian cô đặc của sản phẩm cô đặc ở áp suất khác nhau	81
Hình 3.10. Sơ đồ qui trình đề xuất nấu cao thử nghiệm.....	82
Hình 3.11 Mức độ thủy phân thịt cá sấu theo thời gian ở các tỉ lệ bổ sung enzyme neutral khác nhau	87
Hình 3.12. Độ thủy phân thịt cá sấu bằng enzyme neutral ở nhiệt độ khác nhau sau 9 giờ.....	88
Hình 3.13. Ảnh hưởng pH đến mức độ thủy phân bằng enzyme neutral sau 9 giờ.	89
Hình 3.14. Độ thủy phân thịt cá sấu theo thời gian ở các tỉ lệ bổ sung enzyme alcalase khác nhau.....	90
Hình 3.15. Độ thủy phân thịt cá sấu bằng enzyme alcalase ở nhiệt độ khác nhau sau 9 giờ.	91
Hình 3.16. Ảnh hưởng của pH đến mức độ thủy phân bằng enzyme alcalase sau 9 giờ.....	92
Hình 3.17. Độ thủy phân thịt cá sấu theo thời gian ở các tỉ lệ bổ sung enzyme flavourzyme khác nhau.	93
Hình 3.18. Độ thủy phân thịt cá sấu bằng enzyme flavourzyme ở nhiệt độ khác nhau sau 9 giờ	94
Hình 3.19. Ảnh hưởng của pH đến mức độ thủy phân bằng enzyme flavourzyme sau 9 giờ	94
Hình 3.20. Tương quan của độ thủy phân và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH dự đoán cho quá trình thủy phân.....	98
Hình 3.21. Ảnh hưởng của a) nhiệt độ và pH; b) nhiệt độ và tỷ lệ enzyme; c) pH và tỷ lệ enzyme lên độ thủy phân.....	100
Hình 3.22. Ảnh hưởng của a) nhiệt độ và pH; b) nhiệt độ và tỷ lệ enzyme; c) pH và tỷ lệ enzyme lên hoạt tính bắt giữ gốc DPPH	101
Hình 3.23. Chế độ thủy phân tối ưu cho protein từ thịt cá sấu.....	101
Hình 3.24. Hình ảnh điện di dịch trước và sau thủy phân.....	103

Hình 3.25. Sơ đồ qui trình thủy phân protein từ thịt cá sấu hoàn thiện.....	103
Hình 3.26 Mối tương quan giữa giá trị dự đoán và giá trị thực nghiệm.....	113
Hình 3.27. Mẫu sau khi sấy được chụp bằng kính hiển vi điện tử SEM.....	114
Hình 3.28. Tiêu bản vi thể gan, tim, thận chuột ở các lô nghiên cứu.....	133
Hình 3.29. Tỷ lệ % thời gian bơi ở các thời điểm $T_{1\text{giờ}}$, $T_{7\text{ngày}}$, $T_{14\text{ngày}}$ so với T_0 ở các lô thử nghiệm.....	135
Hình 3.30. Biến đổi khối lượng các nhóm chuột trong quá trình uống cao và thực phẩm bổ sung cao cá sấu.....	136

MỞ ĐẦU

Tình hình chăn nuôi cá sấu vì mục đích thương mại ở Thành phố Hồ Chí Minh phát triển nhanh trong những năm gần đây. Do TP.HCM và các vùng lân cận là nơi có điều kiện khí hậu phù hợp cho sự phát triển và sinh trưởng của cá sấu, việc phát triển các trại nuôi này có thể xem như một trong những biện pháp phát triển kinh tế. Theo các số liệu được công bố, hiện nay Việt Nam có trên 1.000 trại cá sấu với quy mô khác nhau từ một vài cá thể tới những trại có hàng nghìn cá thể (Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Tp.HCM, 2011). Năm 2020 tổng đàn cá sấu trên địa bàn TP.HCM còn 90.000 con, giảm một nửa so với giai đoạn 2011-2016. Để tạo điều kiện phát triển nghề nuôi cá sấu, góp phần cải thiện đời sống người dân ngoại thành, nâng cao giá trị sản xuất nông nghiệp. UBND TP.HCM ban hành Chương trình phát triển quản lý, phát triển cá sấu trong giai đoạn 2021-2025 (UBND – TP.HCM, 2021).

Hiện nay, lợi nhuận chủ yếu của người sản xuất cá sấu đến từ bộ da của cá sấu. Trong khi đó các bộ phận có tiềm năng khác như thịt, xương chưa được quan tâm, xem như là một phụ phẩm của ngành chăn nuôi, do đó các bộ phận này cần được khai thác để tăng giá trị từ ngành chăn nuôi và giết mổ cá sấu.

Xương là một hệ thống được tái cấu trúc và tái tạo trong suốt quá trình sống. Sự loãng xương diễn ra chủ yếu ở người già do sự giảm khối lượng hay mật độ xương và sự thay đổi cấu trúc vi mô của xương. Sự tạo xương mới bắt đầu bằng quá trình sinh tổng hợp collagen, sau đó xảy ra quá trình khoáng hóa xương tức canxi hấp thụ vào nền collagen. Canxi tạo độ cứng của xương nhưng giòn, trong khi collagen cung cấp độ chắc và dẻo dai của xương.

Cao động vật là phương thuốc truyền thống phòng trị các bệnh về xương, đặc biệt là loãng xương. Hiện nay ở Việt Nam có khá nhiều loại cao được chế biến và thương mại. Theo các kết quả tiền thăm dò, collagen trong cao đã bị thủy phân (cắt ngắn) một phần do tác dụng của nhiệt khi nấu trong thời gian dài. Theo các nghiên cứu tại Việt Nam và trên thế giới cá sấu là một nguồn cung cấp lượng collagen triển vọng cho nhu cầu ngày càng cao của người tiêu dùng.

Ở Việt Nam, hiện nay Công ty TNHH Cá Sấu Hoa Cà là công ty duy nhất nấu cao xương cá sấu làm thực phẩm bổ sung và đã bán ra thị trường. Do công ty nấu cao theo phương pháp truyền thống, nấu xương nguyên trạng ở nhiệt độ cao và nấu trực tiếp trên bếp. Sau từ 8-12 giờ nấu dịch collagen được lấy ra cô đặc và cho nước mới vào nấu tiếp, cứ thế lặp lại nhiều lần (6-7 lần). Với thời gian và nhiệt độ nấu như thế thì sản phẩm thu được có màu sẫm đen, hiệu suất trích ly thấp do bị cháy ở đáy nồi.

Thịt cá sấu dường như được xem là sản phẩm phụ của ngành chăn nuôi cá sấu nên giá bán trên thị trường không đắt hơn nhiều (hoặc thậm chí rẻ hơn) các loại thịt thông thường khác. So với thịt bò, heo, và gà thì thịt cá sấu chứa ít chất béo hơn và nhiều protein hơn (Hoffman và ctv, 2000; Beilken và ctv, 2007). Do vậy thịt cá sấu là nguyên liệu phù hợp hơn cho việc thủy phân thu nhận dịch protein thủy phân.

Bên cạnh giá trị dinh dưỡng truyền thống, sản phẩm protein thủy phân dễ hấp thụ và có các hoạt tính sinh học có lợi cho sức khỏe đã được khẳng định là tính kháng oxi hóa, khả năng bắt giữ gốc tự do, tính ức chế vi sinh gây bệnh và khả năng ức chế enzyme chuyển hóa angiotensin (Vercruyssen và ctv, 2005; Faria và ctv, 2008; Di Bernardini và ctv, 2011; Banerjee và Shanthi, 2012). Ngoài ra một số nghiên cứu còn cho thấy collagen thủy phân có thể cải thiện sức khỏe da và giúp chữa lành tổn thương da (Zague, 2008, Zhang và ctv, 2011), chống mệt mỏi (Ding và ctv, 2011). Một nghiên cứu khác cho thấy chuột ăn collagen thủy phân có thể cải thiện được khả năng ghi nhớ (Lu và ctv, 2010).

Vì vậy, nghiên cứu về nghiên cứu phát triển sản phẩm thực phẩm từ nguyên liệu cá sấu bằng kỹ thuật hoá sinh là cần thiết.

MỤC TIÊU ĐỀ TÀI

Mục tiêu tổng quát

Nghiên cứu nhằm phát triển sản phẩm bột dinh dưỡng từ protein thủy phân và cao chiết giàu collagen từ nguyên liệu cá sấu bằng kỹ thuật hóa sinh nhằm gia tăng giá trị về kinh tế và khoa học.

Mục tiêu cụ thể

- Cải tiến quy trình nấu cao (trích ly collagen) từ xương cá sấu theo hướng ổn định và nâng cao chất lượng cao.
- Thiết lập quy trình sản xuất sản phẩm: bột protein thịt cá sấu thủy phân, cao collagen xương cá sấu và đánh giá tác dụng hỗ trợ sức khỏe của sản phẩm dinh dưỡng lên sức khỏe chuột.

NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- + Cải thiện qui trình trích ly collagen từ xương cá sấu
- + Nghiên cứu qui trình thủy phân protein thịt cá sấu bằng enzyme protease
- + Nghiên cứu qui trình sấy phun dịch protein thịt cá sấu thủy phân thành bột
- + Nghiên cứu công thức sản phẩm dinh dưỡng bổ sung cao cá sấu
- + Đánh giá an toàn và tác dụng hỗ trợ sức khỏe của sản phẩm dinh dưỡng.

PHẠM VI NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được thực hiện để tạo ra một loại bột dinh dưỡng từ protein thủy phân và cao chiết giàu collagen từ nguyên liệu thịt và xương cá sấu xiêm (*Crocodylus siamensis*) được cung cấp bởi Công ty TNHH Cá Sấu Hoa Cà (Quận 12, Tp. HCM).

Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

Ý nghĩa khoa học

- + Bổ sung thêm dữ liệu nghiên cứu khoa học liên quan đến phân tích, chế biến và ứng dụng trong công nghệ chế biến thực phẩm chức năng.
- + Nghiên cứu đã làm rõ được ảnh hưởng của các điều kiện trích collagen từ xương cá sấu, ảnh hưởng của loại và tỷ lệ enzyme trong thủy phân protein thịt cá sấu.
- + Nghiên cứu đã phân tích thành phần hóa lý của xương, thành phần acid amin của cao xương. Nghiên cứu cũng đánh giá được an toàn và tác dụng hỗ trợ sức khỏe của sản phẩm tạo cơ sở cho việc ứng dụng thực tiễn trong tương lai.

Ý nghĩa thực tiễn

- + Luận án đã đưa ra được qui trình cải tiến hiệu suất trích ly collagen từ xương cá sấu và xác định được loại enzyme neutral PL có khả năng thủy phân tốt nhất thịt cá sấu từ đó có thể bổ sung phát triển thực phẩm mới. Luận án đã thiết lập quy trình chế biến các sản phẩm thực phẩm.
- + Bổ sung các hoạt chất tốt cho sức khỏe con người, không độc qua thử nghiệm *in vivo*.
- + Tận dụng nguồn nguyên liệu rẻ tiền là xương và thịt cá sấu để phát triển các sản phẩm có giá trị về cả kinh tế và sức khỏe.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Tổng quan về cá sấu

Cá sấu là loài bò sát lưỡng cư, sống được trên cạn lẫn dưới nước, ở cả đầm lầy nước ngọt và nước lợ. Ở Việt Nam có hai loài cá sấu, đó là cá sấu nước ngọt hay gọi là cá sấu Xiêm *Crocodylus siamensis* và cá sấu nước lợ, còn gọi là cá sấu hoa cà *Crocodylus porosus* thuộc chi *Crocodylus*, họ *Crocodylidae*, bộ *Crocodilia* (Lê Thị Biên và ctv, 2006). Theo báo cáo từ chương trình phát triển cá sấu và động vật hoang dã của UBND Tp.HCM (2021), số lượng cá sấu tại Việt Nam trong hơn 20 năm qua phát triển nhanh, chủ yếu là loài cá sấu nước ngọt *Crocodylus siamensis*.

1.1.1 Phân loại khoa học

- Giới: Animalia
- Ngành: Chordata
- Lớp: Sauropsida
- Bộ: Crocodylia
- Họ: Crocodylidae
- Chi: *Crocodylus*
- Loài: *C.Siamensis*

Cá sấu là loài bò sát lớn, thường sinh sống trong môi trường sông hồ có dòng nước chảy chậm. Nguồn thức ăn khá đa dạng. Chúng sống trên một diện tích rộng của các khu vực nhiệt đới như Châu Phi, Châu Á, Bắc Mỹ và Châu Đại Dương.

1.1.2 Vị trí, phân loại và phân bố của cá sấu

Cá sấu là loài động vật có xương sống, thuộc lớp bò sát (Reptile), bộ cá sấu (crocodilians), gồm 3 họ chính: *Alligatoridae*, *Crocodyliae* và *Gavialidae* được phân thành 7 nhóm và 21 loài. Các đặc điểm để phân biệt giữa 3 họ này dựa vào kích thước cơ thể, hình dạng mõm, sự sắp xếp của răng, hình dạng tổ, đặc tính của da và phân bố địa lý.

1.1.2.1 Cá sấu Hoa Cà (*crocodylus prosus*)

Phân bố: Australia, Bangladesh, Brunei, Myanmar, Cambodia, Indonesia, Philippines, Thailand, Việt Nam.

Đây là một trong những loài cá sấu có kích thước lớn nhất, trung bình dài 6 – 7m, hung dữ, tấn công người. Chúng sinh sống ở khu vực ven bờ biển nước lợ và các vùng nước ngọt như cửa sông, đầm lầy... Trước nay chúng có vùng phân bố rộng tại Đông Nam Á. Tại Việt Nam, cá sấu nước lợ phân bố từ Vũng Tàu, Cần Thơ đến Kiên Giang, Côn Đảo... do tình trạng săn bắt quá mức nên loài này đang bị đe dọa tuyệt chủng, hiện không còn thấy ngoài tự nhiên mà chỉ còn khoảng 70 con nuôi tại Cần Giờ. Cá sấu Hoa Cà cái trưởng thành từ 6-10 tuổi, dài 2,2 - 2,5m. Chúng làm tổ để trứng vào mùa mưa, mỗi lần khoảng 40- 60 trứng và ấp nở trong 80 – 90 ngày. Bộ da của cá sấu Hoa Cà có giá trị thương phẩm cao nhất.

1.1.2.2 Cá sấu Xiêm (*crocodylus siamensis*)

Cá sấu Xiêm sinh sống ở các vùng đầm lầy nước ngọt, hồ, sông, suối có dòng chảy chậm. Kích thước nhỏ, chiều dài tối đa có thể lên tới 4m, trung bình khoảng 3m. Chúng giao phối từ tháng 12 đến tháng 3, mỗi năm đẻ 1 lần từ tháng 4 đến tháng 10, đào hố làm tổ trước khi đẻ khoảng 1 tuần. Mỗi lần đẻ khoảng 20 – 50 trứng và ấp nở sau 75 – 85 ngày. Trước đây cá sấu nước ngọt được tìm thấy nhiều ở sông Đồng Nai, Tây Nguyên và khắp Nam bộ. Do hiện tượng săn bắt quá mức nên phạm vi sống thu hẹp dần và còn thấy rất ít ở Kontum, Đaklak. Đây là loài cá sấu dễ thuần hóa và nuôi dưỡng, hiện đang được chú ý phát triển trong chăn nuôi cá sấu lấy da và thịt thương phẩm tại Việt Nam.

1.1.3 Tình hình chăn nuôi cá sấu trên thế giới và Việt Nam

1.1.3.1 Tình hình nuôi cá sấu trên thế giới

Cá sấu là động vật quý hiếm, sau chiến tranh thế giới thứ hai, cá sấu bị coi là những con vật có hại ở nhiều nơi mọi người được phép tự do săn bắt vì vậy chúng ngày một khan hiếm. Vào năm 1971 do nạn săn bắt, số cá sấu trên thế giới còn ít tới mức các nước đã nhất trí áp đặt lệnh cấm xuất khẩu các sản phẩm cá sấu và được bảo

vệ bằng Công ước buôn bán quốc tế các loài bị đe dọa (CITES) nhưng đến năm 1986 chúng được đưa sang là sản phẩm cá sấu nuôi có thể được xuất khẩu.

Để bảo tồn, phát triển cũng như khai thác lợi ích của cá sấu, ở một số nước như Thái Lan, Campuchia, Malaixia, Cuba, Hoa Kỳ, Việt Nam, các trại nuôi cá sấu tập trung với số lượng lên đến hàng nghìn con đã được xây dựng. Tại Ấn độ và Papua New Guinea, hai dự án đầu tiên trên thế giới về nuôi cá sấu được tổ chức Nông nghiệp và Thực phẩm của Liên hợp quốc triển khai vào những năm 70. Ở Ấn độ đã nuôi thử nghiệm hàng trăm con cá sấu mõm dài sông Hằng (*Gavialis gangeticus*) để cứu loài vật này khỏi bị tuyệt chủng. Sau hai dự án này, tổ chức FAO còn giúp nhiều nước khác ở châu Á-Thái Bình Dương, châu Phi và Mỹ La Tinh cùng phát triển nghề nuôi cá sấu (theo Lê Trung Thiên, 2016).

Nhiều trại chăn nuôi cá sấu sông Nile, cá sấu nước mặn được nuôi nhiều ở Úc, còn cá sấu Caiman có giá trị kinh tế nhỏ vẫn được nuôi và gây giống ở miền nam nước Mỹ. Cá sấu (*Crocodylus niloticus*) đã được nuôi ở Nam Phi với 40 trang trại được cấp phép năm 1992. Đóng góp vào thu nhập từ nguồn lợi cá sấu tại Nam Phi phải kể đến du lịch và nguồn thịt cá sấu cung cấp cho thị trường.

Thái Lan là một trong những nước nổi tiếng thế giới về nuôi cá sấu. Năm 1960 trại cá sấu đầu tiên ở Thái Lan mới chỉ xuất được 150 con cá sấu nhỏ, đến nay trại đã có hơn 40.000 con cá sấu với đủ các kích cỡ.

1.1.3.2 Tình hình nuôi cá sấu tại Việt Nam

Tính đến năm 2004 ở Tp.HCM tổng đàn cá sấu của 4 doanh nghiệp đăng ký xuất khẩu khoảng 31.732 con. Ngoài ra còn khoảng 23 – 25 trại nuôi cá sấu quy mô hộ gia đình với tổng đàn cá sấu là 4.796 con. Tuy đây là ngành không phổ biến, nhưng vì cá sấu rất dễ nuôi và dễ sinh sản, đặc biệt thích nghi với khí hậu nước ta, nên ngành này vẫn đang phát triển rất nhanh và đem về lợi nhuận khá lớn (10 tỷ đồng từ 2001 – 2004).

Tại Tp.HCM, chương trình phát triển đàn cá sấu giai đoạn 2001-2010, phấn đấu đến năm 2010 đàn cá sấu gây nuôi đạt tiêu chuẩn xuất khẩu trong các trang trại đạt

khoảng 80.000 – 100.000 con. Đến năm 2011, tổng đàn cá sấu ở Tp. HCM đạt 175.115 con, trong khi đến tháng 10/2008 tổng đàn cá sấu là 168.922 con.

Cho đến 31/7/2015, tổng số lượng cá sấu nước ngọt nuôi trên địa bàn thành phố đạt khoảng 176.086 con nhưng bình quân hàng năm Tp.HCM chỉ xuất khẩu có hơn 20.000 con cá sấu. Sau hai năm giá cá sấu giảm mạnh, tổng đàn cá sấu năm 2020 chỉ còn 90.000 con. (Theo UBND Tp.HCM, 2021).

Thời điểm tháng 01/2019, cá sấu được thương lái thu mua với giá dao động từ 165.000-185.000 đồng/kg, tăng gần 3 lần so với những năm trước. Với giá này, sau khi trừ chi phí, người nuôi có lãi từ 70.000 đến gần 90.000 đồng/kg. Từ khi xảy ra dịch Covid-19 đến nay, các quốc gia nhập khẩu cá sấu (chủ yếu là Trung Quốc, Thái-lan, Nga...) chưa mở cửa trở lại khiến cá sấu thương phẩm vẫn bế tắc đầu ra. Điều này càng khiến giá cá sấu càng khó hồi phục. Giá một con cá sấu thương phẩm khoảng ba đến năm kg/con hiện ở mức 300 nghìn đến 400 nghìn đồng/con; loại 10 đến 15 kg/con giá khoảng 700 nghìn đến 800 nghìn đồng/con. Mức giá này đã giảm một nửa so với trước đây (Theo UBND Tp.HCM, 2021).

1.2 Sản phẩm từ cá sấu

Các sản phẩm từ cá sấu rất phong phú, ngành chăn nuôi cá sấu hiện nay chủ yếu cung cấp nguyên liệu cho sản xuất da, thịt, dầu và móng vuốt.

1.2.1 Da cá sấu

Da cá sấu là mục tiêu chủ yếu để con người săn bắt và phải nuôi con vật nguy hiểm này. Da cá sấu mỏng hơn so với một số loại da khác và nó gồm 2 phần chính: da và lớp vảy. Da cá sấu là nguyên liệu đắt giá của ngành công nghiệp thuộc da. Sau khi được xử lý bằng hoá chất da cá sấu sẽ nổi vân óng ánh, là nguyên liệu làm ra các đồ trang sức đắt tiền như thắt lưng, ví xách tay, giày dép, mảnh áo khoác. Từ mảnh da đã thuộc và trau chuốt có thể làm ra nhiều sản phẩm có giá trị rất cao.

1.2.2 Thịt cá sấu

Cá sấu thường có lớp mỡ rất dày, nhất là ở đuôi và đặc biệt ở những cá sấu nuôi nhốt trong chuồng. Lượng đạm trong thịt cá sấu khá cao, tỷ lệ phần trăm của mỡ cũng

khá cao. Để có thể thấy được tỷ lệ các thành phần trong thịt của cá sấu có thể so sánh với thành phần của thịt lợn, ở thịt lợn thành phần trung bình của các chất như sau: đạm 13%, mỡ 20%, nước 57% (theo Hoffman và ctv, 2000).

1.2.3 Các sản phẩm phụ khác của cá sấu

Hai tuyến xạ ở dưới hàm cá sấu được dùng trong công nghệ chế biến nước hoa vì nhờ nó mà nước hoa có mùi đặc trưng và bền mùi hơn. Một số bộ phận của cá sấu sấy khô được dùng làm thuốc truyền thống ở phương Đông, tuy nhiên thị trường còn rất hạn chế. Mật cá sấu được dùng để chữa những bệnh ở đường hô hấp, tiêu hoá. Một vài nơi bán dầu cá sấu chế từ mỡ của nó. Có người dùng xương sọ và toàn bộ xương của cá sấu để nấu cao, làm đồ thủ công mỹ nghệ, xay làm phân bón, thức ăn gia súc.

1.3 Thành phần dinh dưỡng chính trong thịt cá sấu

Đến nay, dù việc tiêu thụ thịt cá sấu đã và đang phát triển tuy nhiên vẫn chưa có nhiều thông tin về giá trị dinh dưỡng của loại thịt này. Một trong số ít các nghiên cứu về giá trị dinh dưỡng của cá sấu đó là nghiên cứu của Hoffman và ctv (2000). Kết quả nghiên cứu từ thịt đuôi, cổ, thân và chân cá sấu (*Crocodylus niloticus*) từ 33 - 36 tháng tuổi được trình bày ở Bảng 1-1. cho thấy không có sự khác biệt về hàm lượng protein và hàm lượng chất béo giữa các bộ phận cơ thể đã được nghiên cứu.

Bảng 1-1. Thành phần hóa học từ các bộ phận thịt của cá sấu sông Nile (g.kg^{-1})

	Đuôi	Chân	Thân	Cổ	Trung bình
Độ ẩm	701,7±18,96	733,9± 7,57	670,7± 22,38	759,5± 13,21	716,4 ± 36,77
Protein	210,9± 8,09	224,0± 9,59	218,8± 7,02	229,4± 7,26	220,8 ± 10,09
Béo	88,5± 27,15	40,4± 11,63	91,1± 16,96	29,4± 8,41	62,3 ± 32,17
Tro	5,9± 1,55	3,6± 0,78	6,5± 2,00	4,5± 1,63	5,1 ± 1,85

(Hoffman và ctv, 2000)

Bên cạnh đó, trong thịt cá sấu còn chứa các amino acid thiết yếu, kết quả được trình bày Bảng 1-2.

Bảng 1-2. Hàm lượng amino acid của thịt nạc cá sấu (g.kg^{-1} , trên vật chất khô)

Amino acid	Hàm lượng (g.kg^{-1})
Threonine	$3,291 \pm 0,057$
Serine	$2,817 \pm 0,066$
Glycine	$4,056 \pm 0,239$
Alanine	$4,533 \pm 0,086$
Valine	$3,471 \pm 0,087$
Methionine	$2,060 \pm 0,045$
Isoleucine	$3,557 \pm 0,113$
Leucine	$6,430 \pm 0,133$
Tyrosine	$2,597 \pm 0,076$
Phenylalanine	$2,913 \pm 0,081$
Histidine	$2,147 \pm 0,073$
Lysine	$6,971 \pm 0,152$
Arginine	$6,346 \pm 1,469$

(Hoffman và ctv, 2000)

1.4 Tổng quan về xương

1.4.1 Cấu trúc của xương

Thành phần chính của xương chủ yếu là các sợi collagen và khoáng xương vô cơ ở dạng tinh thể nhỏ. Trong cấu trúc xương (xương trong cơ thể sống) có chứa từ 10% đến 20% là nước. Trọng lượng khô của nó, khoảng 60 - 70% là chất khoáng của xương. Hầu hết các phần còn lại là collagen, bên cạnh đó xương cũng chứa một lượng nhỏ các chất khác như phi protein và các muối vô cơ (theo Szpak, 2011). Thành phần của khoáng chất tương tự như hydroxyapatite (canxi photphat hydrat). Tuy nhiên, trong hydroxyapatite có Ca:P tỉ lệ 5:3 (1,67), khoáng của xương có tỉ lệ Ca:P dao động 1,37 - 1,87. Điều này là do các thành phần khoáng chất trong xương phức tạp hơn nhiều và có chứa các ion khác như silicon, carbonate và kẽm. So với collagen động vật có vú, collagen cá nói chung, đặc trưng bởi tỷ lệ tương đối cao

serine và glycine, và tỷ lệ thấp hydroxyproline và proline (Omokanwaye và ctv, 2010; Szpak, 2011). Xương cá sấu có màu trắng rất cứng Hình 1.1.



Hình 1.1. Xương cá sấu đã loại tủy, chất béo và thịt

(Nguồn Công ty TNHH cá sấu Hoa Cà, 2014)

Xương có vai trò nâng đỡ cơ thể và nhiều chức năng khác trong cơ thể động vật. Đặc trưng của xương là có độ cứng cao, khả năng phục hồi, tăng trưởng và tự sửa chữa. Được coi là một kiệt tác của tạo hóa, xương là loại mô có cấu trúc phức tạp với thành phần gồm các chất vô cơ và mạng lưới chất hữu cơ đã tạo nên tính bền cơ học, tính nén vững chắc cho xương.

1.4.2 Một số ứng dụng của xương cá sấu

Hiện nay ở Việt Nam, Công ty TNHH Cá Sấu Hoa Cà là công ty nấu cao xương cá sấu làm thực phẩm bổ sung và đã bán ra thị trường. Trong chương trình ‘Kim Cương Tươi Đẹp’ thuộc Công ty TNHH Cá Sấu Hoa Cà được thành lập từ năm 2010, cao xương cá sấu được dùng để hỗ trợ điều trị bệnh tạo xương bất toàn (xương thủy tinh) ở trẻ em và cho kết quả rất có tiềm năng. Các kết quả bước đầu từ phân tích chất biểu hiện quá trình tạo xương (bone turnover markers) trong serum máu cho thấy rằng việc uống cao xương cá sấu trong một khoảng thời gian có thể làm tăng lên quá trình sinh tổng hợp collagen trong xương của bệnh nhân xương bất toàn. Điều này giúp cải thiện rõ rệt sức khỏe xương, giảm sự đau nhức và giảm tần suất bị gãy xương ở các bệnh nhân này (Tôn Thất Hưng và ctv, 2013). Bên cạnh đó, theo ghi nhận của Viện Y Dược Học Dân Tộc Tp. HCM thì sản phẩm này cũng có hiệu quả tốt với một số bệnh nhân về xương khớp và thông tin này cần được thông báo rộng rãi hơn đến người sử dụng. Theo nghiên cứu của Gungormus và Kaya (2002),

collagen loại I khi được đắp vào xương trong quá trình phẫu thuật có thể làm tăng tốc quá trình lành xương.

Phương pháp hiện nay công ty TNHH Cá Sấu Hoa Cà dùng để trích cao là phương pháp nấu-cô truyền thống. Theo đó xương nguyên miếng được nấu sôi ở 100°C. Sau mỗi ngày nấu dịch collagen được lấy ra và nước mới được cho vào xương để nấu lần tiếp theo. Quá trình này được lặp lại 6 - 7 lần, có nghĩa thời gian nấu khoảng 7 ngày. Nồi nấu có hai tầng, tầng 1 dùng để nấu xương. Hơi nước trong tầng này làm nóng tầng trên nơi chứa dịch collagen và như vậy dịch được cô đặc lại. Với nhiệt độ nấu cao và thời gian lâu như vậy, sản phẩm thu được có màu nâu đen và có thể có các thay đổi không kiểm soát khác xảy ra như thay đổi về mùi cũng như các đặc tính chất lượng khác. Thực ra, các loại cao xương từ động vật khác cũng được nấu theo kinh nghiệm dân gian như vậy. Chưa có nghiên cứu khoa học cụ thể (trong nước hay quốc tế) nào được thực hiện để cải tiến quy trình truyền thống này.

Hiện nay phương pháp trích ly collagen từ xương động vật hoặc các bộ phận khác như da, gân ... ngâm với axit acetic và pepsin ở nhiệt độ thường (Wood và ctv, 2008, Mokrejs và ctv, 2009, Zhang và ctv, 2009, Chen và ctv, 2011). Cho đến nay chưa có nghiên cứu nào chứng minh rằng liệu các tính chất có lợi cho sức khỏe phát hiện trong cao xương cá sấu là chỉ do collagen hay còn các thành phần khác nhưng với hàm lượng thấp. Vì vậy các thí nghiệm thực hiện là để cải tiến phương pháp dùng nhiệt truyền thống chứ không phải theo cách tiếp cận ở các nơi khác. Các thí nghiệm được tiến hành nhằm cải tiến theo hướng giảm mức sử dụng năng lượng, giảm tác động đến chất lượng sản phẩm thu được trong khi đảm bảo hoặc thậm chí tăng lên hiệu suất thu hồi cao từ xương.

Tính ứng dụng của cao collagen cũng cần được quan tâm. Theo Omokanwaye và ctv (2010) các sản phẩm cao collagen hiện nay đặc sệt (ẩm ~ 35%), khó hòa tan trong nước và khi phân tán trong nước thì ở dạng huyền phù có độ đục cao. Các đặc tính như vậy sẽ giới hạn khả năng ứng dụng cao xương vào các sản phẩm thực phẩm khác. Việc thủy phân collagen bằng enzyme có thể làm tăng tính hấp thu của sản phẩm và theo một số tiền thử nghiệm thì thủy phân cũng làm tăng độ trong của dung

dịch. Collagen loại I trong xương có cấu trúc 3 sợi xoắn lẫn nhau. Cấu trúc như vậy làm cho collagen khó được tiêu hóa hiệu quả trong đường ruột khi được tiêu thụ. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng pepsin (enzyme thủy phân protein trong bao tử) không thể phá vỡ hoàn toàn cấu trúc xoắn 3 của collagen (Kittiphattanabawon và ctv, 2010, Liu và ctv, 2012). Trypsin (một trong hai enzymes chính chịu trách nhiệm thủy phân peptit trong ruột non – trypsin và chymotrypsin) cũng không thủy phân được collagen loại I một cách hoàn toàn (Buckley và ctv, 2008).

1.5 Tổng quan về collagen

1.5.1 Giới thiệu collagen

Collagen là thành phần protein chủ yếu của các mô liên kết, chiếm khoảng 25% - 35% protein tổng số trong cơ thể động vật và là thành phần chủ yếu của khung mạng ngoại bào. Collagen là protein dạng sợi xoắn và có trong các mô liên kết của tim, mạch, da, giác mạc, sụn, sừng, dây chằng, xương. Collagen cũng được tìm thấy ở các mô bên trong của hầu hết các cơ quan. Collagen tạo nên độ bền của mô, cơ quan và duy trì dạng cấu trúc của chúng. Collagen rất đa dạng về thành phần và cấu trúc (Bolboacă và ctv, 2007; Pataridis và ctv, 2009; Singh và ctv, 2011).

1.5.2 Phân loại collagen

Collagen tồn tại ở nhiều bộ phận trong cơ thể. Đã có 28 loại collagen được tìm thấy và công bố trong các tài liệu khoa học. Trên 90% collagen trong cơ thể là dạng I, II, III và IV (Shoulders và ctv, 2009).

Collagen I: có trong da, gân, mạch máu, các cơ quan, xương.

Collagen II: có trong sụn xương (thành phần chính của sụn).

Collagen III: có trong bắp cơ (thành phần chính của bắp cơ).

Collagen IV: thành phần chính cấu tạo màng tế bào.

1.5.3 Cấu trúc collagen

Collagen là một cấu trúc protein có trong chất nền ngoại bào và mô liên kết của động vật. Là protein được tìm thấy trong giới động vật và không tìm thấy ở thực vật và sinh vật đơn bào. Ở động vật không xương sống collagen hiện diện trong thành cơ thể

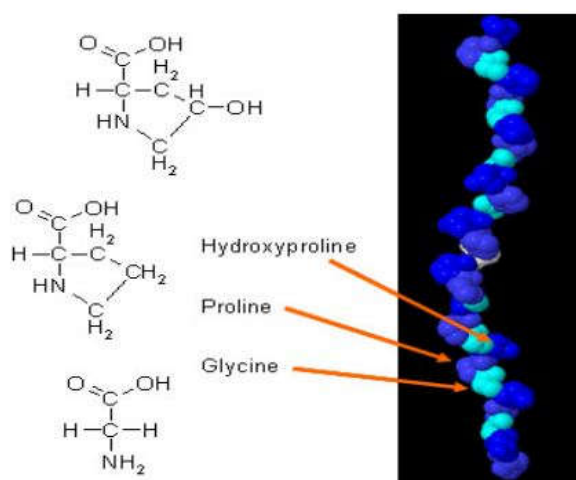
và lớp biểu bì. Collagen chiếm 25-30% protein tổng số của cơ thể động vật có vú (Bolboacă và ctv, 2007). Collagen hiện diện trong giác mạc, xương, mạch máu, sụn, ngà răng...

Collagen có cấu trúc phức tạp, Collagen (hay Tropocollagen) là một sợi dài khoảng 300nm có đường kính 1,5 nm, tạo thành bởi ba chuỗi polypeptit, các chuỗi xoắn với nhau tạo nên cấu trúc xoắn của collagen, các chuỗi polypeptit liên kết với nhau trong chuỗi bởi liên kết hydro. Các chuỗi polypeptit được tổng hợp tương tự như các protein khác (Theo Pataridis và ctv, 2009).

Thành phần amino acid có thể thay đổi tùy theo nguồn gốc của collagen, nhưng vẫn tồn tại một vài tính chất chung và duy nhất cho tất cả collagen. Trong thành phần collagen không chứa cystein và tryptophan, nhưng chứa một lượng lớn glycine (Gly) chiếm khoảng 30% và proline (Pro) chiếm tỉ lệ 12% và hydroxyproline (Hyp) chiếm khoảng 12,8 – 14,7%. Collagen là một trong số ít những protein có chứa hydroxylysine (Hyl), ngoài ra trong thành phần collagen còn chứa khoáng chiếm tỉ lệ 1%. Hyp là một amino acid đặc trưng của collagen mà các loại protein khác không có và tùy theo nguồn gốc collagen mà lượng Hyp khác nhau (Lê Trung Thiên, 2016).

Gần đây 28 loại collagen đã được nhận diện gồm 46 chuỗi polypeptide riêng biệt, tất cả các collagen này đều có một chuỗi xoắn ba đặc trưng nhưng độ dài, kích thước, tính chất của phân còn lại khác nhau tùy loại collagen. Theo các nghiên cứu đã công bố, trong xương chỉ có hai loại collagen chủ yếu là loại I: $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ và một ít loại V: $\alpha 1(V) \alpha 2(V), \alpha 3(V)$ (Theo Wood và cộng sự (2008)

Các collagen loại I, II, III, IV chiếm hơn 90% tổng số collagen trong cơ thể. Collagen loại I có trong da, gân, mạch máu, các cơ quan, xương. Collagen loại II là thành phần chính của sụn. Collagen loại III có trong cơ. Collagen loại IV là thành phần chính cấu tạo màng tế bào (Silvipriya và ctv, 2015) (Hình 1.2).



Hình 1.2 Cấu trúc của collagen

(Nguồn: Silvipriya và ctv, 2015)

Collagen loại I phổ biến nhất trong cấu tạo mô cơ có khối lượng phân tử 150.000 ĐVC với các hoạt tính chức năng đặc biệt. Có 42 chuỗi polypeptit được tìm thấy, chúng được mã hóa bởi 41 loại gen để tạo nên 28 loại collagen khác nhau. Cấu trúc ba chuỗi polypeptid xoắn lại theo kiểu xoắn ốc xung quanh một sợi hình thành nên bộ ba tropocollagen có chiều dài trung bình 300 nm, đường kính 1,4 nm nhờ các liên kết hydro. Mỗi chuỗi polypeptide chứa khoảng 1.050 amino acid khác nhau, đặc biệt là sự lặp lại có trình tự của ba amino acid Gly - X - Y (X thường là Pro, Y là Hyp). Vì Gly chiếm hàm lượng lớn và phân bố một cách đầy đặn trong phân tử nên sự lặp lại của nó cho phép các chuỗi polypeptide liên kết một cách chặt chẽ với nhau tạo thành một đường xoắn ốc với các khoảng trống nhỏ ở phần lõm, mỗi vòng xoắn chứa 3,3 gốc amino acid, chiều cao 2,9Å°. Khoảng 4 - 8 phân tử tropocollagen liên kết với nhau theo kiểu đầu với nôi đuôi, hình thành sợi collagen (Gelse và ctv, 2003).

Các sợi collagen sắp xếp song song theo chiều dọc, liên kết với nhau bằng các liên kết ngang tạo thành các sợi theo chu kỳ nhất định. Chúng được sắp xếp so le nhau một khoảng 67 nm và có một khoảng trống 40 nm ở những phân tử liền kề nhau hình thành sợi collagen có đường kính 10 - 500 nm tùy thuộc vào giai đoạn phát triển. Các sợi collagen sẽ thiết lập nên bó sợi collagen (Hình 1.2). Trong hầu hết các bộ phận cơ thể và đặc biệt là xương. Collagen loại I cung cấp độ bền kéo và độ cứng

trong xương. Nó xác định tính chất cơ sinh học đáng kể liên quan chịu lực, độ bền kéo, độ cứng xoắn và đặc biệt là sau khi vôi hóa (Gelse và ctv, 2003).

Theo nghiên cứu của Wood và ctv (2008) đã trích ly collagen từ xương của giống cá sấu *Alligator mississippiensis*. Kết quả cho thấy, collagen trích ly từ xương giống cá sấu trên là collagen loại I với khối lượng phân tử ($[\alpha 1]_2\alpha 2$) là 359 kDa và 356 kDa tương ứng với hai phương pháp trích bằng acid và pepsin. Nghiên cứu cũng cho thấy nếu xét riêng từng chuỗi $\alpha 1$ thì khối lượng phân tử 124 kDa, chuỗi $\alpha 2$ là 111 kDa và chuỗi β khoảng 200 kDa. Thành phần amino acid trong collagen rất phong phú với 18 loại amino acid (Bảng 1-3), đặc biệt nhiều glycine, proline, alanine và hydroxyproline.

Bảng 1-3. Hàm lượng amino acid tự do trong dịch trích từ xương cá sấu trích bằng phương pháp acid acetic và enzyme pepsin

Amino acid	PP acid acetic	PP Enzyme pepsin
Hyp	77,6 ± 1,2	86,6 ± 3,2
Asx	40,1 ± 0,1	37,2 ± 1,8
Thr	21,4 ± 0,5	22,0 ± 2,0
Ser	45,2 ± 1,2	46,2 ± 1,0
Glx	66,5 ± 1,0	65,8 ± 3,7
Pro	116,5 ± 1,6	109,5 ± 1,5
Gly	354,9 ± 10,5	367,2 ± 10,0
Ala	134,4 ± 3,6	103,2 ± 4,2
Val	15,2 ± 0,4	15,6 ± 1,2
Met	8,5 ± 0,5	8,4 ± 0,4
Ile	10,5 ± 0,3	10,8 ± 0,6
Leu	20,4 ± 0,4	19,5 ± 0,3
Tyr	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,1
Phe	12,9 ± 0,3	12,2 ± 0,6
Hyl	19,6 ± 0,3	19,1 ± 0,3
Lys	33,3 ± 1,0	30,1 ± 1,1

His	4,2 ± 0,2	3,4 ± 0,2
Arg	47,3 ± 1,0	46,8 ± 2,0
Total	1000	1000

(Nguồn: Wood và ctv, 2008)

Theo tác giả Omokanwaye và ctv (2010) đã nghiên cứu các nguyên tố cơ bản của collagen: C, H, N trong xương gà và từ gân bò ở Bảng 1-4.

Bảng 1-4. Thành phần của collagen từ gân bò và xương gà

Mẫu	% C	% H	% N	% CHN	C/N
Collagen từ gân bò	41,48	5,76	7,03	54,27	5,90
Collagen từ xương gà	11,02	2,18	3,20	16,40	3,44

(Nguồn: Omokanwaye và ctv (2010))

1.5.4 Một số tính chất của collagen

1.5.4.1 Hoạt tính kháng oxi hóa

Theo Slizyte và ctv (2009) hoạt tính chống oxi hóa có liên quan đến hàm lượng cao các amino acid kỵ nước, vị trí sắp xếp các amino acid trong chuỗi peptid và khối lượng các peptid.

1.5.4.2 Khả năng trương nở và hòa tan

Khả năng hòa tan của collagen phụ thuộc nhiều vào pH và nồng độ muối trong dung dịch. Độ hòa tan của collagen từ da đạt cao nhất tại pH = 2, với pH = 5 thì hòa tan tốt với collagen từ xương. Khi tăng nồng độ muối > 3% thì collagen hòa tan giảm từ 90% xuống dưới 40%. Lý do nồng độ muối làm tăng tương tác kỵ nước, giảm liên kết giữa collagen với nước (Kittiphatanabawon và ctv, 2005). Collagen không hòa tan trong nước mà hút nước để nở ra, là do giữa các mạch polypeptid có vùng kỵ nước có vùng phân cực. Vùng phân cực mang điện tích, trở nên háo nước làm trương nở collagen (Lê Ngọc Tú và ctv, 2002).

1.5.4.3 Tác dụng với kiềm và acid

Collagen tác dụng được với acid và kiềm vì trong cấu trúc có nhóm carboxy và amin, hai gốc này quyết định tính chất của collagen. Trong điều kiện có acid, ion của nó tác dụng với gốc amin, điện tích trên carboxyl bị ức chế (hình thành acid yếu có độ ion hóa thấp). Trái lại gốc amin bị ion hóa tạo NH_3^+ (Lê Ngọc Tú và ctv 2002).

1.5.4.4 Sự biến tính

Dưới tác dụng của các chất hóa học như acid, muối, bazơ và tác nhân vật lý như nhiệt độ cao, tia cực tím, tác động cơ học. Các cấu trúc bậc II và III bị biến đổi làm cho các liên kết hydro, ion, cầu nối di-sulfua bị phá vỡ, nhưng không phá vỡ được liên kết peptid bậc I nên cấu trúc bậc I giữ nguyên (Lê Ngọc Tú và ctv, 2002).

1.5.4.5 Điểm đẳng điện (pI)

Điểm đẳng điện (isoelectric point - pI) của protein là một thông số rất quan trọng, liên quan đến tỉ lệ các gốc acid nhóm chức amin hay carboxy. Bình thường collagen có pI khoảng 8,4 cao hơn gelatin (khoảng 4,9) và collagen thủy phân có pI khoảng 4,6 (Zhang và ctv, 2005).

1.5.5 Các phương pháp trích ly collagen

Hiện nay chủ yếu có 3 loại trích ly collagen đó là vật lý, sinh học và hóa học. Tuy nhiên các nghiên cứu hầu như chú trọng đến phương pháp hoá học và sinh học.

1.5.5.1 Trích ly collagen bằng phương pháp sinh học

Dựa vào cơ chế thủy phân collagen trong xương của enzyme, sau đó kết tủa và tinh sạch để thu được collagen. Phản ứng quá trình trích ly collagen được thực hiện ở nhiệt độ lạnh và khuấy đảo để trích được hiệu suất cao hơn. Theo Li và ctv (2009) dùng enzyme pepsin trích ly collagen từ gân bò. Wood và ctv (2008) dùng enzyme pepsin để trích ly collagen từ xương cá sấu (*Alligator mississippiensis*).

1.5.5.2 Trích ly collagen bằng phương pháp hóa học

Dựa vào tính chất hòa tan của collagen trong acid acetic, sau đó kết tủa và tinh sạch được collagen. Hiện nay thường dùng acid acetic để tách chiết, tuy nhiên có thể dùng nhiều loại acid khác để thực hiện việc này, nhưng tùy thuộc vào từng loại nguyên liệu. Theo Nagai (2000) đã trích ly collagen từ da, xương và vây cá bằng 0,5M acid acetic trong 3 ngày. Cũng theo Trần Thị Huyền và ctv (2012) tách chiết collagen từ da cá ba sa bằng phương pháp hoá học. Quá trình trích ly collagen được thực hiện với acid acetic 0,5M, w/v = 1/10 trong 34 giờ, ngoài ra acid citric 0,5M cũng được dùng để trích ly collagen từ da cá Tuyết Baltic (theo Sadowska, 2003).

1.5.5.3 Trích ly kết hợp giữa sinh học và hóa học

Ogawa (2004) đã kết hợp acid acetic và enzyme pepsin để trích ly collagen từ xương và vây của cá Tráp được bắt ở vịnh Mexico. Một nghiên cứu khác từ tác giả Kiew (2013) đã trích ly collagen từ da của cá da trơn, sử dụng 0,5 M acid acetic chứa pepsin (v/w) với tỷ lệ enzyme/ cơ chất 1: 40 trích trong 20 giờ.

1.5.5.4 Trích ly collagen bằng phương pháp vật lý

Phương pháp này chủ yếu dùng nhiệt độ để trích vật chất mong muốn trong nguyên liệu. Nhiệt độ là tác nhân thúc đẩy quá trình trao đổi chất giữa hai môi trường nước và collagen trong xương. Tác giả không tìm thấy bài báo khoa học nào nói về trích ly collagen từ xương bằng nhiệt độ cao. Tuy nhiên ở Việt Nam đây là cách mà nhiều người dân đã và đang làm, gọi là nấu cao ngựa, cao mèo, cao trăn...

1.5.6 Ứng dụng kỹ thuật mới trong trích ly collagen

1.5.6.1 Sóng siêu âm

Sóng siêu âm cung cấp năng lượng qua hiện tượng tạo và vỡ bọt. Trong môi trường chất lỏng, bọt hình thành trong nửa chu kỳ đầu và vỡ trong nửa chu kỳ sau, giải phóng năng lượng rất lớn (Li và ctv, 2004).

a) Nguyên lý tác động của sóng siêu âm

Sóng siêu âm được tạo ra bằng các dao động cơ học ở tần số cao hơn 15kHz. Khi truyền trong môi trường lỏng, các phân tử trong trường siêu âm trải qua các chu trình nén, duỗi và những dao động này sẽ lan truyền cho các phân tử kế cận. Khi năng lượng đủ lớn, tại chu trình duỗi, tương tác giữa các phân tử sẽ vượt quá lực hấp dẫn nội tại và các lỗ hổng nhỏ trong lòng chất lỏng được hình thành. Hiện tượng trên còn được gọi là hiện tượng sủi bóng. Những bóng sủi này sẽ lớn dần lên bởi quá trình khuếch tán một lượng nhỏ các cấu tử khí (hoặc hơi) từ pha lỏng trong suốt pha giãn nở và không được hấp thụ hoàn toàn trở lại trong quá trình nén (Kuldiloke, 2002; Chemat và ctv, 2011).

Khi đạt đến thể tích mà các phân tử không còn có thể hấp thụ được năng lượng, chúng vỡ ra một cách đột ngột và nhanh chóng. Trong quá trình vỡ, nhiệt độ và áp suất sẽ tăng lên rất cao khoảng 5000°K và 2000atm. Thể tích chất lỏng bị gia nhiệt là rất nhỏ và nhiệt nhanh chóng bị tiêu tan. Nhiệt độ tại vùng này rất cao trong vài μ s. Mặt khác, nhiệt độ và áp suất cao tạo ra khi nổ bong bóng sẽ dẫn tới sự tạo thành các gốc tự do như là H* và OH* (Kuldiloke, 2002; Chemat và ctv, 2011).

b) Ứng dụng sóng siêu âm trong trích ly

Sóng siêu âm được sử dụng để hỗ trợ trích các hợp chất tự nhiên từ thực vật và các sản phẩm từ động vật. Theo Li và ctv (2009) đã sử dụng sóng siêu âm (ở 40kHz, 120W, xử lý 30 phút) để hỗ trợ trích ly collagen từ gân bò bằng enzyme pepsin. Kết quả cho thấy hàm lượng collagen tăng lên khoảng 124% và rút ngắn thời gian trích so với không hỗ trợ sóng siêu âm. Tác giả chưa tìm thấy bài báo nào nói về hỗ trợ sóng siêu âm trong trích ly collagen từ xương cá sấu khi trích bằng nhiệt.

1.5.6.2 Vi sóng

Vi sóng (microwave) là sóng cực ngắn hay còn gọi là sóng siêu tần, sóng UHF (Ultra High Frequency wave), tần số 0,3 GHz đến 300 GHz. Trong các lĩnh vực công nghiệp, khoa học và y học trên thế giới người ta qui ước sử dụng các loại vi sóng có tần số 915; 2450; 5800; 24124 MHz. Trong các tần số này, chỉ có tần số 2450 MHz được sử dụng rộng rãi, trong công nghệ chế biến nông sản, thực phẩm.

a) Nguyên lý hoạt động

Vi sóng được tạo ra từ bộ dao động điện từ và được khuếch đại nhờ magnetron hoạt động như một đèn điện tử 3 cực. Năng lượng sóng từ máy phát (magnetron) được truyền theo ống dẫn sóng đến quạt phát tán để đưa sóng ra mọi phía. Ở giữa lò các sóng phân tán đều nhờ sự phản chiếu của sóng lên thành lò. Dưới tác dụng của điện từ trường, các nguyên tử hydro và oxy thay đổi cực 2,45 tỉ lần trong một giây. Sự cọ sát giữa các phân tử nước với nhau tạo ra nhiệt.

b) Ứng dụng vi sóng để trích ly

Cũng giống như sóng siêu âm, vi sóng cũng được áp dụng rất nhiều trong việc tách trích hợp chất tự nhiên từ thực vật. Ngoài ra còn áp dụng cho sản phẩm động vật. Theo Xing-wu và ctv (2012) đã trích ly collagen từ da heo có hỗ trợ của vi sóng, kết quả cho thấy hàm lượng tăng lên 76,71%. Tác giả cũng không thể tìm thấy bài báo nào sử dụng vi sóng hỗ trợ trích ly collagen từ xương cá sấu.

1.5.7 Các phương pháp xác định hàm lượng collagen

Vì không thể định tính cũng như định lượng trực tiếp collagen, mà thông qua một amino acid đặc trưng của collagen, đó là hydroxyproline. Hydroxyproline chỉ có mặt trong collagen và một phần rất ít trong elastin, vì thế nó được coi là amino acid đặc trưng của collagen. Nên collagen sẽ được định tính và định lượng thông qua amino acid này, nồng độ collagen sẽ được tính bằng hàm lượng hydroxylproline nhân với hệ số chuyển đổi là 14,7.

$$C_{\text{collagen}} = C_{\text{hydroxyproline}} \times 14,7$$

Trong đó: C_{collagen} : Nồng độ collagen (mg/g)

$C_{\text{hydroxyproline}}$: Nồng độ hydroxyproline (mg/g)

Hydroxyproline cũng là một amino acid, vì thế các phương pháp phân tích hydroxyproline chính là các phương pháp phân tích amino acid hiện nay như đo mật độ quang OD (áp dụng cho hydroxyproline), điện di và sắc ký (Hồ Việt Quý, 2006).

Phương pháp đo mật độ quang OD có thể thực hiện nhanh chóng, đơn giản, không tốn kém nhưng độ chính xác không cao, không thể đo được ở nồng độ vết.

Phương pháp điện di có ưu điểm là tổng quát về toàn bộ các amino acid có trong mẫu, phương pháp này cũng có thể phát hiện amino acid ở dạng vết, nhờ đó có thể đánh giá được sự khác nhau giữa các mẫu phân tích. Tuy nhiên phương pháp này vẫn có các nhược điểm là tốn kém thời gian và chi phí, phải thực hiện nhiều lần, độ chính xác và độ nhạy không cao.

Phương pháp sắc ký có ưu điểm là phân tích được ngay cả với lượng mẫu cực nhỏ, tự động, độ chính xác và chọn lọc cao. Có thể phân tích nhiều amino acid trong cùng một lúc và sử dụng để phân tích các mẫu phức tạp.

Tùy vào từng trường hợp cụ thể cũng như điều kiện thiết bị để chọn phương pháp phân tích phù hợp. Bởi vì độ chính xác cao của phương pháp sắc ký, ngoài ra nền mẫu cao xuong rất phức tạp (Hồ Việt Quý, 2006).

1.5.8 Ứng dụng của collagen

Do có cấu trúc và tính chất hóa học đặc biệt nên collagen được ứng dụng và sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau như: ngành da, phim, mỹ phẩm, y học, dược phẩm, sinh học vật liệu và thực phẩm (Bae và ctv, 2008).

1.5.8.1 Ứng dụng trong mỹ phẩm

Collagen có tác dụng chống lão hóa, ngăn ngừa và cải thiện nếp nhăn. Khoảng 70% cấu trúc của da là collagen, phân bố chủ yếu ở lớp hạ bì của da. Collagen tạo ra một hệ thống nâng đỡ, hỗ trợ các đặc tính cơ học của da như sức căng, độ đàn hồi, duy trì độ ẩm, làm cho da được mịn màng và trẻ trung. Ngoài ra, collagen còn được bổ sung vào một số sản phẩm dưỡng tóc để phục hồi tóc.

1.5.8.2 Ứng dụng trong dược phẩm và y học

Collagen là vật liệu có khả năng phân hủy sinh học, tác dụng của collagen dựa trên sự kết hợp khả năng tạo màng và tạo gel một cách tự nhiên. Collagen được sử dụng y dược có mùi và vị trung hòa, không gây dị ứng và được hấp thụ hoàn toàn trong cơ thể con người, có tính tương thích sinh học cũng như khả năng cầm máu nên có thể được chế tạo thành những dạng khác nhau. Các đặc tính kỹ thuật của collagen được ứng dụng trong công nghệ dược phẩm (Aoe và ctv, 2004).

1.5.8.3 Ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm

Là tạo nên sự bền bột, tham gia tạo cấu trúc, độ dai của sản phẩm...

1.5.8.4 Trong công nghệ sản xuất kẹo

Trong sản xuất kẹo, hai chỉ số quan trọng của collagen hydrolysate là chỉ số Bloom và độ nhớt. Tùy vào từng loại sản phẩm mà yêu cầu về hai chỉ số này khác nhau. Chỉ số Bloom càng cao thì độ bền gel của collagen hydrolysate càng lớn ở cùng một nồng độ. Những collagen hydrolysate có độ Bloom cao được sử dụng trong ứng dụng định hình sản phẩm (Aoe và ctv, 2004).

Độ nhớt của collagen có thể tác động đến quá trình cố định trong sản phẩm, đặc biệt là khi collagen có hàm lượng cao. Chẳng hạn như đối với phương pháp tạo hình sử dụng khuôn tinh bột thì độ nhớt của collagen yêu cầu phải thấp để khối kẹo có thể chảy dễ dàng vào các khuôn, còn đối với phương pháp ép đùn thì độ nhớt của collagen phải cao để định hình cho sản phẩm.

1.5.8.5 Trong công nghệ sản xuất sữa và các sản phẩm từ sữa

Collagen hydrolysate được sử dụng như một phụ gia tạo cấu trúc trong công nghiệp sữa và các sản phẩm từ sữa.

1.5.8.6 Trong công nghệ sản xuất đồ uống

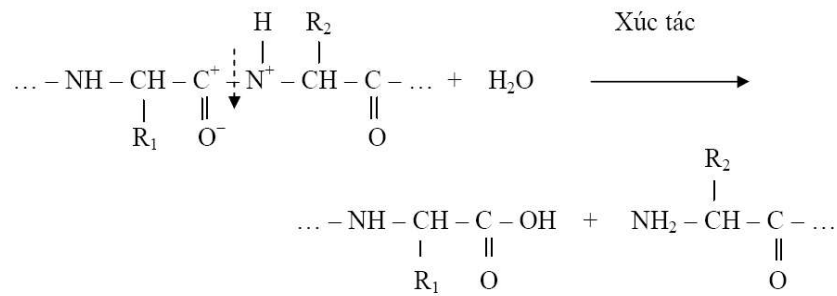
Tác giả Cioca (1984) đã sử dụng collagen bổ sung vào thức uống có cồn. Hiện nay collagen hydrolysate được sử dụng phổ biến cho quá trình làm sạch rượu vang, bia và nước trái cây vì nó làm giảm độ đục, tăng giá trị cảm quan mà không ảnh hưởng tới hương vị của sản phẩm cuối cùng. Hiện nay công ty cá sấu Hoa Cà đã sản xuất rượu có bổ sung collagen Hình 1.3.



Hình 1.3. Sản phẩm bổ sung collagen của công ty cá sấu Hoa Cà: Siro, kẹo và rượu

1.6 Tổng quan về thủy phân

Thủy phân protein là quá trình phân cắt mạch peptid tại các liên kết peptid qua các dạng trung gian như pepton, polypeptid, peptid và cuối cùng là amino acid theo phản ứng Hình 1.4.



Hình 1.4. Phản ứng phân cắt mạch peptide.

Như vậy sản phẩm thủy phân của protein là bao gồm các pepton, polypeptid, peptid và các amino acid (Lê Văn Việt Mẫn, 2010).

1.6.1 Các phương pháp thủy phân protein

1.6.1.1 Thủy phân bằng acid

Thường dùng acid clohydric, cũng có thể dùng acid sulphuric. Acid phân ly càng mạnh thì phản ứng thủy phân xảy ra càng nhanh. HCl có hoạt độ lớn nên được sử dụng phổ biến nhất. Phương pháp này dùng acid HCl 6N ở nhiệt độ 100 - 120°C trong 24 giờ. Do sử dụng acid nồng độ cao và nhiệt độ thủy phân cao nên một số amino acid bị phá hủy. Tryptophan bị phá hủy hoàn toàn, serine và threonine bị phá

hủy một phần. Glutamine và asparagine phân ly thành acid glutamic, acid aspartic và NH_4^+ và hầu hết các vitamin bị phá hủy (Nguyễn Đức Lượng, 2004).

1.6.1.2 Thủy phân bằng kiềm

Người ta cũng có thể thu nhận các amino acid bằng thủy phân với NaOH, được đun nóng trong nhiều giờ. Sản phẩm thu được hầu hết là các amino acid nhưng đều bị racemic hóa làm giảm giá trị dinh dưỡng, tạo lysinealanine làm giảm lysine trong thành phần, các amino acid như cysteine, serine và treonine bị phá hủy. Vì vậy, phương pháp này ít được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm (Nguyễn Đức Lượng, 2004).

1.6.1.3 Thủy phân bằng enzyme

Để thu nhận chế phẩm amino acid việc thủy phân bằng enzyme protease được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khoa học khác nhau đặc biệt phù hợp hơn cho các ứng dụng trọng thực phẩm và dược phẩm do sử dụng enzyme có nhiều ưu điểm. Ưu điểm lớn nhất của phương pháp này chính là kiểm soát được mức độ thủy phân, điều kiện tiến hành ôn hòa, sản phẩm thu được có hàm lượng protein cao mà không phá hủy đi thành phần các amino acid (Nguyễn Đức Lượng, 2004).

1.6.2 Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân bằng enzyme protease

1.6.2.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ

Do bản chất của enzyme là protein, tốc độ của phản ứng tăng lên cùng với sự tăng của nhiệt độ trong một phạm vi nhiệt độ nhất định mà chưa ảnh hưởng đến cấu trúc của enzyme. Mỗi enzyme có nhiệt độ tối thích khác nhau. Sự khác nhau này tùy thuộc vào nguồn gốc của các enzyme, điều kiện hoặc sự khác nhau về tính nhạy cảm với nhiệt độ của phân tử protein-enzyme. Nhiệt độ thích hợp của nhiều enzyme khoảng 40 - 50°C, các enzyme có nguồn gốc thực vật và vi sinh vật có nhiệt độ hoạt động thích hợp cao hơn (Phạm Thị Trân Châu và Phan Tuấn Nghĩa, 2006).

Nhiệt độ hoạt động tối thích của enzyme không cố định mà thay đổi tùy thuộc vào cơ chất và thời gian thủy phân.

1.6.2.2 Ảnh hưởng của pH

Hoạt động của enzyme phụ thuộc vào pH môi trường, vì pH ảnh hưởng đến trạng thái ion hóa các gốc R trong amino acid trong phân tử enzyme và cả cơ chất. pH thích hợp cho enzyme hoạt động khi enzyme và cơ chất kết hợp với nhau dễ dàng. Mỗi enzyme chỉ hoạt động mạnh nhất ở một vùng pH xác định, gọi là pH tối ưu. pH tối ưu của mỗi enzyme không cố định, có thể thay đổi tùy theo tính chất, nồng độ của cơ chất và nhiệt độ (Phạm Thị Trân Châu và Phan Tuấn Nghĩa, 2006).

1.6.2.3 Ảnh hưởng nồng độ enzyme và nồng độ cơ chất

Nồng độ enzyme ảnh hưởng lớn đến phản ứng enzyme. Trong điều kiện thừa cơ chất, tốc độ phản ứng phụ thuộc tuyến tính vào nồng độ enzyme.

Khi nồng độ cơ chất thấp, mức độ tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất giảm nên phản ứng enzyme giảm. Tốc độ phản ứng đạt tối đa khi tất cả enzyme đều kết hợp vào cơ chất (Phạm Thị Trân Châu và Phan Tuấn Nghĩa, 2006).

1.6.2.4 Ảnh hưởng của thời gian thủy phân

Thời gian thủy phân có ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình thủy phân, thời gian thủy phân càng dài thì protease càng có điều kiện thủy phân cơ chất càng triệt để. Nhưng nếu thời gian thủy phân quá dài sẽ dẫn tới vi sinh vật hoạt động làm sản sinh ra càng nhiều các sản phẩm thứ cấp như NH_3 , H_2S , CO_2 , indol... Ngược lại nếu thời gian thủy phân rút ngắn, sự thủy phân protein chưa triệt để, hiệu suất thủy phân kém, gây lãng phí nguyên liệu. Thường thì trong thời gian đầu tốc độ của quá trình thủy phân xảy ra mạnh, càng về sau do nồng độ cơ chất giảm trong khi nồng độ sản phẩm tạo thành tăng, đồng thời do độ bền của enzyme giảm theo thời gian nên tốc độ của phản ứng thủy phân giảm dần (Trần Minh Tâm, 1998).

1.6.2.5 Ảnh hưởng của diện tích tiếp xúc

Trong quá trình thủy phân yếu tố quan trọng thúc đẩy quá trình thủy phân là diện tích tiếp xúc. Để tạo điều kiện tốt hơn cho sự thủy phân của enzyme là làm tăng

khả năng tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất, muốn vậy phải làm nhỏ kích thước cơ chất trước khi thủy phân (Nguyễn Trọng Cảnh và Đỗ Minh Phụng, 1990).

Ngoài các yếu tố vừa nêu trên, quá trình thủy phân còn ảnh hưởng bởi các yếu tố khác như chất hoạt hóa và kìm hãm, anion kim loại, bản chất của enzyme.

Tóm lại quá trình thủy phân chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố vì vậy tùy thuộc vào nguyên liệu thủy phân mà phải tối ưu hóa các yếu tố này để đạt hiệu quả thủy phân cao.

1.6.3 Ứng dụng protein thủy phân

Sản phẩm của quá trình thủy phân protein là dịch đậm thủy phân giàu peptide trọng lượng phân tử thấp, đặc biệt là di và tri-peptide với ít amino acid tự do, được cho là có giá trị dinh dưỡng cao (Bhaskar và ctv, 2007).

Enzyme protease sẽ phá vỡ protein cơ thịt thành phần hòa tan và không hòa tan. Các phần không hòa tan chứa các chất không mong muốn và chất béo có thể được sử dụng trong thức ăn chăn nuôi. Các thành phần hòa tan chứa protein thủy phân và hàm lượng chất béo thấp. Các protein thủy phân có thể sử dụng để tăng cường hương vị thực phẩm, bổ sung vào thực phẩm chức năng, hoặc chỉ đơn giản là phụ gia dinh dưỡng vào thực phẩm chất lượng protein thấp (Kurozawa và ctv, 2008). Thủy phân protein cá (FPHs) đã thử nghiệm thành công để đưa vào hệ thống các thực phẩm khác nhau như sản phẩm ngũ cốc, cá và sản phẩm thịt, các món tráng miệng và bánh quy giòn... (Kristinsson và Rasco, 2000).

Thủy phân protein đóng vai trò quan trọng trong dinh dưỡng động vật, đặc biệt là tăng sức đề kháng miễn dịch (Pasupuleti và ctv, 2010). FPHs đã được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản để tăng cường sự tăng trưởng và tỷ lệ sống của cá (Kotzamanis, 2007). Kết quả cho thấy rằng các peptide trong thủy phân protein ảnh hưởng đến hiệu suất tăng trưởng và tính miễn dịch của ấu trùng cá chẽm. Trong một nghiên cứu khác, Nguyễn Thị Mỹ Hương và ctv (2012), đã tiến hành nuôi thử nghiệm để đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung thủy phân từ đầu cá ngừ trên sự sống còn và phát triển của tôm (*Penaeus vannamei*) và báo cáo sản phẩm thủy phân của đầu cá ngừ cải thiện đáng kể cả sự tăng trưởng và sự sống sót của tôm.

FPHs có thể được sử dụng như là một nguồn nitơ để duy trì sự phát triển của vi sinh vật. Ghorbel và ctv (2005) đã sử dụng sản phẩm thủy phân protein đã tách béo từ cá trích (*Sardinella aurita*) như nguồn nitơ cho sản xuất lipase ngoại bào bởi nấm sợi *Rhizopus oryzae* và báo cáo lượng lipase thu được cao hơn khi không bổ sung protein thủy phân.

Thủy phân protein cũng được sử dụng trong sản xuất vắc xin và sử dụng điều hòa sinh trưởng thực vật để tăng năng suất thương mại cây trồng cũng như để kiểm soát cỏ dại trong các nhà máy (Pasupuleti và ctv, 2010).

Những năm gần đây có nhiều nghiên cứu về thủy phân protein từ động vật vì những tính chất đặc trội mà protein đã thủy phân mang lại. Trong số đó có các nghiên cứu về thủy phân protein thịt heo, gà và cá (Soares và ctv, 2000; Vercruyssen và ctv, 2005; Bhaskar và ctv, 2007; Kurozawa và ctv, 2008; Kurozawa và ctv, 2009; Rossi và ctv, 2009; Schmidt và Salas-Mellado, 2009; Silva và ctv, 2009; Zhang và ctv, 2010; Di Bernardini và ctv, 2011; Xijuan và ctv, 2012; Ha và ctv, 2013). So với thịt bò, heo và gà thì thịt cá sấu chứa ít chất béo hơn và nhiều protein hơn (Hoffman và ctv, 2000; Beilken và ctv, 2007). Do vậy thịt cá sấu là nguyên liệu phù hợp hơn cho việc thủy phân thu nhận dịch protein thủy phân.

Việc thủy phân protein nhìn chung có thể được thực hiện khá giống như các loại protein thịt khác. Điều quan trọng cần nghiên cứu là tìm được loại enzyme và điều kiện phản ứng thích hợp như vừa nêu trên.

Sau khi thủy phân, dịch lỏng có thể được sấy phun thành bột. Quá trình chế biến này sẽ mang lại các lợi điểm là sản phẩm bột dễ bảo quản và được lâu hơn, sản phẩm dạng bột được bổ sung dễ dàng vào các loại sản phẩm thực phẩm khác nhau và phù hợp để phối chế cùng các thành phần nguyên liệu khác. Có thể nói, sấy phun sản phẩm lỏng thành bột sẽ tăng lên khả năng ứng dụng của sản phẩm thủy phân.

1.7 Tổng quan về enzyme protease

Các chế phẩm enzyme được sản xuất càng nhiều và được sử dụng trong hầu hết trong các lĩnh vực như: chế biến thực phẩm, nông nghiệp, chăn nuôi, y tế...

1.7.1 Giới thiệu chung về enzyme protease

Nhóm enzyme protease xúc tác quá trình thủy phân liên kết peptit ($-\text{CO}-\text{NH}$)_n trong phân tử protein, polypeptit đến sản phẩm cuối cùng là amino acid. Ngoài ra, nhiều protease cũng có khả năng thủy phân liên kết este và vận chuyển amino acid.

Protease cần thiết cho các sinh vật sống, rất đa dạng về chức năng từ mức độ tế bào, cơ quan đến cơ thể nên được phân bố rất rộng rãi trên nhiều đối tượng từ vi sinh vật (vi khuẩn, nấm và virus) đến thực vật (đu đủ, dứa...) và động vật (gan, dạ dày bê...). So với protease động và thực vật, protease vi sinh vật có những đặc điểm khác biệt. Trước hết hệ protease vi sinh vật là một hệ thống rất phức tạp gồm nhiều enzyme rất giống nhau về cấu trúc, khối lượng và hình dạng phân tử nên rất khó tách ra dưới dạng tinh thể đồng nhất.

Cũng do là phức hệ gồm nhiều enzyme khác nhau nên protease vi sinh vật thường có tính đặc hiệu rộng rãi cho sản phẩm thủy phân triệt để và đa dạng.

1.7.2 Phân loại protease

Protease (peptidase) thuộc phân lớp 4 của lớp thứ 3 (E.C.3.4). Protease được phân chia thành hai loại: endopeptidase và exopeptidase.

Dựa vào vị trí tác động trên mạch polypeptide, exopeptidase được chia thành hai loại:

+ Aminopeptidase: xúc tác thủy phân liên kết peptide ở đầu N tự do của chuỗi polypeptide để giải phóng ra một amino acid, một dipeptide hoặc một tripeptide.

+ Carboxypeptidase: xúc tác thủy phân liên kết peptide ở đầu C của chuỗi polypeptide và giải phóng ra một amino acid hoặc một dipeptide.

Dựa vào động học cơ chế xúc tác, endopeptidase được chia thành bốn nhóm:

+ Serin proteinase: là những proteinase chứa nhóm $-\text{OH}$ của gốc serine trong trung tâm hoạt động và có vai trò đặc biệt quan trọng đối với hoạt động xúc tác của enzyme. Nhóm này gồm hai nhóm nhỏ: chymotrypsin và subtilisin. Nhóm chymotrypsin bao gồm các enzyme động vật như chymotrypsin, trypsin, elastase. Nhóm subtilisin bao gồm hai loại enzyme vi khuẩn như subtilisin Carlsberg,

subtilisin BPN. Các serine proteinase thường hoạt động mạnh ở vùng kiềm tính và thể hiện tính đặc hiệu cơ chất tương đối rộng.

+ Cysteine proteinase: các proteinase chứa nhóm –SH trong trung tâm hoạt động. Cystein proteinase bao gồm các proteinase thực vật như papain, bromelin, một vài protein động vật và proteinase ký sinh trùng. Các cystein proteinase thường hoạt động ở vùng pH trung tính, có tính đặc hiệu cơ chất rộng.

+ Aspartic proteinase: hầu hết các aspartic proteinase thuộc nhóm pepsin. Nhóm pepsin bao gồm các enzyme tiêu hóa như: pepsin, chymosin, cathepsin, renin. Các aspartic proteinase có chứa nhóm carboxyl trong trung tâm hoạt động và thường hoạt động mạnh ở pH trung tính.

+ Metallo proteinase: là nhóm proteinase được tìm thấy ở vi khuẩn, nấm mốc cũng như các vi sinh vật bậc cao hơn. Các metallo proteinase thường hoạt động vùng pH trung tính và hoạt độ giảm mạnh dưới tác dụng của EDTA.

Ngoài ra, dựa vào pH hoạt động protease được phân loại thành ba nhóm: Protease acid: pH 2-4; Protease trung tính: pH 7-8; Protease kiềm: pH 9-11 (Nguyễn Trọng Căn và ctv, 1998).

1.7.3 Cơ chế xúc tác của enzyme protease

Mặc dù tâm hoạt động của các protease vi sinh vật có khác nhau nhưng đều xúc tác cho phản ứng thủy phân liên kết peptide theo cùng cơ chế chung như sau:



Trong đó:

E: Enzyme

S: Cơ chất

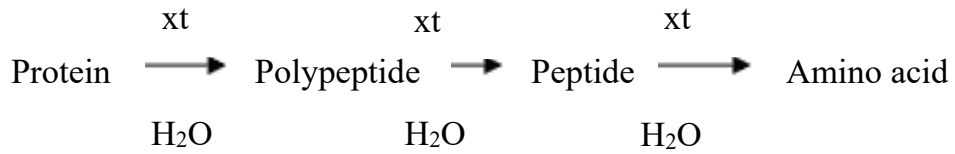
ES: Phức chất enzyme – cơ chất

ES': Phức chất trung gian enzyme – cơ chất acyl hóa (Acyl enzyme)

P₁: Sản phẩm đầu tiên chuỗi phản ứng (nhóm amin tự do mới tạo thành)

P₂: Sản phẩm thứ hai của chuỗi phản ứng (nhóm carboxyl tự do mới tạo thành) (Theo Nguyễn Văn Mùi, 2012).

1.7.4 Phương pháp thủy phân bằng enzyme protease



Hình 1.5: Các sản phẩm trung gian của quá trình thủy phân protein

Thủy phân protein là quá trình phân cắt mạch protein ở vị trí liên kết peptide thành các dạng sản phẩm trung gian như polypeptide, peptide và sản phẩm cuối cùng là các phân tử amino acid (Bhaskar và ctv, 2007; McCarthy và ctv, 2013).

Hiện nay thủy phân protein có thể được tiến hành bằng NaOH hoặc bằng hệ enzyme protease. Tuy nhiên trong công nghiệp thực phẩm phương pháp thủy phân protein bằng hệ enzyme protease thường được sử dụng do hiệu suất thủy phân cao và chất lượng của dịch thủy phân tốt hơn so với phương pháp thủy phân bằng NaOH. Phương pháp thủy phân bằng kiềm không được sử dụng do tạo ra hiện tượng racemic hóa làm giảm giá trị dinh dưỡng của các amino acid.

1.8 Tình hình nghiên cứu thủy phân protein dùng enzyme

1.8.1 Trên thế giới

Những năm gần đây có nhiều nghiên cứu về thủy phân protein từ động vật vì những tính chất nổi bật mà protein thủy phân mang lại. Bao gồm các nghiên cứu về thủy phân protein thịt heo, gà, cá, vẹm, mực, phụ phẩm ngành chế biến thủy sản...

Theo Zhuang và ctv (2009) đã nghiên cứu tối ưu hóa hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng trong thủy phân collagen sứa (*Rhopilema esculentum*). Để tối ưu hóa các điều kiện thủy phân collagen của sứa với hoạt động bất giữ gốc hydroxyl cao nhất, collagen chiết xuất từ sứa đã được thủy phân với enzyme Trypsin. Các điều kiện tối ưu thu được từ thí nghiệm là pH 7,75, nhiệt độ 48,77°C và tỷ lệ enzyme trên cơ chất 3,50%. Phân tích phương sai trong phương pháp bề mặt đáp ứng cho thấy độ pH và tỉ lệ enzyme trên cơ chất là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đáng kể quá trình ($p < 0,05$ và $p < 0,01$, tương ứng). Thủy phân của collagen từ sứa được tách chiết bởi HPLC và ba thành phần (HF-1 > 3000 Da, 1000

Da < HF-2 < 3000 Da và HF-3 < 1000 Da) được thu nhận. HF-2 có hoạt động bắt giữ gốc hydroxyl cao nhất với năng suất cao nhất so với hai thành phần kia.

Theo Fang và ctv (2012) đã nghiên cứu tối ưu hóa sản xuất thủy phân chống oxy hóa từ protein cơ mực sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng. Protein cơ mực, chiết xuất từ các sản phẩm mực (*Ommastrephes bartrami*) đã được thủy phân bởi năm loại enzyme protease (pepsin, trypsin, papain, alcalase và flavourzyme). Khả năng bắt giữ gốc tự do DPPH đã được sử dụng để đánh giá hoạt động chống oxy hóa của thủy phân. Kết quả cho thấy các thủy phân thu được bằng papain có hoạt động chống oxy hóa cao nhất. Phương pháp bề mặt đáp ứng đã được sử dụng để tối ưu hóa điều kiện quá trình thủy phân, bao gồm tỷ lệ enzyme / cơ chất (1 - 2%), nhiệt độ phản ứng (45 - 55°C) và thời gian thủy phân (30 - 60 phút). Các điều kiện tối ưu thu được như sau: tỷ lệ enzyme / cơ chất 1,74%, nhiệt độ 51°C, thời gian 46 phút, theo đó, hoạt động bắt giữ gốc tự do DPPH là 74,25%.

Theo Kurozawa và ctv (2008), đã nghiên cứu tối ưu hóa thủy phân protein từ thịt gà bằng enzyme alcalase 2,4L và đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ (43 - 77°C), tỷ lệ enzyme / cơ chất (0,8 - 4,2%) và độ pH (7,16 - 8,84) trên mức độ thủy phân và tỉ lệ thu hồi protein. Quá trình thủy phân bằng enzyme đã được tối ưu hóa cho mức độ thủy phân protein và tỷ lệ thu hồi tối đa. Kết quả nghiên cứu cho thấy các điều kiện tối ưu xác định được như sau: nhiệt độ 52,5°C, tỷ lệ enzyme / cơ chất 4,2% và pH 8. Dưới những điều kiện này, mức độ thủy phân thu được 31% và tỷ lệ thu hồi protein 91%. Điện di SDS-PAGE ở nồng độ gel tách 12% và nồng độ gel gom 4% cho thấy một số liên kết protein có trong thịt đã được cắt sau khi thủy phân và hàm lượng acid glutamic, acid aspartic, lysine và leucine cao.

Theo Silva và ctv (2009) đã nghiên cứu tối ưu hóa thủy phân protein thịt vẹm bằng enzyme Protamex. Mỗi quan hệ của nhiệt độ (46 - 64°C), tỷ lệ enzyme / cơ chất (0,48 - 5,52%) và pH (6,7 - 8,3) đến mức độ thủy phân được xác định. Phương pháp bề mặt đáp ứng cho thấy các điều kiện tối ưu cho enzyme thủy phân cơ thịt vẹm là pH 6,85; nhiệt độ 51°C và tỉ lệ enzyme / cơ chất là 4,5%. Dưới những điều kiện này mức độ thủy phân thu được 26,5% và tỷ lệ thu hồi protein 65%.

Theo Zhuang và ctv (2012) đã thủy phân collagen từ sứa (*Rhopilema esculentum*) bằng enzyme alcalase để chuẩn bị peptide ức chế Angiotensin - I - Converting Enzyme (ACE). Các điều kiện thủy phân tối ưu được xác định bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Kết quả cho thấy các điều kiện tối ưu là nhiệt độ 52,7°C, pH 8,63, tỉ lệ enzyme / cơ chất là 3,46% và hoạt động ức chế ACE của thủy phân thu được có thể lên đến 81,7 %.

Theo Bhaskar và ctv (2007) đã thủy phân protein từ nội tạng cừu gồm dạ dày, ruột lớn và nhỏ bằng enzyme protease từ nấm với tỷ lệ 1% tổng khối lượng chất khô tại $43 \pm 1^\circ\text{C}$ với độ pH khoảng 7,0 trong 45 phút thì mức độ thủy phân đạt 34% và tỷ lệ thu hồi nitơ lớn hơn 64%. Điện di SDS-PAGE ở nồng độ gel 12% cho thấy các peptide có trọng lượng phân tử trung bình lớn hơn 10 kDa.

Theo Liu và ctv (2012) đã nghiên cứu sử dụng hỗn hợp enzyme protease kiềm và papain để thủy phân da cá tuyết sản xuất collagen polypeptide có khả năng sử dụng như là chất phụ gia thức ăn chăn nuôi. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong điều kiện tối ưu (protease kiềm 4,0%, papain 4,5%, nhiệt độ 55°C, pH 8, thời gian phản ứng 11 giờ), mức độ thủy phân protein đạt 25,61%. Các sản phẩm của quá trình thủy phân có khả năng chống oxy hóa tốt.

Theo Ovissipour và ctv (2010) đã nghiên cứu thủy phân protein từ đầu cá ngừ vây vàng sử dụng 1,5% alcalase (v/w) và 1,5% protamex (w/w) ở pH tự nhiên sau 4 và 24 giờ với tỷ lệ nước / nguyên liệu 1: 1 (w / v). Kết quả về mức độ thủy phân, hàm lượng protein thu hồi của cả hai sản phẩm thủy phân bằng hai enzyme tăng lên khi thời gian thủy phân càng dài. Mức độ thủy phân và hàm lượng protein của dịch thủy phân bằng alcalase cao hơn so với dịch thủy phân bằng protamex ($p < 0,05$). Mức độ thủy phân sau 24 giờ của sản phẩm thủy phân bằng alcalase và protamex lần lượt là 34% và 19%. Hàm lượng protein của dịch thủy phân bằng alcalase sau 4 giờ và 24 giờ lần lượt là 76,8% và 80,2%; hàm lượng protein của dịch thủy phân bằng protamex sau 4 giờ và 24 giờ lần lượt là 72,32% và 75,4%.

1.8.2 Trong nước

Năm 2013, Cao Xuân Thủy và ctv đã nghiên cứu công nghệ sản xuất đậm cá phân lập từ phế liệu chế biến cá tra. Kết quả đã nghiên cứu điều kiện thủy phân phụ phẩm cá tra bằng enzyme alcalase 2,4L có mức độ thủy phân cao nhất là 19,20% trong các điều kiện thủy phân: tỷ lệ phối trộn enzyme / cơ chất: 0,2% (quy đổi theo hoạt tính enzyme là 0,5 IU/ g cơ chất hoặc 0,051 IU/ g protein trong cơ chất); pH 6,8; nhiệt độ 61°C; tỷ lệ nước bổ sung: 150 - 200%; thời gian 60 - 90 phút.

Nguyễn Thị Mỹ Hương (2012) đã nghiên cứu sản xuất sản phẩm thủy phân protein từ đầu cá ngừ vây vàng bằng protease thương mại. Sản phẩm thủy phân protein đã được sản xuất từ đầu cá ngừ vây vàng bằng enzyme protamex 0,5% ở nhiệt độ 45°C và pH tự nhiên trong thời gian 6 giờ với tỉ lệ nước/ nguyên liệu là 1:1. Các kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng mức độ thủy phân và tỉ lệ thu hồi nitơ trong sản phẩm thủy phân tăng lên cùng với sự tăng thời gian thủy phân. Sau 6 giờ thủy phân, mức độ thủy phân đã đạt được 30,1% và tỉ lệ thu hồi nitơ là 85,1%. Sản phẩm thủy phân có hàm lượng protein 88,2%, lipit 1,4% và tro 8,3%. Sản phẩm thủy phân protein này có hàm lượng amino acid không thay thế cao và có thể được sử dụng trong sản xuất thức ăn cho người và động vật.

Tóm lại, đến nay trên thế giới cũng như trong nước đã có nhiều nghiên cứu về việc ứng dụng enzyme protease để thủy phân các nguyên liệu, phụ phẩm chứa nhiều protein từ động vật. So với thịt bò, heo và gà, thịt cá sấu có chứa hàm lượng protein cao và hàm lượng chất béo thấp do đó phù hợp hơn cho việc thủy phân thu nhận dịch protein thủy phân. Sử dụng enzyme để thủy phân protein là một quá trình, trong đó có thể cải thiện các tính chất hóa lý và giữ nguyên thành phần dinh dưỡng của protein (Slizyte, 2005). Tuy nhiên đến nay chưa có nghiên cứu báo cáo khoa học xuất bản nào về thủy phân protein thịt cá sấu.

1.9 Tổng quan về sấy phun

1.9.1 Nguyên lý sấy phun

Sấy phun là phương pháp sấy giúp chuyển trạng thái của nguyên liệu từ dạng lỏng sang dạng bột khô. Trong quá trình sấy phun, dịch nguyên liệu được hệ thống vòi phun phân tán thành các hạt ẩm cho tiếp xúc với luồng không khí nóng trong buồng sấy với thời gian ngắn. Vì vậy nhiệt độ của các hạt không bị tăng cao, các thành phần dinh dưỡng của nguyên liệu không bị biến đổi (Patel và ctv, 2009).

1.9.2 Chất trợ sấy

Khi sấy phun thường xảy ra hiện tượng các hạt sản phẩm bột bám dính vào thành của buồng sấy phun. Sự bám dính này là do sự chênh lệch nhiệt độ giữa nhiệt độ hóa gương (T_g) của các hạt sau khi phun và nhiệt độ không khí sấy. Để làm giảm hiện tượng bám dính, cải thiện hiệu suất thu hồi và chất lượng sản phẩm bột sấy phun thì chất trợ sấy đã được phối trộn thêm vào (Adhikari, 2004).

Maltodextrin

Theo United State Food and Drug Administration (USFDA), maltodextrin là polysaccharide có chứa các đơn vị D-glucose kết hợp với nhau bằng liên kết α -1,4 và có chỉ số DE (Dextrose equivalence) thấp hơn 20.

Maltodextrin được thủy phân từ tinh bột sắn hay tinh bột khoai tây. Theo Kened và ctv (1995) chỉ số DE sẽ quyết định tính chất của maltodextrin và được chia thành các loại: Maltodextrin với chỉ số cao DE tan trong nước tốt hơn maltodextrin có chỉ số DE thấp. Chỉ số DE càng thấp thì cấu trúc mạng polymer của tinh bột càng phức tạp, do đó khả năng hòa tan kém.

1.9.3 Cơ chế làm giảm hiện tượng bám dính của chất trợ sấy

Maltodextrin có cùng cơ chế làm giảm hiện tượng bám dính. Khi phối trộn maltodextrin vào dịch nguyên liệu, các chất này sẽ tạo các liên kết để gắn kết với các thành phần vật chất khô trong dịch nguyên liệu, do đó sẽ làm tăng nhiệt độ hóa gương (T_g) của khối nguyên liệu, giảm sự chênh lệch giữa nhiệt độ của các phân tử

trong buồng sấy phun với nhiệt độ hóa gương của chúng, kết quả sẽ làm giảm hiện tượng bám dính (Adhikari, 2004; Fang và Bhandari, 2012).

1.9.4 Các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm bột sấy phun

1.9.4.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ không khí sấy ảnh hưởng đến các tính chất vật lý của bột như ẩm độ, độ hút ẩm, tỷ trọng và kích thước hạt (Chegini và Ghobadian, 2005). Nhiệt độ sấy phun thường trong khoảng 120 - 220°C. Khi tốc độ bơm dòng nhập liệu không thay đổi, sự tăng của nhiệt độ không khí sấy sẽ giúp làm giảm ẩm độ của bột sấy.

Hiệu suất của quá trình sấy phun cũng bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ không khí sấy. Theo Goula và Adamopoulos (2008); Tonon và ctv (2011), nhiệt độ không khí sấy cao giúp cho các hạt bột khô và dễ dàng thu hồi. Tuy nhiên, theo Chegini và Ghobadian (2007), nếu sử dụng nhiệt độ không khí sấy quá cao, sự chênh lệch giữa nhiệt độ không khí sấy và nhiệt độ hóa gương của khối nguyên liệu sẽ lớn và như vậy sẽ gây nên hiện tượng bám dính, làm giảm hiệu suất thu hồi của quá trình sấy.

1.9.4.2 Ảnh hưởng của tốc độ bơm dòng nguyên liệu

Theo Tonon và ctv (2011), khi dòng nguyên liệu được bơm vào với tốc độ chậm, các hạt ẩm được vòi phun phân tán có kích thước nhỏ và mật độ các hạt trong buồng sấy thấp nên các hạt ít bị kết dính lại với nhau. Khi tăng tốc độ bơm dòng nhập liệu làm mật độ các hạt trong buồng sấy quá dày sẽ làm các hạt dễ dính bám lại với nhau, làm tăng kích thước hạt sản phẩm sấy, đồng thời các hạt cũng dễ dàng dính bám vào thành buồng sấy nên hiệu suất thu hồi bột thấp hơn so với khi sấy với tốc độ bơm chậm.

1.9.4.3 Ảnh hưởng của hàm lượng chất trợ sấy

Theo Kurozawa (2009), khi tiến hành sấy phun dịch thủy phân protein từ thịt gà, hàm lượng maltodextrin 10%, 20%, 30% (phần trăm theo tỷ lệ khối lượng vật chất khô trong nguyên liệu) được sử dụng để thêm vào trong quá trình sấy phun. Kết quả thu được sản phẩm bột có ẩm độ thấp 1,2 - 1,8% (% ẩm độ theo cơ sở ướt). Kết

quả này tương đồng với kết quả khi sấy phun dịch ép từ quả “Pineapple” của Gabas và ctv (2007), dịch ép từ nhóm quả “Acai” của Tonon và ctv (2011); Papadakis và ctv (2006). Do maltodextrin là chất có trọng lượng phân tử lớn, khả năng hút ẩm kém nên các tính chất hút ẩm của sản phẩm bột sấy phun cũng kém, ẩm độ của sản phẩm cuối cùng cũng thấp hơn và khả năng bảo quản được lâu hơn. Các kết quả của Abadio và ctv (2004) nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng maltodextrin và tốc độ bơm đến quá trình sấy phun; Goula và Adamopoulos (2005) nghiên cứu quá trình sấy phun dịch quả cà chua; Grabowski và ctv (2006) nghiên cứu sấy phun dịch thủy phân khoai lang cũng cho thấy tác động làm giảm khả năng hút ẩm của bột sấy phun khi sử dụng chất trợ sấy là maltodextrin.

Hiệu suất thu hồi khi sử dụng hàm lượng maltodextrin là 30% (g maltodextrin/g chất khô) với hiệu suất thu hồi $52,98 \pm 5,13\%$ khi sấy phun dịch quả “Bayberry” (Fang và Bhandari, 2012).

Ảnh hưởng của maltodextrin đến chất lượng của sản phẩm bột sấy phun là tương đồng với nhau khi sử dụng với cùng hàm lượng (Masters, 1991). Các quá trình sấy thực phẩm hiện nay thường lựa chọn maltodextrin là chất trợ sấy để bổ sung vào dịch nguyên liệu với hàm lượng 30 - 40%.

1.9.5 Tình hình nghiên cứu quá trình sấy phun trong nước và trên thế giới

Theo Adhikari và ctv (2004) đã nghiên cứu ảnh hưởng của việc bổ sung maltodextrin đến quá trình động học và hiện tượng bám dính của các loại thực phẩm giàu acid trong quá trình sấy phun. Kết quả cho thấy cơ chế làm giảm hiện tượng bám dính của các hạt bột sấy lên thành buồng sấy là nhờ tác động làm tăng nhiệt độ hóa gương của maltodextrin và giúp cải thiện ẩm độ của sản phẩm sấy phun.

Cai và Corke (2000) đã nghiên cứu quá trình sấy phun bột sắc tố *Amaranthus* Betacyanin. Nhiệt độ không khí sấy được khảo sát ở các mức nhiệt độ 150°C, 165°C, 180°C, 195°C, 210°C với các loại maltodextrin có chỉ số DE 10, 15, 20, 25. Kết quả cho thấy thêm maltodextrin làm giảm đáng kể tính hút ẩm của bột sản phẩm. Phối trộn maltodextrin có chỉ số DE 25 và 10 vào dịch nguyên liệu khi sấy phun giúp thời gian bảo quản sản phẩm kéo dài 63 tuần so với khi sử dụng riêng maltodextrin có chỉ

số DE 25 và 10. Sản phẩm bột có độ khô tốt hơn so với các sản phẩm bột thương mại khác.

Fang và Bhandari (2012) đã nghiên cứu so sánh hai loại chất trợ sấy là whey protein và maltodextrin trong quá trình sấy phun dịch quả “Bayberry”. Kết quả cho thấy cơ chế làm giảm hiện tượng bám dính của whey protein là liên kết với các phân tử trên bề mặt các hạt, làm giảm sức căng bề mặt của các hạt. Đối với maltodextrin thì cơ chế là làm tăng nhiệt độ hóa gương của khối nguyên liệu.

Kurozawa (2009) đã nghiên cứu quá trình sấy phun dịch thủy phân protein từ thịt gà. Kết quả cho thấy khi sấy yếu tố nhiệt độ không khí sấy (120 - 200°C) và lưu lượng bơm dòng nhập liệu (0,1 - 0,38 kg.h⁻¹) có ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi của quá trình sấy phun. Việc tăng nhiệt độ không khí sấy giúp làm giảm độ ẩm bột và tăng hiệu suất thu hồi sản phẩm (38,7 - 59,4%). Khả năng kháng oxy hóa khi thử với gốc tự do diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) được dùng để đánh giá chất lượng của mẫu bột sấy phun. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy việc bổ sung 10% (w/w) maltodextrin vào dịch thủy phân giúp làm giảm tính hút ẩm của sản phẩm và tăng nhiệt độ hóa gương.

1.10 Ứng dụng kết quả nghiên cứu tác dụng hỗ trợ sức khỏe của sản phẩm trên động vật thí nghiệm

Một số thuốc trước khi được sử dụng, phải nghiên cứu trên động vật thí nghiệm nhưng kết quả lại được sử dụng trên người. Một trong những điều kiện quan trọng là phải xác định liều có tác dụng tối ưu dành cho người (có hiệu quả nhất nhưng lại không độc). Vì vậy, phép ngoại suy từ các kết quả thí nghiệm với động vật chuyển sang người có một ý nghĩa rất quan trọng.

Yếu tố ảnh hưởng đến liều có hiệu quả tương đương giữa các loài động vật như sự chuyển hóa thuốc; Thời gian có hiệu quả tác dụng; Nồng độ tối thiểu có hiệu quả trong huyết tương; Sự hô hấp tế bào; Diện tích bề mặt cơ thể.

Bảng 1-5. Hệ số ngoại suy giữa người và các loài động vật thí nghiệm về liều có hiệu quả tương đương

Từ - sang	Chuột nhắt trắng	Chuột cống trắng	Thỏ	Chó	Người
Chuột nhắt trắng	1,00	0,55	0,25	0,15	0,085
Chuột cống trắng	1,82	1,00	0,45	0,27	0,150
Thỏ	4,00	2,20	1,00	0,60	0,340
Chó	6,67	3,67	1,67	1,00	0,570

(Nguồn: Bộ Y tế, 2015)

1.10.1 Các nghiên cứu ngoài nước

Theo y học truyền thống phương đông, cao xương một vài loài động vật có thể chữa và hỗ trợ chữa các bệnh về xương khớp ở người. Xương của các động vật này được nấu rất lâu để trích ly collagen từ xương, sau đó dịch collagen được nấu cô lại thành cao. Hiện nay collagen được trích chủ yếu từ xương động vật hoặc các bộ phận khác như da, gân ... bằng phương pháp thủy phân bởi acid acetic hoặc pepsin ở nhiệt độ thường chứ không dùng nhiệt độ cao (Wood, 2008). Do đó không thể khẳng định các tính chất có lợi cho sức khỏe phát hiện đến nay trong cao xương cá sấu là chỉ do collagen hay còn thành phần hàm lượng thấp nào đó khác.

Ứng dụng của collagen trích từ xương (hay gọi cao xương) cá sấu cũng cần được quan tâm. Quan sát thực tế cho thấy các sản phẩm cao xương hiện nay đặc sệt, khó hòa tan trong nước và khi phân tán trong nước cho dung dịch có độ đục cao (Omokanwaye, 2010). Các đặc tính này sẽ giới hạn khả năng ứng dụng cao xương vào các sản phẩm thực phẩm khác nhau. Collagen loại I trong xương có cấu trúc 3 sợi xoắn lẫn nhau. Cấu trúc như vậy làm cho collagen khó được tiêu hóa hiệu quả trong đường ruột khi được tiêu thụ. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng pepsin (enzyme thủy phân protein trong bao tử) không thể phá vỡ hoàn toàn cấu trúc xoắn 3 của collagen. Trypsin (một trong hai enzyme chính chịu trách nhiệm thủy phân peptit trong ruột non – trypsin và chymotrypsin) cũng không thủy phân được collagen loại I một cách hoàn toàn (Buckley, 2008; Kittiphattanabawon và ctv, 2010).

Collagen là protein nên dịch thủy phân collagen cũng có các tính chất có lợi cho sức khỏe. Một số nghiên cứu cho thấy collagen có thể cải thiện sức khỏe da và giúp chữa lành tổn thương da, chống mệt mỏi khi cho chuột ăn collagen. Theo các nghiên cứu của Gungormus và Kaya (2002), collagen loại I khi được đắp vào xương trong quá trình phẫu thuật có thể làm tăng tốc quá trình lành xương.

Theo Wood và ctv (2008) khi trích ly collagen từ xương cá sấu (*Alligator mississippiensis*) bằng acid và pepsin, kết quả cho thấy, collagen trong xương cá sấu trên là collagen loại I với khối lượng phân tử ($[\alpha 1]_2\alpha 2$) là 359 kDa và 356 kDa. Thành phần amino acid trong collagen rất phong phú, đặc biệt chứa nhiều glycine, proline, alanine và hydroxylprolin.

1.10.2 Các nghiên cứu trong nước

Xương của các loài động vật như hổ, báo, gấu... đã được người dân Việt Nam sử dụng để nấu cao từ lâu, dùng trong các bệnh về đau xương, tê thấp, đi lại khó khăn ngoài ra còn dùng trong những bệnh cảm gió, dùng làm thuốc bổ khi cơ thể suy yếu. Liều lượng sử dụng hàng ngày tương ứng: cao hổ cốt 4 – 6g, cao hổ 5 – 10g, cao gấu 8 – 12g (theo Đỗ Tất Lợi, 2006). Cách nấu cao xương của các động vật này tương tự nhau, xương khi vừa lấy ra đem cạo hết thịt rồi cho vào một cái giỏ lớn bằng tre đem ngâm trong dòng suối 15 – 20 ngày. Sau đó người ta treo giỏ xương lên cho khô và loại bỏ mùi hôi của thịt thổi rửa khi ngâm trong nước gọi là “khu phong”. Sau đó đập xương thành các mảnh nhỏ để dễ rửa sạch tùy ngâm trong nước 24 giờ. Xương được rửa lại bằng nước và ngâm vào rượu có gừng (đỡ mùi tanh). Sau đó xương lấy ra để khô rồi cho vào nồi đồng, đổ nước vào cho ngập tiến hành nấu nhiều lần, cuối cùng cô đặc để thu được cao xương.

Bên cạnh đó, theo ghi nhận của Viện Y Dược Học Dân Tộc Tp. HCM thì sản phẩm cao xương cá sấu cũng có hiệu quả tốt với một số bệnh nhân về xương khớp (loại bệnh nan giải và ngày càng nhiều người lớn tuổi mắc phải) và thông tin này cần được thông báo rộng rãi hơn đến người sử dụng (Tôn Thất Hưng và ctv, 2013).

Trong các năm 2014 – 2015, các nghiên cứu đã cho thấy cao xương cá sấu liều 3,77 g/kg có khả năng làm tăng khả năng thực bào, tăng trọng lượng tương đối, tăng

miễn dịch và tăng số lượng bạch cầu tổng, bạch cầu lympho, bạch cầu đơn nhân. Trong khi liều 1,89g/kg chỉ làm tăng khả năng thực bào đạt ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh lý (Trần Thị Minh Tâm và ctv, 2015). Cao xương cá sấu hoa cà ở liều 1,89g/kg và 3,77g/kg, có tác động làm giảm thiểu các khuyết hỏng do prednison gây ra trong cấu trúc xương (Trần Minh Thông và ctv, 2016). Cao xương cá sấu hoa cà cũng có tác dụng tăng lực và hạ acid uric máu trên thực nghiệm (Trần Thị Minh Tâm và ctv, 2014).

Như vậy, các nghiên cứu khoa học đã cho thấy tác dụng rất tốt của cao xương cá sấu. Bên cạnh đó, đa số các sản phẩm, được sản xuất theo phương pháp truyền thống, không được quản lý chặt chẽ về mặt chất lượng và vệ sinh. Trong quá trình chế biến cao, nếu không tuân thủ các quy tắc chế biến và bảo quản nhất định, các loại amino acid sẽ bị hư hỏng và không tạo được tác dụng mong muốn mà có thể gây tác dụng không tốt cho sức khỏe người tiêu dùng. Hiểu biết về các thành phần trong cao cá sấu còn hạn chế, do đó cần có những nghiên cứu sâu hơn về thành phần của cao và xương cá sấu.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

2.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ năm 2014 tại Khoa Công nghệ hóa học – Thực phẩm và Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường, trường Đại học Nông Lâm Tp.HCM.

2.2 Nguyên vật liệu

Thịt cá sấu đông lạnh và xương cá sấu thô chưa loại tủy và đã loại tủy được cung cấp bởi công ty Cá Sấu Hoa Cà (Q12, TP HCM).

Các sản phẩm thực phẩm có thể bổ sung collagen từ xương cá sấu.

Thịt cá sấu được xử lý sơ bộ bằng cách cắt nhỏ, xay nhuyễn ($\leq 4\text{mm}$), chia thành các phần nhỏ 50 gam và trữ đông ở -20°C cho tới khi sử dụng cho toàn bộ các thí nghiệm phía sau.



(a)

(b)

Hình 2.1. (a) Thịt cá sấu đông lạnh (b) Mẫu xương cá sấu với kích thước $\leq 4\text{ mm}$

Enzyme flavourzyme 500 MG, alcalase 2,4L EG (Novozymes - Đan Mạch) và neutral PL (SEB - Ấn Độ). Enzyme alcalase là một endo-peptidase có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis*, có hoạt độ là 2,4 AU (Anson Units)/g. Enzyme flavourzyme có cả hoạt tính của endo-peptidase và của exo-peptidase nhưng chủ yếu là exo-peptidase, có nguồn gốc từ *Aspergillus oryzae*, hoạt độ là 500 LAPU (Leucine Aminopeptidase Units)/g. Enzyme neutral PL có hoạt tính endo-protease thủy phân protein, hoạt tính là 750IU.

2.3 Thiết bị và dụng cụ

Nhóm hóa chất dùng cho phân tích các chỉ tiêu hóa lý: nước cất; nước khử ion; HCl; H₂O₂; HNO₃; Chất chuẩn kim loại; H₂SO₄; NaOH; K₂SO₄; CuSO₄; Metyl đỏ, Xanh metylen; H₃BO₃; Citric acid; Na(CH₃CO₂); Propan-1-ol; Cloramin-T; p-; Ethanol; Hydroxylprolin; Triethylamin; Phenylisothiocyanate; Acetonitrile; Acetic acid; CH₃COONa.3H₂O; Chuẩn amino acid 17 chất; Petroleum ether.

Nhóm thiết bị sử dụng: Tủ sấy MOV – 112 – PK, hãng Panasonic; Máy đo pH Jenway 3510; Bình khí nén N₂ ALPHAGAZ; Cân phân tích; Tủ cấy vô trùng; Kính hiển vi; Máy chưng cất nitơ (Gerhardt); Máy vô cơ hóa mẫu (Gerhardt); Máy phá mẫu kim loại; Máy đo màu Minolta (CR 400, Nhật); Thiết bị vi sóng; Máy siêu âm (Elma Đức); Máy cô quay chân không (BIBBY – Anh); Thiết bị đồng hóa mẫu; Máy ly tâm (Hermle – Việt Nam); Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Hewlett Packard 1100; Máy phân tích thủy ngân (DMA80 -Milestone); Máy sinh hóa (Prietest smart – Robonik); Máy huyết học (Celltac α – Nihon Kohden); Bàn giữ tiêu bản 42°C; Máy AAS (SpectrAA 220Z – Varian); Lò nung; Máy UV-Vis (8453 - HP); Bình định mức 100 ml ISO LAB; Micropipet: 0,5 – 10 µl, BIO-RAD; Giấy lọc 0,2 µm Sartorius;

2.4 Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Cải thiện qui trình nấu cao truyền thống để tối ưu hóa hàm lượng collagen thu được trong cao cá sấu

Nội dung 1.1: Xác định thành phần hóa lý trong xương cá sấu

Nội dung 1.2: Đánh giá ảnh hưởng của các cách xử lý đến trích ly collagen

Nội dung 1.3 So sánh các phương pháp trích ly collagen từ xương khi nấu ở áp suất khí quyển

Nội dung 1.4: So sánh tác dụng của các phương pháp xử lý khi nấu ở áp suất cao

Nội dung 1.5: Khảo sát thời gian nấu cần thiết khi nấu ở áp suất khí quyển và áp suất cao

Nội dung 1.6: Khảo sát ảnh hưởng của áp suất chân không đến quá trình cô đặc dịch collagen.

Nội dung 1.7: Đề xuất qui trình nấu cao và chế biến thử nghiệm

Nội dung 2: Thủy phân protein thịt cá sấu

Nội dung 2.1: Khảo sát ảnh hưởng của loại enzyme đến mức độ thủy phân protein thịt cá sấu

Nội dung 2.2: Tối ưu hóa quá trình thủy phân bằng enzyme lựa chọn

Nội dung 3: Sấy phun dịch protein thủy phân thịt cá sấu

Nội dung 3.1: Khảo sát ảnh hưởng của các thông số sấy phun đến chỉ tiêu chất lượng của bột

Nội dung 3.2 Tối ưu hóa nhiệt độ không khí sấy và nồng độ maltodextrin để quá trình sấy phun dịch thủy phân hiệu quả nhất

Nội dung 4: Nghiên cứu công thức sản phẩm dinh dưỡng bổ sung cao cá sấu

Nội dung 4.1: Công thức sản phẩm dinh dưỡng từ cao cá sấu

Nội dung 4.2: Đánh giá cảm quan, thành phần hóa lý, chất khoáng và vi sinh của sản phẩm cao collagen trích từ cao cá sấu

Nội dung 5: Nghiên cứu độc tính và đánh giá tác dụng hỗ trợ sức khỏe của sản phẩm cao xương cá sấu

Nội dung 5.1: Nghiên cứu độc tính thông qua thí nghiệm:

- Đánh giá độc cấp tính
- Độc tính bán trường diễn

Nội dung 5.2: Đánh giá tác dụng hỗ trợ sức khỏe của sản phẩm cao xương cá sấu lên sức khỏe chuột, thông qua các thí nghiệm:

- Đánh giá khả năng tăng lực (mô hình chuột bơi kiệt sức Breckman)
- Đánh giá khối lượng chuột và chiều dài cơ thể chuột
- Đánh giá ảnh hưởng của sản phẩm cao lên xương chuột

2.5 Phương pháp nghiên cứu

2.5.1 Xác định thành phần trong xương cá sấu

Nguyên liệu xương cá sấu được xay nhỏ để làm các thí nghiệm liên quan. Ngoài việc xác định hàm lượng collagen trong xương, các thành phần khác cũng quan trọng

trong quá trình đánh giá chất lượng xương. Các chỉ tiêu về hoá lý sẽ được phân tích để đánh giá hàm lượng ban đầu của xương cá sấu. Sử dụng các phương pháp phân tích đã được công nhận và áp dụng rộng rãi ở Việt Nam cũng như trên Thế giới như AOAC, TCVN để xác định.

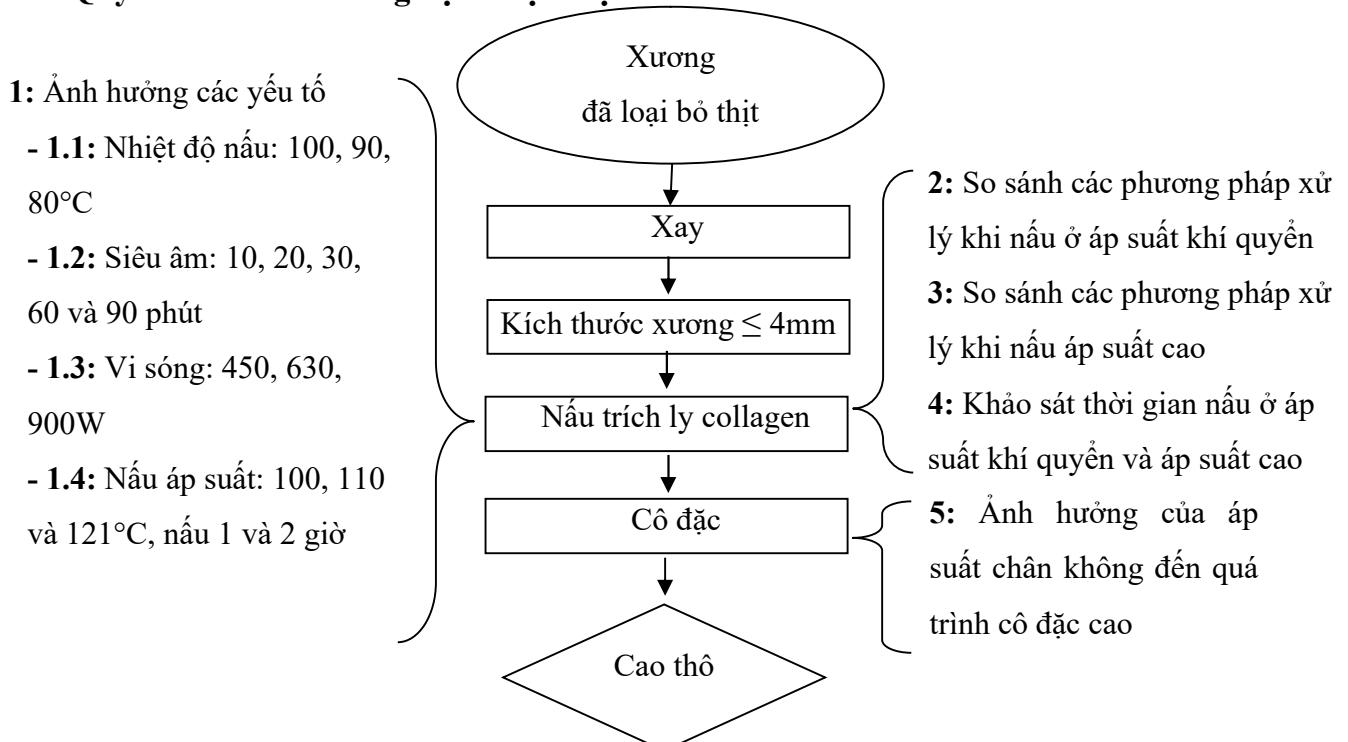
Các chỉ tiêu sẽ được thực hiện bao gồm: Độ ẩm (AOAC và TC 2000); Tro không tan trong acid (AOAC 920.46); pH (AOAC 981.12-1997); Hàm lượng calci (10TCN 455:2001); Hàm lượng collagen bằng sắc ký lỏng cao áp; Amino acid (AOAC 994.12:2016); Hàm lượng kim loại nặng (AOAC 999.11:2011); Hàm lượng Nitơ (TCN 304:2004); Hàm lượng Tro tổng (AOAC 942.05:2011).

2.5.2 Cải thiện qui trình nấu cao truyền thống từ xương cá sấu

Thành phần chính của cao xương động vật là collagen, vì vậy thí nghiệm này chủ yếu tối ưu hóa qui trình nấu cao sao cho hàm lượng collagen đạt cao nhất.

Mẫu xương cá sấu xay sẵn với kích thước $\leq 4\text{mm}$. Độ ẩm của xương là 10,14% và hàm lượng collagen 23,62% theo khối lượng khô tuyệt đối. Xương được đóng gói trong bao nylon và bảo quản lạnh.

Quy trình và các thí nghiệm thực hiện



Hình 2.2. Sơ đồ nấu trích ly collagen và các thí nghiệm

Bảng 2-1. Chỉ tiêu phân tích trong các thí nghiệm về nấu trích ly collagen

Chỉ tiêu phân tích	TN 1.1	TN 1.2	TN 1.3	TN 1.4	TN 2	TN 3	TN 4	TN 5	Sp thử nghiệm
Protein tổng								x	x
Collagen	x	x	x	x	x	x	x		x
Độ thủy phân	x	x	x	x	x	x			
Kháng oxi hóa					x	x		x	
Độ màu	x	x	x	x	x	x		x	x
Tro toàn phần									x
Độ ẩm								x	x
pH									x
Vi sinh									x
Chất béo									x

2.5.2.1 Sơ bộ đánh giá ảnh hưởng của các cách xử lý đến hàm lượng collagen trích ly

a) Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ nấu đến collagen trích ly

Nhiệt độ là tác nhân làm các phân tử dao động, trao đổi chất giữa 2 môi trường. Nếu nhiệt độ cao thì sự chuyển động cũng như sự trao đổi xảy ra nhanh hơn so với nhiệt độ thấp. Nếu nhiệt độ thấp thì thời gian nhiệt độ truyền vào tâm của vật liệu lâu hơn so với nhiệt cao.

Tiến hành trích ly mẫu với tỉ lệ xương/ nước = 1/6, nấu ở các nhiệt độ khác nhau trong 8 giờ. Thu dịch, ly tâm 15 phút (5000 vòng/ phút). Lọc dịch qua giấy whatman No. 1 và phân tích các chỉ tiêu.

Yếu tố biến đổi: Nhiệt độ nấu ở 3 mức sau: 100°C, 90°C và 80°C.

Yếu tố cố định: Kích thước xương ≤ 4 mm, nấu cách thủy, nấu 08 giờ.

Phân tích đánh giá: Dịch rút ra đem phân tích các chỉ tiêu sau: Hàm lượng collagen; Độ màu; Mức độ thủy phân protein (DH).

Kết quả mong đợi: Kết quả thí nghiệm cho biết được có sự thay đổi về khả năng trích ly collagen ra từ xương hay không nếu nhiệt độ nấu khác 100°C.

b) Khảo sát ảnh hưởng của xử lý siêu âm đến hàm lượng collagen trích ly

Thí nghiệm này được dựa trên nghiên cứu của Li và ctv (2009) cho thấy việc xử lý thêm bằng kỹ thuật siêu âm tăng hiệu suất trích ly collagen từ gân bò với phương pháp dùng enzyme pepsin.

Tiến hành trích ly mẫu với tỉ lệ xương/ nước = 1/6, nấu trong 1 giờ rồi tiến hành xử lý siêu âm ở các mức thời gian khác nhau sau đó tiếp tục nấu ở 100°C cho đủ 8 giờ. Thu dịch, ly tâm 15 phút (5000 vòng/ phút). Lọc dịch qua giấy lọc whatman No.1 và phân tích các chỉ tiêu.

Yếu tố biến đổi: Mức xử lý siêu âm cho mỗi lần nấu: 10; 20; 30; 60 và 90 phút. Đối với mẫu 60 và 90 phút thì chia siêu âm thành 2 và 3 lần, 30 phút/ lần xử lý. Cụ thể quy trình là nấu 1 giờ → siêu âm 30 phút → nấu 1 giờ → siêu âm 30 phút, cứ thế lặp lại cho đủ thời gian siêu âm.

Yếu tố cố định: Kích thước xương ≤ 4 mm, nhiệt độ nấu 100°C.

Phân tích đánh giá: Dịch rút ra sau 8 giờ nấu phân tích các chỉ tiêu sau: Hàm lượng collagen; Độ màu; Mức độ thủy phân protein (DH).

Kết quả mong đợi: Kết quả thí nghiệm cho phép đánh giá được số liệu xử lý siêu âm có làm tăng hàm lượng collagen.

c) Khảo sát ảnh hưởng của xử lý vi sóng xương đến hàm lượng collagen trích ly

Thí nghiệm này dựa theo nghiên cứu của Xing-wu và ctv (2012) trích ly collagen từ da heo có hỗ trợ vi sóng đã tăng hiệu quả trích. Vẫn chưa có nghiên cứu về xử lý vi sóng có giúp cải thiện quá trình trích ly collagen từ xương bằng phương pháp nấu nhiệt độ. Tiến hành ngâm xương qua đêm (12 giờ) nhằm tăng độ ẩm. Sau đó đem xử lý vi sóng ở 3 chế độ 900W, 630W và 450W với tần số 2450MHz thời gian xử lý 10 phút cho tất cả các mẫu, nấu ở 100°C trong 8 giờ. Thu dịch, ly tâm 15 phút (5000 vòng/ phút). Lọc dịch qua giấy whatman No.1 và phân tích các chỉ tiêu.

Yếu tố biến đổi: Xử lý vi sóng ở 3 mức sau: 900W, 630W và 450W.

Yếu tố cố định: Kích thước xương ≤ 4 mm, nấu cách thủy, nhiệt độ nấu 100°C, xử lý vi sóng trong 10 phút, nấu 8 giờ.

Phân tích đánh giá: Dịch trích phân tích các chỉ tiêu sau: Hàm lượng collagen; Độ màu; Mức độ thủy phân protein (DH).

Kết quả mong đợi: Kết quả thí nghiệm cho biết được việc xử lý vi sóng có tác dụng đến hàm lượng collagen trích ra và liệu ảnh hưởng có khác nhau với công suất xử lý khác nhau.

d) Khảo sát ảnh hưởng của áp suất cao đến collagen trích ly

Theo báo Tuổi Trẻ (2014), hiện nay người dân nấu cao ngựa ở vùng Nghệ An của Việt Nam đã nghĩ đến việc nấu cao bằng nồi áp suất, rất khả quan khi giảm đi 2/3 thời gian so với nấu thông thường. Cách nấu này xuất phát từ nồi hầm xương áp suất hay sử dụng ở gia đình và làm theo kinh nghiệm. Tuy nhiên chưa có bài báo cáo khoa học cụ thể nào để tìm hiểu về sử dụng áp suất cao trong quá trình trích ly collagen từ xương cá sấu. Vì thế trong thí nghiệm này cần khảo sát theo hướng nấu áp suất, để có cái nhìn tổng quan hơn theo khía cạnh khoa học. Thí nghiệm được tiến hành như sau: Mỗi bình cân theo tỉ lệ xương/ nước là 1/6 cho vào bình 250 ml. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, nhiệt độ nấu thí nghiệm lần lượt là 110°C và 121°C theo hai mốc thời gian 1 và 2 giờ nấu. Sau khi trích chất lấy dịch đem ly tâm 15 phút (5000 vòng/phút) sau đó lấy dịch sau ly tâm lọc chân không qua giấy lọc. Lấy dịch sau lọc đem phân tích các chỉ tiêu.

Yếu tố biến đổi: Nấu 2 mức thời gian 1 giờ và 2 giờ.

Yếu tố cố định: Kích thước xương ≤ 4 mm.

Phân tích đánh giá: Dịch rút ra đem phân tích các chỉ tiêu sau: Hàm lượng collagen; Độ màu; Mức độ thủy phân protein (DH).

Kết quả mong đợi: Kết quả thí nghiệm cho biết được liệu rằng nấu áp suất cao/ nhiệt độ cao có ảnh hưởng đến hàm lượng collagen.

2.5.2.2 So sánh các phương pháp trích ly collagen từ xương cá sấu khi nấu ở áp suất khí quyển

Sau khi tiến hành sơ bộ, đã chọn được các thông số tối ưu của từng thí nghiệm. Sau đó tổng hợp cũng như so sánh giữa các mẫu có cùng thời gian nấu, có

hỗ trợ của sóng siêu âm và vi sóng. Trong thí nghiệm này khảo sát 2 mức thời gian nấu: 2 giờ và 8 giờ.

Cách tiến hành như sau cân vào mỗi cốc theo tỉ lệ xương/ nước là 1/6 cho vào cốc 250ml. Xử lý sóng siêu âm thời gian xử lý 30 phút trước khi nấu, sau đó nấu cách thủy 100°C. Xử lý vi sóng trước khi nấu, ngâm xương trong 12 giờ sau đó lấy dịch chiết ra đem xử lý vi sóng 10 phút với công suất 630W tiếp tục nước chắt vào lại, nấu cách thủy 100°C. Thí nghiệm 1 yếu tố với 3 lần lặp lại. Trong quá trình nấu cứ 60 phút dùng đũa khuấy và thêm nước nóng vì nước bốc hơi. Sau khi nấu chắt lấy dịch đem ly tâm 15 phút (5000 vòng/ phút) lấy dịch sau ly tâm lọc chân không và phân tích các chỉ tiêu.

Yếu tố biến đổi: Cách xử lý (vi sóng/ siêu âm) và thời gian nấu (2 và 8 giờ).

Yếu tố cố định: Kích thước xương ≤ 4 mm, nấu 100°C.

Phân tích đánh giá: Hàm lượng collagen; Khả năng khử gốc tự do DPPH (khi đo pha về cùng hàm lượng collagen); Độ màu; Mức độ thủy phân protein (DH).

Kết quả mong đợi: Kết quả thí nghiệm cho phép so sánh giữa không xử lý, có xử lý siêu âm và vi sóng, qua đó sẽ đánh giá được phương pháp xử lý nào cho hàm lượng trích ly collagen cao.

2.5.2.3 So sánh các phương pháp trích ly collagen từ xương cá sấu khi nấu ở áp suất cao

Mục đích: so sánh giữa các mẫu có cùng thời gian nấu, có hỗ trợ của siêu âm và vi sóng. Khảo sát 2 mức thời gian nấu: nấu 1 giờ và 2 giờ.

Cách tiến hành mỗi bình cân theo tỉ lệ xương/ nước là 1/6 cho vào bình 250 ml. Thời gian xử lý siêu âm 30 phút trước khi trích, nấu 121°C, áp suất 0,200 MPa. Xử lý vi sóng trước khi nấu, ngâm xương trong 12 giờ rồi chắt nước ra đem xử lý vi sóng 10 phút với công suất 630W, sau đó đổ nước chắt vào lại, nấu 121°C, áp suất 0,200 MPa. Các nghiệm thức nấu xong đem định mức lại, chắt lấy dịch đem ly tâm 15 phút (5000 vòng/ phút), dịch sau ly tâm lọc chân không và phân tích các chỉ tiêu. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Yếu tố biến đổi: Cách xử lý (vi sóng/ siêu âm) và thời gian nấu (1 và 2 giờ).

Yếu tố cố định: Kích thước xương ≤ 4 mm, nấu 121°C, nấu áp suất cao.

Phân tích đánh giá: Hàm lượng collagen; Khả năng khử gốc tự do DPPH; Độ màu; Mức độ thủy phân protein.

Kết quả mong đợi: Kết quả thí nghiệm cho phép so sánh giữa không xử lý, có xử lý siêu âm và vi sóng, qua đó sẽ đánh giá được phương pháp xử lý nào cho hàm lượng trích ly collagen cao.

2.5.2.4 Khảo sát thời gian nấu cần thiết ở áp suất khí quyển và áp suất cao

Mục đích: nhằm xác định thời gian trích cho đến khi hàm lượng collagen có trong dịch trích $\leq 0,5\%$ (hàm lượng collagen/ xương). Quá trình trích có hỗ trợ xử lý vi sóng được dựa trên kết quả của thí nghiệm 1. Tiến hành mỗi cốc cân theo tỉ lệ xương/ nước là 1/6 cho vào cốc 250ml. Thí nghiệm 1 yếu tố với 3 lần lặp lại.

Sau khi trích ly lấy dịch ly tâm 15 phút (5000 vòng/ phút), dịch sau ly tâm lọc qua giấy lọc. Lấy dịch sau lọc đem phân tích các chỉ tiêu. Tương tự như lần 1 tiếp tục nấu lần tiếp theo và lặp lại cho đến khi hàm lượng collagen trong dịch trích nhỏ hơn 0,5% thì dừng. Quá trình xử lý vi sóng dừng lại ở lần trích thứ hai.

Bảng 2-2. Ảnh hưởng phương pháp xử lý ở các nhiệt độ và thời gian nấu khác nhau

Nghiem thức	Phương pháp xử lý	Nhiệt độ (°C)	Thời gian nấu (giờ)
1	Không	100	8
2	Vi sóng (10 phút, 630W)	100	8
3	Không	121	2
4	Vi sóng (10 phút, 630W)	121	2

Yếu tố biến đổi: xử lý vi sóng, thời gian (2, 8 giờ) và nhiệt độ nấu (100, 121°C)

Yếu tố cố định: Kích thước xương ≤ 4 mm

Phân tích đánh giá: Dịch trích phân tích chỉ tiêu sau: Hàm lượng collagen.

Kết quả mong đợi: Kết quả thí nghiệm cho biết được hàm lượng và sự biến thiên của collagen được trích ra nhằm so sánh qua mỗi lần nấu, ngoài ra còn so sánh giữa các phương pháp xử lý khi nấu với nhau.

2.5.2.5 Khảo sát ảnh hưởng của áp suất chân không đến quá trình cô đặc dịch collagen

Dịch collagen trích theo quy trình nấu cao với các thông số theo kết quả của các thí nghiệm trước sẽ được đem thí nghiệm cô đặc theo áp suất cô đặc khác nhau.

Cách tiến hành: Cân 700g mẫu dịch trích ly collagen có hàm lượng chất khô 2,63% cho vào bình cô, điều chỉnh nhiệt độ bên ngoài 95°C, tốc độ quay và áp suất. Cô quay đến khi đạt yêu cầu thì dừng, lấy dịch cô đem phân tích các chỉ tiêu.

Yếu tố biến đổi: Áp suất cô đặc ở 2 mức: (- 0,8 và - 0,4 kg.cm⁻²). Mẫu đối chứng được cô đặc bằng bếp hồng ngoại, ở áp suất khí quyển.

Yếu tố cố định: Nguyên liệu đầu vào như nhau, cao cuối cùng ≈ 70% vật chất khô (30% ẩm), nhiệt độ 95°C, tốc độ quay điều chỉnh ở mức 4.

Phân tích đánh giá: Sản phẩm sau khi cô đặc được đánh giá: Thời gian để cô đến 70% vật chất khô; Vật chất khô; Khả năng khử gốc tự do DPPH; Độ màu.

Kết quả mong đợi: kết quả thí nghiệm cho phép đánh giá được thời gian, áp suất và nhiệt độ liên quan đến quá trình cô đặc. Sản phẩm cao được đánh giá thông qua độ màu, kháng oxi hóa, mức độ thủy phân... qua đó có thể đề xuất quy trình phù hợp.

2.5.2.6 Đề xuất quy trình nấu cao xương cá sấu cải tiến

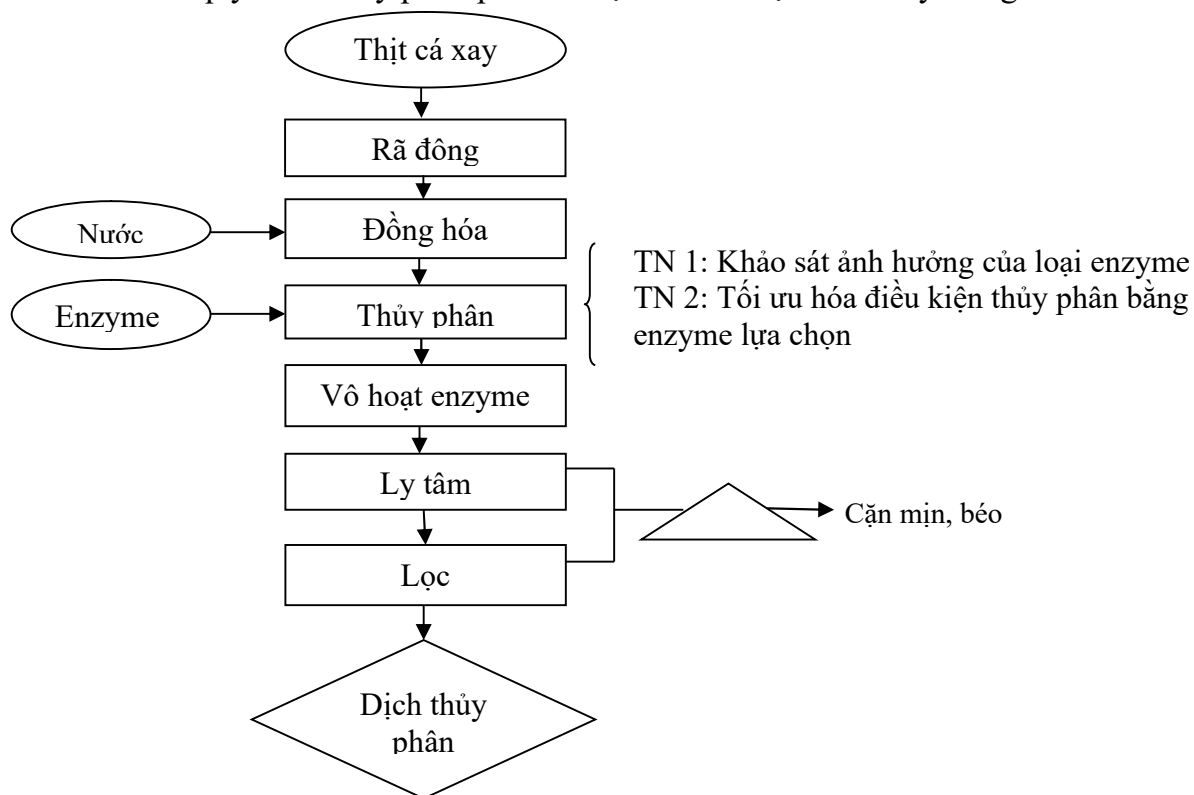
Từ kết quả của các thí nghiệm chi tiết trên, nên đã đề xuất qui trình nấu cao xương cá sấu dưới phương pháp áp suất cao:

Cân 1000 g xương mẫu 1, được trích 2 lần, thời gian mỗi lần trích 2 giờ ở 121°C và áp suất 0,115 Mpa, dịch được cô quay ở áp suất -0,8 kg/ cm² và 95°C.

Đánh giá tính an toàn của mẫu cao chế biến thử nghiệm được phân tích các chỉ tiêu sau: Màu và pH; Tổng hàm lượng protein tổng; Hàm lượng collagen; Chất béo và tro toàn phần; Tổng số vi sinh vật hiếu khí, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Coliforms*, *Staphylococcus aureus*, nấm men và nấm mốc.

2.5.3 Nghiên cứu thủy phân protein thịt cá sấu

Sơ đồ quy trình thủy phân protein thịt cá sấu được trình bày trong Hình 2.3.



Hình 2.3. Sơ đồ quy trình thủy phân protein thịt cá sấu

Các bước được tiến hành:

Rã đông: Nguyên liệu đã xử lý được mang đi rã đông qua đêm ở tủ mát nhiệt độ từ 4°C – 7°C. Cần 50g thịt cá sấu cho mỗi một lần lặp lại. Mẫu thịt cá sấu có hàm lượng đạm là 21,32% và chất béo là 1,34%.

Đồng hóa: Sau khi rã đông, nguyên liệu được đồng hóa với nước cất tỷ lệ thịt: nước 1: 2 (khối lượng/ thể tích) trong 10 phút bằng máy xay sinh tố công suất 600W để khuấy trộn đều nguyên liệu sau đó được lọc qua rây để đồng nhất về kích thước.

Xử lý nhiệt: Mẫu được xử lý nhiệt để vô hoạt enzyme có sẵn trong nguyên liệu bằng cách nấu cách thủy ở nhiệt độ 85°C trong 15 phút.

Thủy phân: Quá trình thủy phân được tiến hành trong becher và phản ứng thực hiện trong bể điều nhiệt có cánh khuấy với tốc độ 150 vòng/phút. Giá trị pH của dịch thủy phân được điều chỉnh bằng dung dịch NaOH 1N và HCl 1N trước khi thủy phân. Hỗn hợp được xử lý nhiệt trong bể nước điều nhiệt đến nhiệt độ phù hợp trước khi thêm

một lượng thích hợp protease. Thời gian thủy phân, nhiệt độ thủy phân và hàm lượng enzyme được điều chỉnh theo kế hoạch thực nghiệm.

Vô hoạt enzyme: Sau thời gian thủy phân định, enzyme được vô hoạt bằng cách xử lý nhiệt dung dịch ở 85°C trong 20 phút (Theo Kuldiloke, 2002).

Ly tâm: Dịch lọc được ly tâm tách béo và cặn mịn. Chế độ ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 15 phút.

Lọc: Dịch chiết được lọc bằng giấy lọc Whatman No. 1 nhằm loại bỏ những cặn nguyên liệu còn sót và một phần béo trước khi đem phân tích các chỉ tiêu.

2.5.3.1 Khảo sát ảnh hưởng của loại enzyme đến mức độ thủy phân protein thịt cá sấu

Ba protease thương mại alcalase, neutral và flavourzyme được chọn để thủy phân protein thịt cá sấu. Vì khoảng nhiệt độ, pH và liều khuyến cáo của nhà sản xuất đưa ra khá rộng, do đó cần thăm dò nhiệt độ, pH tối ưu của từng enzyme và tỉ lệ bổ sung cho thích hợp. Mỗi thí nghiệm khảo sát từng yếu tố ảnh hưởng, các yếu tố còn lại được cố định ở mức đã lựa chọn.

Cân 50 gam thịt cá sấu tiến hành thủy phân được thực hiện theo Hình 2.3. Thí nghiệm lựa chọn enzyme protease theo Bảng 2-3. Các thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức.

Bảng 2-3. Bố trí thí nghiệm lựa chọn enzyme protease

Enzyme protease	Điều kiện thủy phân	Tỉ lệ enzyme (%)	Thời gian lấy mẫu (giờ)
Alcalase	T°= 53°C; pH=7	0,05; 0,075; 0,1	0; 1; 3; 5; 7; 9
Neutral	T°= 53°C; pH=6,5	1; 2; 3; 4	0; 1; 3; 5; 7; 9
Flavourzyme	T°= 53°C; pH=6	0,05; 0,125; 0,2	0; 1; 3; 5; 7; 9

a) Khảo sát ảnh hưởng của enzyme neutral

Đối với enzyme neutral các thí nghiệm được trình bày chi tiết trong Bảng 2-4.

Sau 1; 3; 5; 7; 9 giờ thủy phân lấy mẫu phân tích chỉ tiêu mức độ thủy phân.

Điện di (SDS-PAGE) được thực hiện tại các mốc thời gian 1, 5 và 9 giờ nhằm đánh giá mức độ thủy phân.

Bảng 2-4. Bố trí thí nghiệm thủy phân với enzyme neutral

Thí nghiệm Điều kiện TN	Khảo sát tỷ lệ enzyme (%)	Khảo sát nhiệt độ (°C)	Khảo sát pH
Yếu tố thay đổi	1; 2; 3; 4	40; 50; 60	5; 6; 7; 8
Yếu tố cố định	pH 6,5 nhiệt độ 47,5°C	pH 6,5; tỷ lệ enzyme theo kết quả thí nghiệm a	Tỷ lệ enzyme và nhiệt độ theo kết quả thí nghiệm a và b

b) Khảo sát ảnh hưởng của enzyme alcalase

Đối với enzyme alcalase các thí nghiệm được trình bày chi tiết trong Bảng 2-5. Sau 1; 3; 5; 7; 9 giờ thủy phân lấy mẫu phân tích chỉ tiêu mức độ thủy phân.

Điện di (SDS-PAGE) được thực hiện tại các mốc thời gian 1, 5 và 9 giờ nhằm đánh giá mức độ thủy phân.

Bảng 2-5. Bố trí thí nghiệm thủy phân với enzyme alcalase

Thí nghiệm Điều kiện TN	Khảo sát tỷ lệ enzyme (%)	Khảo sát nhiệt độ (°C)	Khảo sát pH
Yếu tố thay đổi	0,05; 0,075; 0,1	45; 55; 65	7; 8
Yếu tố cố định	pH 7,5 nhiệt độ 52,5°C	pH 7,5; tỷ lệ enzyme theo kết quả thí nghiệm a	Tỷ lệ enzyme và nhiệt độ theo kết quả thí nghiệm a và b

c) Khảo sát ảnh hưởng của enzyme flavourzyme

Đối với enzyme flavourzyme các thí nghiệm được trình bày chi tiết trong Bảng 2-6. Sau 1; 3; 5; 7; 9 giờ thủy phân lấy mẫu phân tích mức độ thủy phân.

Điện di (SDS-PAGE) được thực hiện tại các mốc thời gian 1, 5 và 9 giờ nhằm đánh giá mức độ thủy phân.

Bảng 2-6. Bố trí thí nghiệm thủy phân với enzyme flavourzyme

Thí nghiệm Điều kiện TN	Khảo sát tỷ lệ enzyme (%)	Khảo sát nhiệt độ (°C)	Khảo sát pH
Yếu tố thay đổi	0,05; 0,125; 0,2	50; 55	5,5; 6,5

Yếu tố cố định	pH 6 nhiệt độ 52,5°C	pH 6; tỷ lệ enzyme theo kết quả thí nghiệm a	Tỷ lệ enzyme và nhiệt độ theo kết quả thí nghiệm a và b
----------------	-------------------------	--	---

2.5.3.2 Tối ưu hóa quá trình thủy phân bằng enzyme lựa chọn

Phương pháp quy hoạch thực nghiệm theo kiểu bề mặt đáp ứng được áp dụng để tối ưu điều kiện thủy phân của enzyme cho hiệu quả thủy phân cao nhất ở mục 2.5.3.1. Ba biến được tối ưu là pH, nhiệt độ (T) và tỷ lệ enzyme so với cơ chất ([E]/[S]).

Thiết kế Box - Behnken (BBD) được áp dụng với ba biến X_1 (T), X_2 (pH), X_3 ([E]/[S]) và lặp lại 3 lần tại điểm trung tâm. Ba yếu tố khảo sát được nghiên cứu ở 3 mức mã hóa (-1, 0, +1) (Bảng 2-7) gồm 15 đơn vị thí nghiệm (Bảng 2-8).

Yếu tố cố định: thời gian thủy phân 9 giờ.

Hàm mục tiêu là mức độ thủy phân, % DH (Y_1) và hoạt tính kháng oxy hóa, % DPPH (Y_2) đạt cực đại. Mô hình được biểu diễn bằng phương trình bậc 2:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

Bảng 2-7. Bảng mã hóa giá trị của các yếu tố nhiệt độ, pH và tỷ lệ enzyme.

Các biến độc lập	Các giá trị được mã hóa		
	-1	0	1
X_1 : Nhiệt độ (°C)			
X_2 : pH			
X_3 : [E] / [S]			

Bảng 2-8. Ma trận mã hóa thí nghiệm Box-Behnken.

NT	x_1	x_2	x_3	Dạng thức	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
1	-1	-1	0	--0					
2	-1	0	-1	-0-					
3	-1	0	1	-0+					
4	-1	1	0	--+0					

NT	x ₁	x ₂	x ₃	Dạng thức	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂
5	0	-1	-1	0--					
6	0	-1	1	0-+					
7	0	0	0	000					
8	0	0	0	000					
9	0	0	0	000					
10	0	1	-1	0+-					
11	0	1	1	0++					
12	1	-1	0	+0-					
13	1	0	-1	+0-					
14	1	0	1	+0+					
15	1	1	0	++0					

Mức độ thủy phân cũng được đánh giá qua dãy polypeptide biểu hiện trên gel điện di SDS-PAGE.

2.5.4 Nghiên cứu sấy phun dịch protein thịt cá sấu thủy phân thành bột

Quá trình thủy phân protein được thực hiện như mục 2.5.3. Thịt được xay thô, chia nhỏ thành từng đơn vị có khối lượng 1kg và bao gói bằng bao PE. Bảo quản trong tủ đông lạnh với nhiệt độ -20°C. Sau khi rã đông, thịt được xử lý nhiệt để bất hoạt các enzyme có sẵn trong thịt bằng cách nấu cách thủy ở nhiệt độ 90 - 95°C trong 15 phút. Để nguội, thêm nước cất với tỷ lệ thịt : nước (1: 2) theo khối lượng để tạo môi trường thủy phân. Điều chỉnh pH bằng dung dịch NaOH 1N cũng như các thông số thủy phân được điều chỉnh theo kết quả của nghiên cứu ở mục 2.5.3. Thời gian thủy phân 8 giờ. Nhiệt độ của quá trình thủy phân được ổn định bằng bể ổn nhiệt.

Bất hoạt enzyme: Sau khi thủy phân, dịch thủy phân được xử lý nhiệt để bất hoạt enzyme. Quá trình xử lý nhiệt ở 85°C trong 20 phút bằng bể ổn nhiệt.

Lọc: Dịch thủy phân được lọc bằng giấy lọc Whatman (loại số 1) để loại bỏ chất béo, các tạp chất không hòa tan. Sau khi loại bỏ cặn, tổng hàm lượng chất khô của dịch thủy phân protein khoảng 5,5%.

Cô đặc: Cô đặc để điều chỉnh hàm lượng chất khô của dịch thủy phân về $10 \pm 1\%$. Quá trình cô đặc được tiến hành ở nhiệt độ 80°C trong 90 phút, áp suất bơm chân không $0,8 \text{ kg.cm}^{-2}$.

Tổng hàm lượng protein của dịch thủy phân dùng để sấy phun khoảng $9,12 \pm 0,5\%$.

2.5.4.1 Khảo sát ảnh hưởng của các thông số sấy phun đến các chỉ tiêu chất lượng của bột sấy phun

Các thí nghiệm sơ bộ được thực hiện riêng biệt để sàng lọc ảnh hưởng của nồng độ maltodextrin (0, 10, 20, 30, 40%, w/w), nhiệt độ không khí đầu vào (130, 140, 150, 160°C) và tốc độ dòng cấp (5, 10, 15, 20 mL.phút⁻¹).

Nồng độ của chất mang được tính bằng trọng lượng của chất mang và trọng lượng của dung dịch thức ăn. Khuấy đều hỗn hợp bằng cách khuấy từ cho đến khi hòa tan hoàn toàn. Sau đó, hỗn hợp được đồng nhất bằng máy đồng nhất ultraturax (IKA T18 digital ultraturax, Đức) ở tốc độ 11×10^3 vòng/phút trong 5 phút. Hỗn hợp đồng nhất được khử bọt bằng cách sử dụng bể siêu âm (Elma, Schmidbaer GmbH, Đức). Quá trình sấy phun được thực hiện bằng máy sấy phun quy mô phòng thí nghiệm (Lab Plant SD-Basic, Lab Plant UK Ltd., UK). Hỗn hợp (ở 25°C) được đưa vào buồng sấy phun thông qua một máy bơm nhu động. Việc phun được hỗ trợ bởi một máy bơm khí nén đặt ở 0,2 Mpa. Sau đó mẫu sấy phun được tiến hành đánh giá các đặc tính của bột thu hồi.

2.5.4.2 Tối ưu hóa nhiệt độ không khí sấy và nồng độ maltodextrin để quá trình sấy phun dịch thủy phân hiệu quả nhất

Thí nghiệm tối ưu hóa được thiết kế theo phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) để tìm ra giá trị tối ưu cho các điều kiện sấy phun dịch thủy phân protein thịt cá sấu. Sau khi xác định được các giá trị tối ưu sẽ tiến hành thí nghiệm sấy phun kiểm chứng với các điều kiện. Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí theo kiểu phối hợp có tâm (Central Composite Design - CCD).

Thí nghiệm gồm 2 yếu tố, cụ thể là nhiệt độ không khí và nồng độ maltodextrin bổ sung. Phạm vi giá trị cho hai thông số này được lấy dựa trên kết quả của các thí nghiệm nhân tố đơn lẻ trước đó. Tốc độ dòng cấp được cố định ở 10 mL.phút⁻¹ và áp suất khí nén ở 0,2 MPa. Các thông số được kiểm tra là hiệu suất thu hồi, vật chất khô, protein và độ ẩm của bột thu được.

Tổng số đơn vị thực nghiệm được tính theo công thức: $N = 2^k + 2k + n$ (k là hệ số của đơn vị thực nghiệm và n là số đơn vị thực nghiệm cấp trung tâm). Trong thí nghiệm này, k = 2 và n = 5. Có 13 đơn vị thí nghiệm. Sau khi sử dụng JMP để thiết kế thí nghiệm, các mã và thông số sấy phun đã thu được.

Các giá trị và điểm trung tâm của hai biến độc lập dựa trên kết quả của các thí nghiệm sơ bộ. Năm mức (- α , -1, 0, 1, α) đã được thiết kế cho cả hai, tương ứng với nhiệt độ không khí vào là 133, 134, 140, 135 và 147°C và nồng độ maltodextrin là 18, 6, 19, 20, 21 và 21,4 % (w/w) tương ứng.

Dữ liệu thực nghiệm được đưa vào mô hình bậc hai thu được hệ số hồi quy. Mô hình bậc hai chung được sử dụng trong phân tích bề mặt phản ứng như sau:

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + b_1x_1x_2 + c_1x_1^2 + c_2x_2^2 \quad (1)$$

Với a_0 , a_1 , a_2 , b_1 , b_2 , c_1 , c_2 là các hệ số của hồi quy x_1 , x_2 là các biến được mã hóa trong đó x_1 là nhiệt độ không khí vào và x_2 là nồng độ maltodextrin. Các điều kiện tối ưu được xác định là các điểm mà tại đó tối đa hóa việc thu hồi chất khô và thu hồi protein hoặc độ ẩm của bột được giảm thiểu.

2.5.5 Nghiên cứu công thức sản phẩm dinh dưỡng bổ sung cao cá sấu

2.5.5.1 Nghiên cứu công thức sản phẩm dinh dưỡng bổ sung cao cá sấu

Mục tiêu phần này là nghiên cứu phát triển công thức sản phẩm bột hòa tan uống liền chứa thành phần nguyên liệu chế biến được. Tiêu chí là sản phẩm dạng bột, hòa tan nhanh khi uống.

Bột protein thủy phân từ thịt cá sấu thu nhận theo qui trình phát triển trong nghiên cứu trước (phần 2.5.3 và 2.5.4).

Bột thủy phân

Dịch chiết nấu từ thịt và xương cá sấu được cô đặc đến 10% collagen (w/w), sau đó thủy phân bằng 2 loại enzyme neutral 0,125% + alcalase 0,125% trong thời gian 10h, khuấy 100 vòng/phút, nhiệt độ 61°C và pH 7,1. Sau khi thủy phân đem vô hoạt enzyme tại nhiệt độ 90°C trong 10-15 phút. Bột thủy phân dùng cho các thí nghiệm với tỷ lệ bột collagen : bột protein thịt cá sấu là 1:1.

Phối trộn

Tiến hành sử dụng thiết bị khuấy từ gia nhiệt để phối trộn dịch thủy phân protein và chất trợ sấy, chất trợ sấy được sử dụng là maltodextrin, hàm lượng chất trợ sấy sử dụng là 19,6%, tốc độ vòng quay 600 vòng/phút⁻¹, nhiệt độ 40°C (Gabas và ctv, 2007). Công thức tính khối lượng chất trợ sấy:

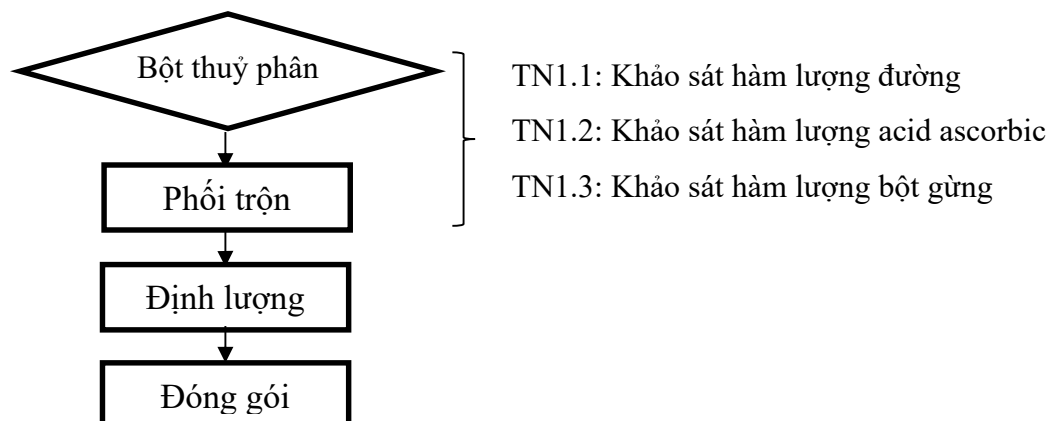
$$\frac{\text{Khối lượng maltodextrin}}{\text{Khối lượng dịch sấy} + \text{khối lượng maltodextrin}} \times 100 = 19,6\%$$

Dem dịch qua máy siêu âm để loại bỏ bọt khí, để dịch ổn định trong 15-10 phút, sau đó đem sấy phun (máy sấy phun LabPlant - UK), nhiệt độ đầu vào 150°C, tốc độ bơm mức 3, áp suất bơm 0,2 MPa) thu được sản phẩm cao sấy phun.

Các nguyên phụ liệu khác: Đường phen bột; acid ascorbic – TQ; Bột gừng sấy phun (được thực hiện theo Phụ lục 59).

Bột thủy phân (Bột protein thịt thủy phân và bột collagen thủy phân với tỷ lệ 1:1) có hàm lượng protein tổng số lần lượt là $(32,10 \pm 0,44)\%$ và $(38,13 \pm 0,10)\%$.

Các thí nghiệm nghiên cứu sản phẩm dinh dưỡng được mô tả như Hình 2.4



Hình 2.4. Qui trình chế biến thí nghiệm

a. Xác định hàm lượng đường bổ sung vào sản phẩm

Mục đích: Giúp sản phẩm có vị ngọt hài hòa, phù hợp với thị hiếu của người tiêu dùng.

Sản phẩm bột sau phối trộn đem pha nước với tỉ lệ 1/10 (10g bột/100ml nước) trước khi đánh giá cảm quan.

Yếu tố cố định: Bột thủy phân; Hàm lượng acid ascorbic là 1,5%; Hàm lượng bột gừng là 14%.

Yếu tố thí nghiệm: Hàm lượng đường là 38%, 40%, 42% trong bột (sau khi thăm dò để tìm được mức thí nghiệm).

b. Xác định hàm lượng acid ascorbic bổ sung vào sản phẩm

Mục đích: Lựa chọn được hàm lượng acid ascorbic bổ sung vào sản phẩm, đem lại vị chua ngọt hài hòa, ngoài ra, vitamin C giúp cho collagen dễ hấp thụ khi vào cơ thể, tăng giá trị của sản phẩm.

Yếu tố cố định: Bột thủy phân; Hàm lượng đường được lựa chọn theo thí nghiệm trên, hàm lượng bột gừng là 14%.

Yếu tố thí nghiệm: hàm lượng acid ascorbic lần lượt là 0,5%, 1% và 1,5%

c. Xác định hàm lượng bột gừng bổ sung

Mục đích: Khử mùi tanh khó chịu của collagen thủy phân từ xương cá sấu, mang lại mùi vị thơm ngon, hơn nữa, theo Đông y, gừng là một vị thuốc có nhiều tác dụng, trong đó tác dụng phù hợp với sản phẩm này có thể kể là giúp điều hòa huyết áp, thư giãn thần kinh, cải thiện tiêu hóa, chữa viêm họng.v.v.

Yếu tố cố định: Hàm lượng đường và acid ascorbic được chọn theo kết quả các thí nghiệm trên.

Yếu tố thí nghiệm: Hàm lượng bột gừng bổ sung lần lượt là 12, 14, 16%.

Các thí nghiệm được đánh giá cảm quan theo thang điểm 5.

2.5.5.2 Đánh giá cảm quan sản phẩm, thành phần hoá lý, khoáng và vi sinh của sản phẩm bổ sung cao cá sấu

Mục đích của thí nghiệm này nhằm xác định thành phần dinh dưỡng của sản phẩm (hàm lượng nitơ tổng, collagen, béo, tro, ẩm) chỉ tiêu an toàn vi sinh (tổng số vi khuẩn hiếu khí, *Coliform*, nấm men và nấm mốc).

a) Phân tích cảm quan

Mẫu bột được pha vào nước ấm (50°C) với tỷ lệ 1/10, để ổn định ở nhiệt độ phòng và cho đánh giá cảm quan bằng phương pháp cho điểm thị hiếu theo thang điểm 5.

b) Phân tích các chỉ tiêu hoá lý

Các chỉ tiêu về hoá lý sẽ được phân tích để đánh giá hàm lượng sản phẩm. Sử dụng các phương pháp phân tích đã được công nhận và áp dụng rộng rãi ở Việt Nam cũng như trên Thế giới như AOAC, TCVN để xác định. Các chỉ tiêu sẽ được thực hiện bao gồm: Độ ẩm; Tro hòa tan; Hàm lượng calci; Hàm lượng kim loại nặng; Hàm lượng nitơ; Hàm lượng Tro tổng; Phân tích collagen.

c) Phân tích hàm lượng vi sinh trong sản phẩm

Một sản phẩm an toàn cần đảm bảo tiêu chuẩn về vi sinh. Sử dụng các phương pháp phân tích đã được công nhận và áp dụng rộng rãi ở Việt Nam cũng như trên Thế giới như AOAC, TCVN để xác định *E. coli* (TCVN 6846:2001); Men, mốc tổng số (TCVN 7137:2002); Tổng vi sinh vật hiếu khí, kỵ khí (TCVN 4884:2001); *Coliform* (TCVN 4882:2001).

2.5.6 Nghiên cứu độc tính của sản phẩm bổ sung cao cá sấu

2.5.6.1 Xác định độc tính cấp

Xác định LD₅₀ của trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon: Trước khi tiến hành thí nghiệm, cho chuột nhin ăn qua đêm, nước uống theo nhu cầu. Kiểm tra cân nặng của chuột đạt các yêu cầu về cân nặng.

Từng lô chuột nhắt trắng, mỗi lô ít nhất 10 con được cho uống mẫu cao cá sấu pha trong nước cất theo các liều tăng dần và được đưa vào dạ dày bằng một kim cong đầu tù qua đường miệng (thể tích hằng định 0,25 ml/10g thể trọng). Tìm liều cao nhất

không gây chết chuột (0%), liều thấp nhất gây chết chuột hoàn toàn (100%) và các liều trung gian.

Theo dõi tình trạng chung của chuột và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong 72 giờ. Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD₅₀ của mẫu thử. Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng chung của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống mẫu nghiên cứu.

Các chỉ tiêu cần quan sát bao gồm:

- Tình trạng hoạt động, khả năng tiêu thụ thức ăn, nước uống, tình trạng phân, nước tiểu.

- Khối lượng cơ thể: xác định khối lượng trước và sau khi thí nghiệm.

- Biểu hiện độc tính cấp đặc biệt ngay sau khi dùng thuốc, những biểu hiện bất thường trên thân kinh, vận động như hành vi, cử động, đi lại, co giật, biểu hiện của các chức năng hô hấp, tuần hoàn, tiêu hóa... như nhịp tim, nhịp thở, nôn mửa, phản xạ của các giác quan như mắt mũi, biểu hiện tình trạng chất bài tiết....

- Xác định số lượng chuột có biểu hiện ngộ độc, thời gian bắt đầu thể hiện triệu chứng độc, thời gian kéo dài các triệu chứng, khả năng phục hồi.

Số lượng chuột thí nghiệm bị chết (nếu có) thời gian chết ứng với mỗi liều đã thử. Chuột thí nghiệm ở tình trạng suy kiệt, hấp hối kéo dài, không có khả năng sống sót, thì được tính như trường hợp chuột bị chết. Các cá thể chuột chết (nếu có) sau thí nghiệm được giải phẫu làm tiêu bản đánh giá độc tính với các nội quan.

2.5.6.2 Xác định độc tính bán trường diễn

Xác định độc tính bán trường diễn được thực hiện theo hướng dẫn OECD (2001). Cao thử nghiệm được hòa tan trong nước cất và cho chuột uống với thể tích 0,1 ml/ 10g thể trọng chuột liên tiếp trong 60 ngày. Liều sử dụng cho nghiên cứu gồm mức liều thấp và liều cao, liều này được tính từ thí nghiệm độc tính cấp. Lô chuột đối chứng được cho uống nước cất liều 0,1 ml/10 g thể trọng/ngày.

Động vật thí nghiệm: Chuột nhắt trắng cân nặng khoảng 20 ± 2 g, được chia thành các lô, mỗi lô 10 cá thể chuột. Chuột ở các lô được nuôi ở điều kiện, dinh dưỡng giống nhau. Các chuồng được cho ăn cùng một lượng thức ăn 5 g/con/ngày, uống nước đầy đủ.

Lấy máu chuột xét nghiệm các chỉ tiêu huyết học và sinh hóa tại các thời điểm: trước khi bắt đầu làm thí nghiệm, sau khi thí nghiệm được bốn tuần và cuối cùng là 8 tuần. Các chỉ tiêu theo dõi trước và trong quá trình nghiên cứu:

Khối lượng chuột; - Chức năng gan (GOT, GPT huyết, protein toàn phần); - Chức năng thận (Urea, creatinin huyết thanh); - Công thức máu; Triglycerid huyết; Cholesterol; - Cân trọng lượng tim, gan, thận sau khi kết thúc quá trình thí nghiệm để so sánh với mẫu đối chứng (tiến hành khi kết thúc thí nghiệm); - Giải phẫu chuột làm tiêu bản để xác định những ảnh hưởng với các nội quan.

Tiêu bản vi thể tiến hành theo quyết định 5199/QĐ-BYT về hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành giải phẫu bệnh – Tế bào học. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu được phân tích xử lý thống kê.

2.5.7 Nghiên cứu tác dụng hỗ trợ sức khỏe của sản phẩm bổ sung cao cá sấu

Đánh giá tác dụng của sản phẩm bổ sung cao cá sấu lên cơ thể và xương chuột (khối lượng, chiều dài cơ thể, khả năng tăng lực của cơ thể chuột, độ chắc và đàn hồi của xương) theo các chỉ tiêu sau:

2.5.7.1 Đánh giá khả năng tăng lực (mô hình chuột bơi kiệt sức Brekhman)

Trong thí nghiệm này chuột được cho ăn sản phẩm bổ sung cao cá sấu sau đó khảo sát tác dụng tăng lực bằng mô hình chuột bơi kiệt sức Brekhman.

*** Chuẩn bị:**

Sau thời gian để ổn định, chuột được cho tập bơi 3 lần, mỗi lần 15 phút và cách nhau 2 ngày. Sau mỗi lần tập xong, chuột được cho sưởi khô dưới đèn 100W đến khô hoàn toàn, thì trả chuột về lại lồng.

*** Thử nghiệm:**

Mang vào đuôi chuột một gia trọng bằng 7% thể trọng của nó và được cho bơi trong một bể bơi nhựa có kích thước 28x46x29cm, chiều cao của cột nước 26cm, nhiệt độ nước là 29±1°C.

Chuột được cho bơi lần 1, thời gian bơi được tính từ lúc chuột được thả vào bể bơi, chuột bơi tự do cho đến mệt và chìm xuống khỏi mặt nước trong khoảng thời

gian 7 giây mà không thể trôi lên được nữa. Ngay lập tức vớt chuột lên, cho sưởi ấm dưới đèn cho đến khi phục hồi hoàn toàn. Thời gian chuột bơi được ghi nhận lại nhờ 1 đồng hồ bấm giờ. Thời gian bơi lần 1 được ký hiệu là T_0 .



Hình 2.5. Chuột trong mô hình bơi kiệt sức

Cho chuột nghỉ ngơi và tiến hành chia lô thí nghiệm.

Chuột được chia thành các lô tương đương về khối lượng và thời gian bơi lần 1 (T_0):

- + Lô thử 1: uống cao cá sấu (CLT) liều 1,85 g/kg
- + Lô thử 2: uống cao cá sấu (CLT) liều 3,70 g/kg
- + Lô thử 3: uống BTP liều 1,84 g/kg
- + Lô thử 4: uống BTP liều 3,68 g/kg
- + Lô thử 5: uống BDD liều 1,84 g/kg
- + Lô thử 6: uống BDD liều 3,68 g/kg
- + Lô thử 7: (lô đối chứng) uống nước cất 0,1 ml/10g thể trọng.

Sau khi nghỉ ngơi hồi phục hoàn toàn, chuột bắt đầu được cho dùng thuốc. Chuột trong mỗi lô được cho uống thuốc với liều tương ứng. Sau khi uống thuốc được 1 giờ, chuột được cho bơi lần 2. Chuột cho uống nước cất và thuốc liên tục đến ngày thứ 7 và 14 sau khi cho chuột uống thuốc 1 giờ, tiến hành cho chuột bơi lần 3 và lần 4.

*** Đánh giá kết quả:**

So sánh diễn biến giữa các lô thí nghiệm: So sánh thời gian bơi giữa lô đối chứng và lô đối chiếu sau khi dùng thuốc, sau 7 ngày và sau 14 ngày.

Trong mô hình này, không tính theo thời gian bơi tuyệt đối của chuột mà tính thời gian bơi của chuột sau khi dùng thuốc (T_{1h} , $T_{7ngày}$, $T_{14ngày}$) gọi chung là T_t so với thời gian bơi lần 1 (T_0), theo công thức:

$$X\% = (T_t / T_0) \times 100$$

- + T_{1h}/T_0 (%) (thử) > T_{1h}/T_0 (%) (đối chứng): Có tác động tăng lực tức thời.
- + T_7/T_0 (%) (thử) > T_7/T_0 (%) (đối chứng): Có tác động tăng lực sau 7 ngày.
- + T_{14}/T_0 (%) (thử) > T_{14}/T_0 (%) (đối chứng): Có tác động tăng lực sau 14 ngày.

2.5.7.2 Đánh giá khối lượng chuột và chiều dài cơ thể chuột

Ở thí nghiệm này, chuột được cho ăn sản phẩm bổ sung cao cá sấu sau đó cân khối lượng và đo chiều dài cơ thể ở các lô đối chứng và lô thử sau thời gian 8 tuần.

2.5.7.3 Đánh giá ảnh hưởng của sản phẩm bổ sung cao cá sấu lên xương chuột (chiều dài, độ chắc và độ đàn hồi của xương)

Chuột được chia thành các lô tương đương về khối lượng và được nuôi ở điều kiện, dinh dưỡng giống nhau. Các chuồng được cho ăn cùng một lượng thức ăn 5 g/con/ngày, uống nước đầy đủ. Cho chuột uống cao và các sản phẩm bổ sung cao cá sấu pha trong nước cất theo các liều sau:

- + Lô thử 1: uống cao cá sấu (CLT) liều 1,85 g/kg
- + Lô thử 2: uống cao cá sấu (CLT) liều 3,70 g/kg
- + Lô thử 3: uống BTP liều 1,84 g/kg
- + Lô thử 4: uống BTP liều 3,68 g/kg
- + Lô thử 5: uống BDD liều 1,84 g/kg
- + Lô thử 6: uống BDD liều 3,68 g/kg
- + Lô thử 7: (lô đối chứng) uống nước cất 0,1 ml/10g thể trọng.

Nhóm chuột ở các lô được lấy xương phân tích độ chắc sau 8 tuần thử.

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê.

2.6 Các phương pháp phân tích

2.6.1 Phân tích hóa lý

2.6.1.1 Phân tích hàm lượng collagen trong xương bằng kỹ thuật HPLC

Xác định hàm lượng collagen trong mẫu bằng kỹ thuật HPLC theo phương pháp Pico-Tag (White và ctv, 1986).

2.6.1.2 Phân tích tổng protein bằng phương pháp Kjeldahl

Phân tích tổng protein bằng phương pháp Kjeldahl theo TCVN 8179: 2009.

2.6.1.3 Phân tích protein hòa tan bằng phương pháp Bradford

Phương pháp protein này được thực hiện theo các bước như mô tả của Bradford (1972).

2.6.1.4 Phân tích mức độ thủy phân protein dùng phương pháp kết tủa với TCA

Phương pháp xác định mức độ thủy phân (DH) được thực hiện theo Hoyle và Meritt - 1994.

2.6.1.5 Xác định hoạt tính kháng oxy hóa bằng gốc tự do ABTS

Hoạt tính kháng oxy hóa của mẫu bột được xác định bằng phương pháp thử với gốc tự do ABTS^{•+} (Re và ctv, 1998).

Cation ABTS^{•+} [2,2'-azinobis (3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] là một chất phát quang màu xanh, được đặc trưng ở độ hấp thu 724 nm. Khi cho chất chống oxy hóa vào dung dịch chứa ABTS^{•+}, các chất chống oxy hóa sẽ khử ion này thành ABTS. Đo độ giảm độ hấp thu của dung dịch ở bước sóng 724nm so với mẫu đối chứng để xác định hoạt tính của chất chống oxy hóa.

2.6.1.6 Xác định khả năng bắt gốc tự do DPPH

Phương pháp xác định khả năng kháng oxy hóa được thực hiện theo (Zhu và ctv 2006; Amissah, 2012).

Cơ chế phản ứng: Cơ chế của hoạt động bắt gốc tự do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) là sự ghép đôi hydro và dừng quá trình ôxi-hóa bằng sự chuyển các gốc tự do sang trạng thái ổn định hơn. Như vậy, khi có mặt của chất chống ôxi hóa nó sẽ khử gốc tự do DPPH và làm cho dung dịch bị giảm màu sắc (màu tím chuyển sang màu vàng nhạt), do đó độ hấp thụ của dung dịch sẽ giảm đi.

2.6.1.7 Hàm lượng tro toàn phần bằng phương pháp nung ở 600°C

Phân tích tro toàn phần được tiến hành theo TCVN 4070:2009.

2.6.1.8 Hàm lượng ẩm bằng phương pháp sấy ở 105°C

Độ ẩm được tiến hành theo TCVN 8135:2009, sấy ở nhiệt độ 102 – 105°C, cho đến khi nhiệt độ không đổi.

2.6.1.9 Hiệu suất thu hồi vật chất khô và thu hồi protein

Hiệu suất thu hồi vật chất khô (%) = (Tổng vật chất khô của bột / tổng chất khô của dung dịch ban đầu) * 100%

Hiệu suất thu hồi protein (%) = (Hàm lượng protein tổng số của bột/ tổng số hàm lượng protein của dung dịch ban đầu) * 100%

2.6.1.10 Phân tích màu

Phân tích màu được thực hiện theo phương pháp CIELAB. Trong hệ thống CIELAB, sự khác nhau giữa các điểm được biểu thị trong không gian màu tương ứng với khác biệt có thể nhìn thấy được giữa các màu.

2.6.1.11 Phân tích cảm quan, khoáng chất và kim loại nặng

Đánh giá cảm quan theo TCVN 11184:2015; Hàm lượng khoáng chất và kim loại theo AOAC (bằng AAS); Hàm lượng thủy ngân bằng thiết bị phân tích Hg trực tiếp DMA 80; Hàm lượng amino acid bằng HPLC.

2.6.2 Phân tích vi sinh

Các chỉ tiêu phân tích vi sinh được tiến hành theo các tiêu chuẩn Việt Nam:

Tổng số vi khuẩn hiếu khí theo TCVN 4884 (ISO 4833-1); *E.Coli* theo TCVN 6846:2007; *Coliforms* theo ISO 4832:2007; *Staphylococcus aureus* theo TCVN 4830-1:2005; *Salmonella* spp. theo TCVN 4829:2005; *Clostridium perfringens* theo TCVN 4991 : 2005; Tổng nấm men – nấm mốc theo TCVN 8275-1:2010.

2.7 Xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu thí nghiệm trình bày dưới dạng giá trị trung bình (\pm SD). Phần mềm JMP 10.0.2 và phương pháp bề mặt đáp ứng được ứng dụng để quy hoạch thực nghiệm và tối ưu hóa quá trình thủy phân. Chỉ các biến với độ tin cậy trên 95% ($p < 0,05$) được coi có ý nghĩa thống kê.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thành phần hóa lý trong xương cá sấu

3.1.1 Thành phần cơ bản của xương nguyên liệu

Kết quả phân tích thành phần hóa học của các mẫu xương nguyên liệu như trong Bảng 3-1. Đối với mẫu xương trước và sau khi loại tủy có các giá trị độ ẩm, pH, tro tổng số, nitơ tổng, protein thô và hàm lượng chất béo khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong đó hàm lượng chất béo khá cao trong xương chưa loại tủy 2,55% sau quy trình xử lý tủy hàm lượng chất béo chỉ còn lại 0,05% trong xương loại tủy.

Bảng 3-1. Thành phần hóa lý của xương trước và sau loại tủy

Chỉ tiêu	Mẫu xương nghiên cứu	
	Xương chưa loại tủy	Xương loại tủy
Độ ẩm (%)	30,28 ^b ± 0,48	8,20 ^a ± 0,04
pH	5,98 ^a ± 0,08	6,13 ^b ± 0,05
Tro tổng số (% w/w) *	63,18 ^b ± 0,17	67,23 ^a ± 0,13
Tro không tan trong axit (% w/w) *	1,27 ^a ± 0,18	1,36 ^a ± 0,44
Nitơ tổng số (% w/w) *	4,90 ^b ± 0,24	4,17 ^a ± 0,04
Protein thô (% w/w) *	30,60 ^b ± 0,19	26,05 ^a ± 0,23
Chất béo (% w/w) *	2,55 ^b ± 0,51	0,05 ^a ± 0,01

^{ab} Trong cùng một hàng, các giá trị trung bình có ký tự theo sau không giống nhau có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$)

* Kết quả tính trên chất khô tuyệt đối

3.1.2 Thành phần amino acid và hàm lượng collagen của xương nguyên liệu

Kết quả phân tích amino acid trong mẫu xương nguyên liệu trước và sau loại tủy (Bảng 3-2) cho thấy các thành phần amino acid ít có sự thay đổi, tổng hàm lượng amino acid trong mẫu xương trước loại tủy (15,45 %) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với mẫu xương sau khi loại tủy (15,22%). Điều này chứng tỏ quá trình xử lý tủy đã có tác động rất ít đến hàm lượng các amino acid trong mẫu xương nguyên liệu. Dữ liệu phân tích cũng cho thấy thành phần các amino acid trong xương cá

sấu chứa nhiều Glutamic acid, Glycine + Histidine, Arginine, Alanine+Prolin, đây là các thành phần cơ bản trong cấu tạo collagen.

Bảng 3-2. Thành phần amino acid trong xương trước và sau loại tủy

Hàm lượng amino acid (g/kg) **	Mẫu xương nghiên cứu	
	Xương chưa loại tủy	Xương loại tủy
Aspartic acid	1,73 ± 0,11	1,59 ± 0,35
Glutamic acid	13,18 ± 0,13	15,47 ± 0,14
Serine	7,38 ± 0,21	7,58 ± 0,22
Glycine + Histidine *	48,67 ± 0,76	44,25 ± 0,11
Arginine	19,23 ± 0,47	18,92 ± 0,34
Threonin *	4,37 ± 0,26	4,95 ± 0,15
Alanine + Prolin	21,99 ± 0,19	21,95 ± 0,52
Tyrosine	2,80 ± 0,82	2,93 ± 0,67
Valine *	5,09 ± 0,18	4,34 ± 0,12
Methionine *	2,36 ± 0,97	2,70 ± 0,95
Cystine	6,81 ± 0,37	6,48 ± 0,42
Isoleucine *	7,09 ± 0,15	7,30 ± 0,86
Leucine *	8,58 ± 0,27	8,66 ± 0,16
Phenylalanine *	2,51 ± 0,29	2,64 ± 0,44
Lysine *	2,69 ± 0,26	2,47 ± 0,08
Tổng (% w/w)	15,45 ± 0,14	15,22 ± 0,28

* Amino acid thiết yếu

** Kết quả tính trên chất khô tuyệt đối

Phân tích hàm lượng Hydroxylproline (Hyp) và collagen trong mẫu xương nguyên liệu (Bảng 3-3) cho thấy hàm lượng Hyp trong mẫu xương cá sấu trước và sau khi loại tủy không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Hàm lượng Hyp trong xương cá sấu cao hơn trong một số xương động vật sử dụng trích ly collagen, chẳng hạn xương cá hồng vàng sọc mờ (*Priacanthus tayenus*) 5,71 mg/g (0,57%) (theo Kittiphattanabawon, 2005), cá nạng hồng (*Otolithes ruber*) 7,51 mg/g (0,75%), cá pecca hồng (*Nemipterus japonicus*) 7,41 mg/g (0,74 %) (theo Koli và ctv, 2012), điều này đồng nghĩa với hàm lượng collagen trong xương cá sấu cũng lớn hơn, qua đó xác định tiềm năng sử dụng xương cá sấu để trích ly collagen.

Bảng 3-3. Hàm lượng hydroxylprolin và collagen trong mẫu xương trước và sau loại tủy

Chỉ tiêu nghiên cứu*	Mẫu nghiên cứu	
	Xương chưa loại tủy	Xương loại tủy
Hydroxylprolin (% w/w)	2,28 ± 0,37	3,01 ± 0,88
Collagen (% w/w)	17,55 ± 0,37	23,12 ± 0,88

* Kết quả tính trên chất khô tuyệt đối

3.1.3 Thành phần khoáng chất, kim loại trong xương cá sấu nguyên liệu

Bảng 3-4. Kết quả phân tích một số thành phần khoáng chất, kim loại trong mẫu xương cá sấu trước và sau loại tủy

Nguyên tố	Đơn vị	Mẫu nghiên cứu	
		Xương chưa loại tủy*	Xương loại tủy*
As	µg/kg	Không phát hiện	Không phát hiện
K	g/kg	0,19 ± 0,00	0,21 ± 0,00
Na	g/kg	4,17 ± 0,09	4,30 ± 0,07
P	g/kg	109,08 ± 0,15	114,76 ± 0,21
Ca	g/kg	218,43 ± 0,98	254,99 ± 0,56
Ba	mg/kg	10,27 ± 0,22	11,35 ± 0,25
Cd	µg/kg	Không phát hiện	Không phát hiện
Cr	mg/kg	4,65 ± 0,45	4,74 ± 0,29
Cu	mg/kg	2,90 ± 0,35	3,31 ± 0,16
Fe	mg/kg	1,66 ± 0,01	0,98 ± 0,08
Mg	mg/kg	2571,09 ± 0,89	2527,70 ± 0,35
Mn	mg/kg	9,58 ± 0,43	8,05 ± 0,62
Ni	mg/kg	3,40 ± 0,22	3,26 ± 0,37
Pb	mg/kg	Không phát hiện	Không phát hiện
Sb	mg/kg	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Se	mg/kg	0,98 ± 0,04	1,02 ± 0,04
Sn	mg/kg	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Zn	mg/kg	49,74 ± 0,55	51,23 ± 0,15
Hg	µg/kg	Không phát hiện	Không phát hiện
Al	mg/kg	60,94 ± 0,16	65,56 ± 0,26

* Kết quả tính trên chất khô tuyệt đối

Kết quả phân tích các khoáng chất, kim loại (Bảng 3-4) cho thấy hàm lượng rất cao của P và Ca so với các nguyên tố còn lại, đây cũng là nhóm chất vô cơ chính tạo ra cấu trúc bioapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$) trong xương (theo Pasteris và ctv, 2004). Hàm lượng magie cao đáng kể (2571,09mg/kg) vì cùng với canxi, magie cần thiết cho sự phát triển của xương, giúp chống lại quá trình lão hoá xương. Magie kích thích chức năng thận, ảnh hưởng đến hoạt động của nhiều loại hormone (theo Rude và ctv, 2009). Một số kim loại độc hại như As, Cd, Pb, Hg không phát hiện. Kết quả thành phần các kim loại của mẫu xương trước và sau loại tủy cũng cho thấy hàm lượng các kim loại tăng giảm ở mức không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$), chỉ có hàm lượng Ca sau loại tủy (254,99 g/kg) tăng so với mẫu trước loại tủy (218,43 g/kg) ở mức có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$).

Trên cơ sở phân tích thành phần xương cá sấu nguyên liệu, nhận thấy xương cá sấu có hàm lượng protein, collagen khá cao, các amino acid phong phú với các amino acid thiết yếu không thể thay thế. Quá trình xử lý tủy đã làm giảm hàm lượng protein và lipid, tuy nhiên không ảnh hưởng đến thành phần và hàm lượng của amino acid trong xương nguyên liệu. Đối với các thành phần chính là hàm lượng collagen và canxi là đáng kể sau khi xương loại tủy. Do đó xương loại tủy sẽ được dùng cho các thí nghiệm phía sau. So sánh kết quả phân tích với các nguyên liệu xương từ động vật khác nhận thấy xương cá sấu hứa hẹn là nguồn nguyên liệu hữu ích trong trích ly collagen.

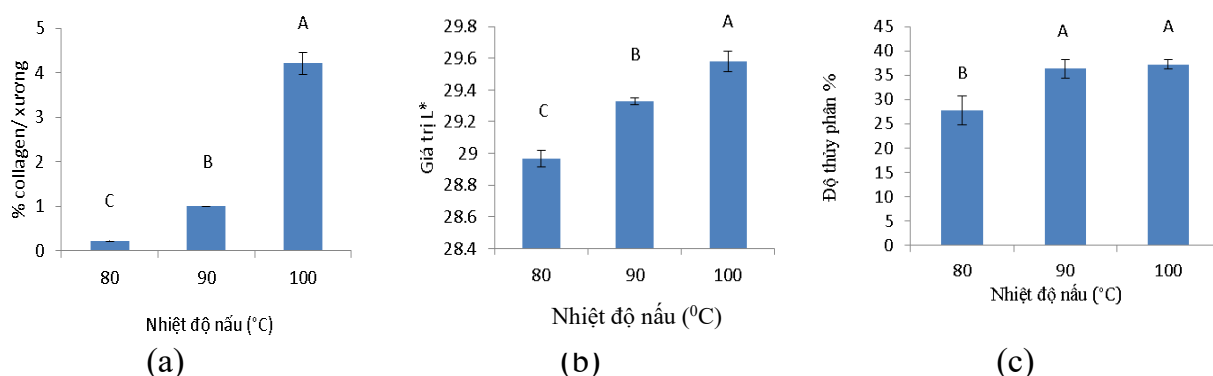
3.2 Cải thiện qui trình nấu cao truyền thống để nâng cao hàm lượng collagen thu được trong cao cá sấu

3.2.1 Kết quả sơ bộ đánh giá ảnh hưởng của các xử lý đến quá trình trích ly collagen

3.2.1.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình trích ly collagen

Kết quả thí nghiệm (Hình 3.1) khi trích collagen ở mẫu có kích thước xương $\leq 4\text{mm}$ ở nhiệt độ 100°C thì hàm lượng collagen trích ra khoảng 4,2% (collagen/xương). Trong khi ở 80°C chỉ có khoảng 0,2% (collagen/xương) Hình 3.1 (a) hiệu quả trích ở các mức nhiệt độ khác biệt có ý nghĩa thống kê. Vậy 100°C là nhiệt độ

phù hợp cho quá trình trích ly collagen ở áp suất khí quyển. Điều này phù hợp, vì xương cá sấu rất cứng dùng nhiệt thấp năng lượng thấp khả năng trao đổi chất trong xương và dung môi nước chậm. Nhiệt độ cao trao đổi chất mạnh hàm lượng trích nhiều hơn. Qua đó trích ở 100°C là điều kiện tối ưu được chọn cho thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3.1. Hàm lượng collagen, độ sáng, mức độ thủy phân trong dịch trích khi nấu trích mẫu trong 8 giờ, ở các nhiệt độ khác nhau

(a): Hàm lượng collagen; (b): Độ sáng; (c): Mức độ thủy phân của dịch trích; Các ký tự khác nhau ở mỗi đồ thị thể hiện sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$).

Theo thống kê, độ sáng dịch trích có sự khác biệt. Màu nhạt nhất là 100°C và đậm nhất 80°C. Thông thường nhiệt độ càng cao làm màu càng đậm, nhưng ở kết quả hình Hình 3.1 (b) ngược lại là do khi đo hàm lượng collagen trong mẫu 100°C gấp 8 lần hàm lượng collagen ở 80°C, nhưng vì pha loãng cùng nồng độ collagen dẫn đến mẫu 100°C có màu nhạt hơn 80°C.

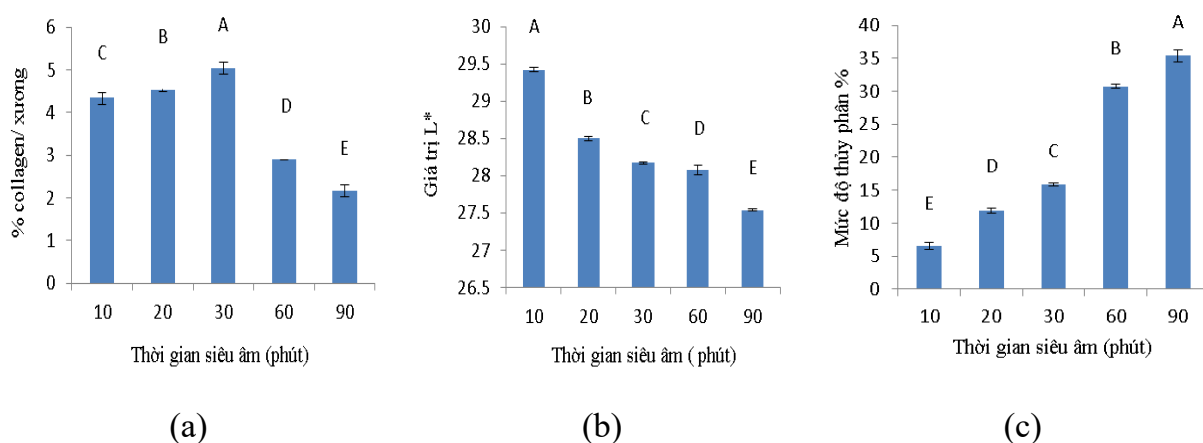
Kết quả mức độ thủy phân của ở 100°C và 90°C không khác biệt và cao hơn 80°C Hình 3.1 (c).

3.2.1.2 Ảnh hưởng của siêu âm đến quá trình trích ly collagen

Theo Hình 3.2 (a) cho thấy hàm lượng collagen tăng dần từ 10 phút đến 30 phút, sau đó giảm từ phút 60 trở đi. Bên cạnh hàm lượng collagen được trích ra thì sóng siêu âm cũng là tác nhân chia cắt, phá hủy cấu trúc của phân tử collagen thành CO_2 , H_2O và NH_3 nếu kéo thời gian quá dài, điều đó dẫn đến hàm lượng collagen bị giảm. Thời gian xử lý siêu âm 30 phút là tốt nhất. Theo Li và ctv (2009), tác giả trích

ly collagen từ gân bò bằng enzyme cũng có thời gian xử lý siêu âm như trên. Nếu so sánh hàm lượng trích giữa 2 nguyên liệu xương cá sấu và gân bò có hỗ trợ siêu âm thì trích ly collagen từ xương không cao chỉ 19% so với từ gân bò 124%. Kết luận chọn xử lý siêu âm 30 phút được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

Theo đồ thị Hình 3.2 (b) thì màu dịch trích đậm nhất ở mẫu 90 phút, mẫu nhạt nhất 10 phút. Lý do càng lâu nhiệt độ tác động sẽ làm sậm màu dịch trích. Vì theo cơ chế của sóng siêu âm khi xử lý càng lâu thì dịch trích càng bị thủy phân nhiều. Đồ thị Hình 3.2 (c) cho thấy rõ điều đó, mẫu 90 phút có mức độ thủy phân cao so với các mẫu còn lại.



Hình 3.2. Hàm lượng collagen, độ sáng, mức độ thủy phân trong dịch trích khi nấu trích mẫu xương ở 100°C, khác thời gian siêu âm

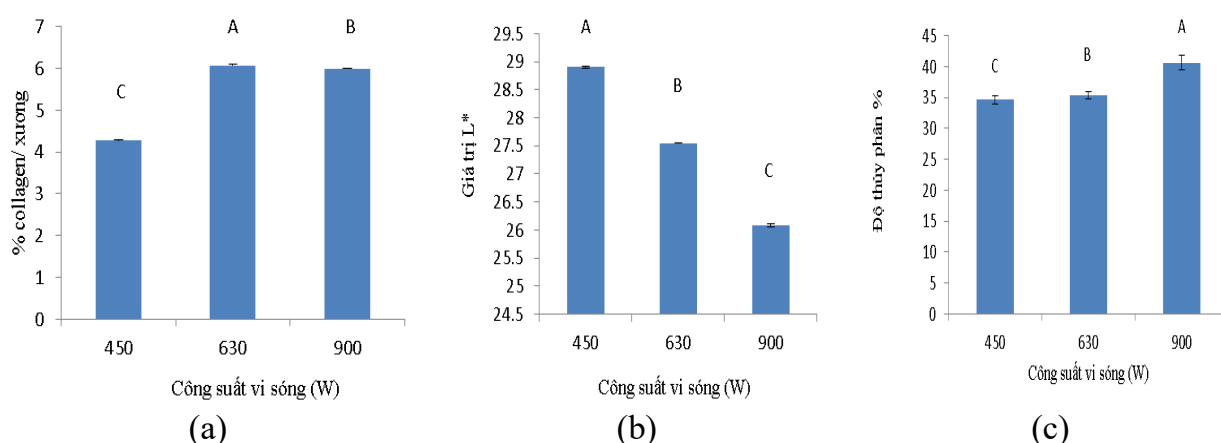
(a): Hàm lượng collagen; (b): Độ sáng; (c): Mức độ thủy phân; Các ký tự khác nhau ở mỗi đồ thị thể hiện sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$).

3.2.1.3 Ảnh hưởng của vi sóng đến quá trình trích ly collagen

Khi hỗ trợ vi sóng vào quá trình trích có khả quan, tăng hàm lượng collagen theo Hình 3.3. Cơ chế của vi sóng là làm cho các phân tử dao động hỗn loạn tương tác với nhau sinh ra nhiệt, điều đó tác động lên bề mặt xương. Khi công suất tăng thì sự dao động nhanh xảy ra ma sát phân tử sinh ra nhiệt và trao đổi nhiệt giữa nước và xương càng lớn. Vì thế ở 900W hàm lượng collagen trích ra nhiều hơn ở 450W. Cũng chính cơ chế hoạt động của vi sóng mà hàm lượng collagen ở 900W là 6% (collagen/ xương) có xu hướng giảm, trong khi đó ở 630W là 6,1% (collagen/ xương)

theo Hình 3.3(a). Khi nhiệt dao động quá cao dẫn đến phá hủy cấu trúc của collagen thành CO_2 , NH_3 và H_2O dẫn đến bị hao hụt hàm lượng. Qua thí nghiệm chọn xử lý vi sóng 10 phút công suất 630W là tốt nhất.

Thí nghiệm với hỗ trợ vi sóng thì hàm lượng collagen tăng thêm 45,2%. Trong khi theo Xingwu và Hong-jun (2012) đã sử dụng vi sóng trích ly collagen từ da heo hàm lượng tăng đến 76,71%. Màu của dịch trích thực tế ở 900W đậm hơn so với ở công suất 450W. Khi pha loãng cùng hàm lượng collagen thì màu dịch trích của mẫu ở 900W vẫn đậm hơn so với 450W, vì ở 900W dao động nhiệt lớn dẫn đến dịch trích sẫm màu hơn dịch 450W. Thí nghiệm này hàm lượng collagen không chênh lệch nhiều nên khi pha loãng độ màu vẫn không đổi.



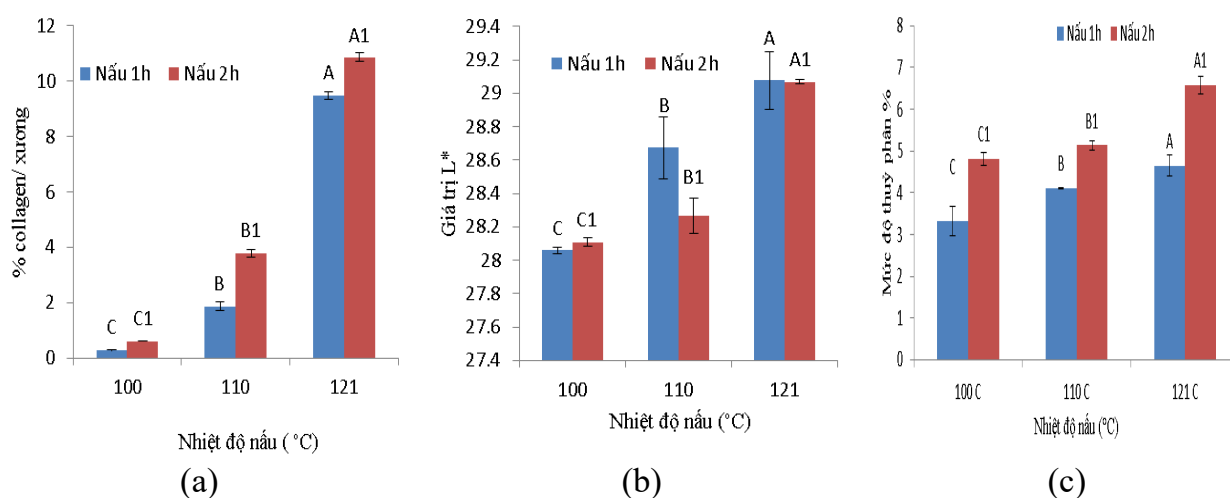
Hình 3.3. Hàm lượng collagen, độ sáng, mức độ thủy phân trong dịch trích khi nấu trích mẫu xương ở 100°C , xử lý vi sóng trong 10 phút, nấu ở 8 giờ, khác công suất vi sóng

(a): Hàm lượng collagen; (b): Độ sáng; (c): Mức độ thủy phân của dịch trích; Các ký tự khác nhau ở mỗi đồ thị thể hiện sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$).

Mức độ thủy phân giữa các mẫu trích có hỗ trợ vi sóng có sự khác biệt. Mẫu 900W có mức độ thủy phân cao hơn 450W theo Hình 3.3(c). Ở mức 900W các phân tử quay nhanh, dao động mạnh tạo ra nhiệt cao hơn ở 450W. Chính vì thế sẽ tác động đến cấu trúc làm tăng mức độ thủy phân.

3.2.1.4 Ảnh hưởng của áp suất cao đến quá trình trích ly collagen

Đồ thị cho thấy hàm lượng collagen nấu ở 1 giờ và 2 giờ ở 2 chế độ nhiệt 121°C áp suất 0,115 Mpa cao hơn 110°C áp suất 0,05 Mpa, thấp nhất là nấu 100°C Hình 3.4(a). Như thế nhiệt càng cao trích ra càng nhiều. So sánh hàm lượng collagen giữa nấu bình thường 100°C nấu 1 giờ và nấu 121°C nấu 1 giờ thì hàm lượng chênh nhau gần 10 lần.



Hình 3.4. Hàm lượng collagen, độ sáng, mức độ thủy phân trong dịch trích khi nấu trích mẫu xương ở 100°C, khác thời gian nấu.

(a): Hàm lượng collagen; (b): Độ sáng; (c): Mức độ thủy phân dịch trích; Các ký tự khác nhau ở mỗi đồ thị thể hiện sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$).

Điều này chứng minh rằng sử dụng nấu áp suất/ nhiệt độ cao rất khả quan trong ly trích ly collagen từ xương cá sấu khi nấu 121°C trong 2 giờ thì hàm lượng collagen tăng khá cao so với các thí nghiệm khác. Sau khi nấu xương mềm ra, có thể bóp nát bằng tay. So với ở 100°C trong 2 giờ, sau khi nấu xương vẫn cứng tương đương như xương chưa nấu. So sánh giữa nấu áp suất cùng nhiệt độ khác thời gian, nhận thấy thời gian dài cho hàm lượng collagen trích cao hơn. Chứng tỏ nhiệt độ cao cho hiệu quả trích ly collagen tốt hơn nhiều. Trích ở 121°C trong 2 giờ được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

Nhìn màu thực tế của dịch trích thì ở 121°C màu đậm hơn các mẫu còn lại, bởi vì hàm lượng collagen quá cao dẫn đến màu đậm hơn. Tuy nhiên chính hàm lượng

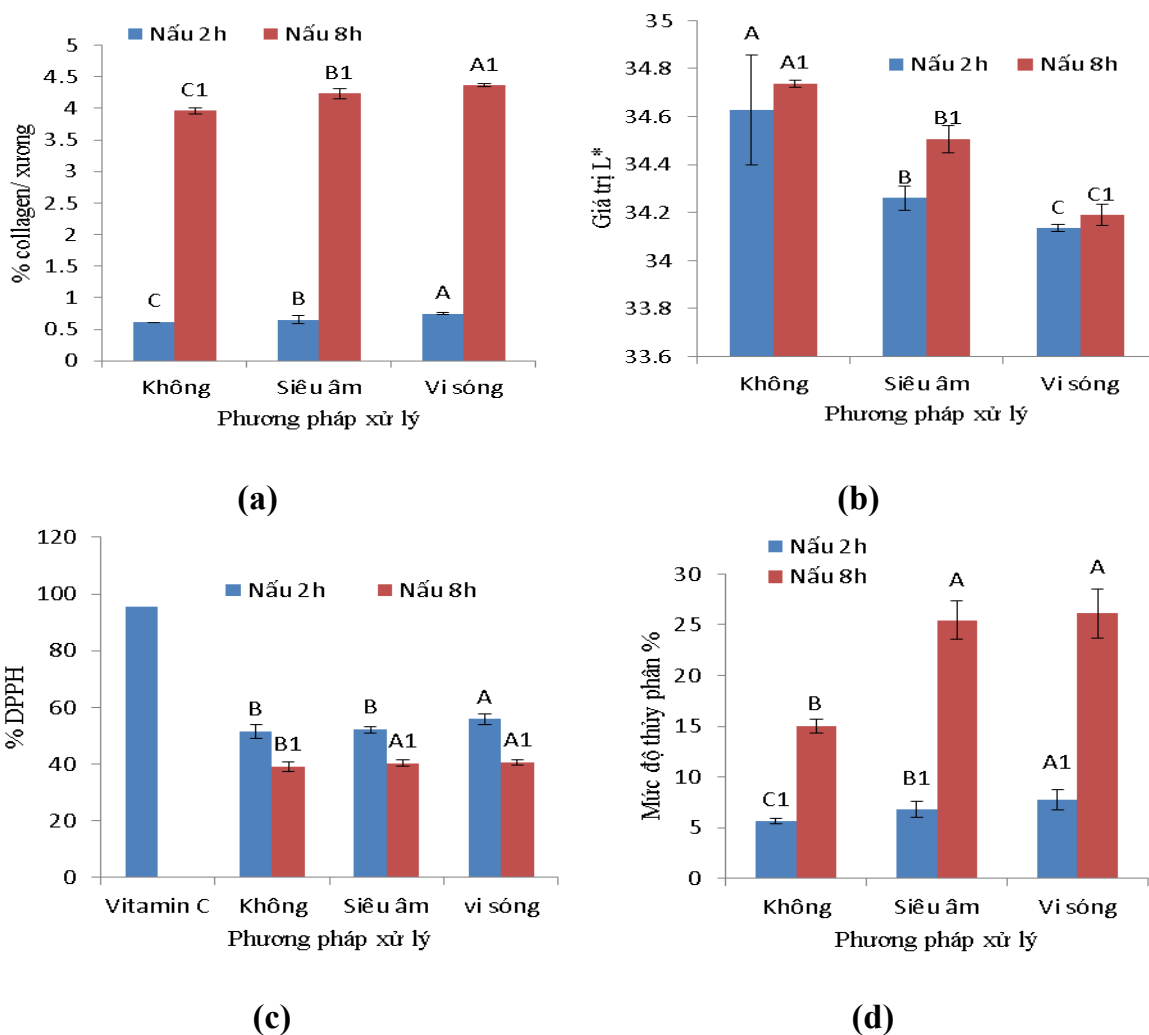
quá cao nên khi pha loãng cùng nồng độ protein thì màu của mẫu ở 121°C lại nhạt hơn so với 100°C Hình 3.4(b).

Kết quả nấu 1 giờ cho thấy khi nhiệt độ càng cao kèm với áp suất lớn, cũng ảnh hưởng đến cấu trúc của collagen dẫn đến một hàm lượng collagen bị thủy phân. Tuy nhiên mức độ thủy phân giữa 3 chế độ không tăng nhiều, chỉ chênh lệch nhau 2% Hình 3.4 (c). Điều này cũng tương tự như nấu 2 giờ.

3.2.2 So sánh các phương pháp xử lý khi nấu ở áp suất khí quyển

Trong thí nghiệm này có hai mốc thời gian nấu được khảo sát là 2 giờ và 8 giờ, bên cạnh đó còn sử dụng siêu âm và vi sóng hỗ trợ nhằm xem xét so sánh hiệu quả trích ly. Điều này được thể hiện qua các chỉ tiêu phân tích ở Hình 3.5(a). Ở đồ thị cho thấy hàm lượng collagen ở chế độ vi sóng cao nhất so với siêu âm và không xử lý. Tương tự đối với nấu 8 giờ cũng cho kết quả như vậy. Tuy nhiên theo số liệu thì có tăng nhưng không có ý nghĩa thống kê. Điều đó cũng thể hiện ở hình chụp dịch trích cho thấy màu đậm dần từ không xử lý đến vi sóng xem thêm từ biểu đồ Hình 3.5(b). So sánh hàm collagen ở 8 giờ thì gấp 4 lần khi nấu 2 giờ. Kết luận không xử lý thì hàm lượng trích ra ít hơn khi có hỗ trợ siêu âm và vi sóng.

Độ kháng oxi hóa cũng tăng tương tự, cao nhất là ở chế độ vi sóng, tuy nhiên ở thời gian 8 giờ độ kháng oxi hóa giữa siêu âm và vi sóng khác nhau không có ý nghĩa và thấp hơn 2 giờ. Lý do khi nấu thời gian dài collagen trở thành chất oxi hóa, nên khả năng bắt gốc tự do giảm. Bên cạnh sử dụng siêu âm và vi sóng giúp tăng thêm hàm lượng collagen nhưng cũng tăng mức độ thủy phân Hình 3.5(c). Điều này phù hợp với nghiên cứu của Li và ctv (2018), vì sự tác động của sóng siêu âm và vi sóng làm ảnh hưởng đến cấu trúc của collagen, phá hủy các liên kết tạo thành các collagen.



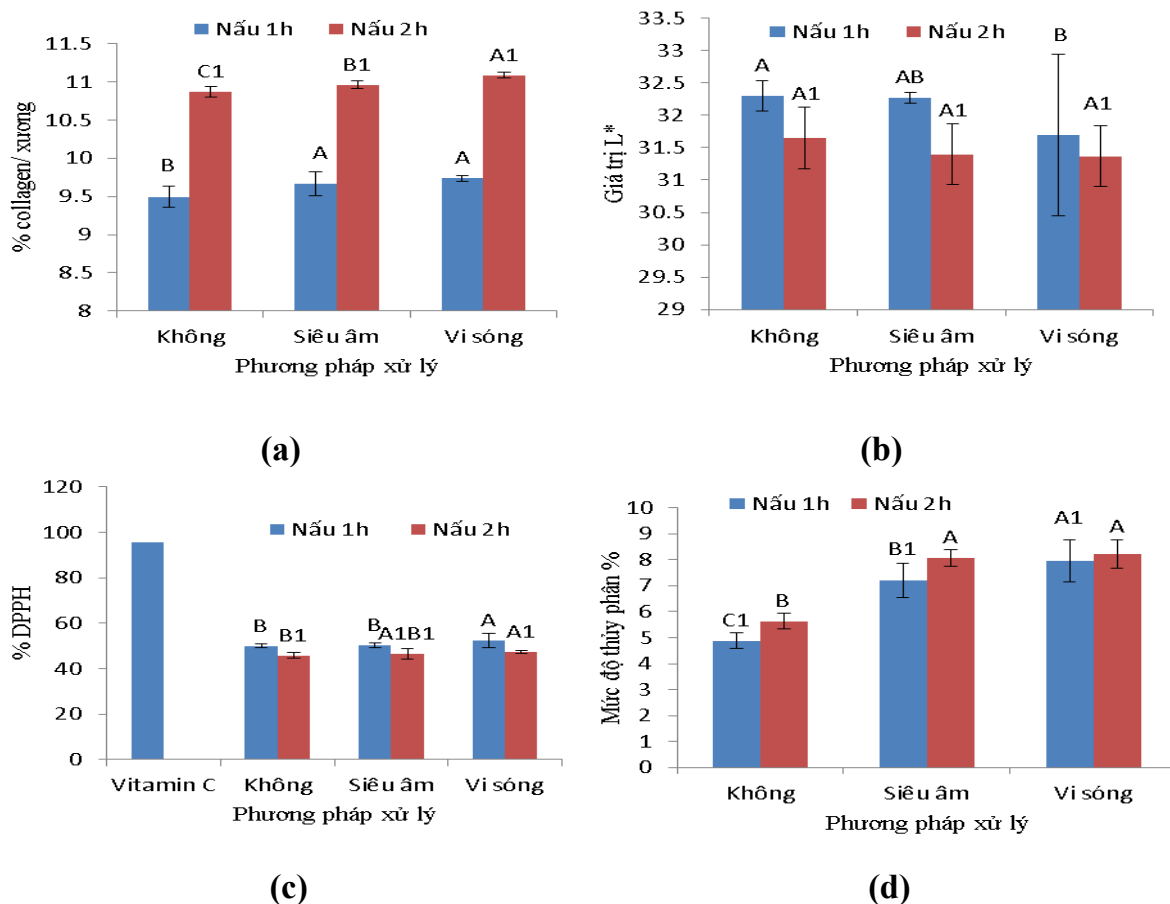
Hình 3.5. Hàm lượng collagen, độ sáng, DPPH, mức độ thủy phân trong dịch trích khi so sánh các phương pháp xử lý mẫu khác nhau: ở 100°C, khác thời gian nấu.

(a): Hàm lượng collagen; (b): Độ sáng; (c): Độ kháng oxi hóa; (d): Mức độ thủy phân, Các ký tự khác nhau ở mỗi đồ thị thể hiện sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$).

3.2.3 So sánh các phương pháp xử lý khi nấu ở áp suất cao

Khi phân tích các chỉ tiêu thì hàm lượng collagen ở thời gian 1 giờ và nấu 2 giờ khác nhau theo Hình 3.6 (a). Mẫu không xử lý có hàm lượng thấp nhất và có xử lý vi sóng có hàm lượng cao nhất. Độ màu dịch trích không có sự khác biệt ở các phương pháp (Hình 3.6 (b)) khi nấu ở 2 giờ. Giá trị kháng oxi hóa của các dịch trích ở các phương pháp là như nhau, thấp hơn khoảng 50% so với đối chứng Vitamin C (Hình 3.6 (c)). Mức độ thủy phân tăng từ không xử lý đến xử lý vi sóng. Nhìn chung các kết phân tích theo chiều hướng biến thiên tương tự nấu cách thủy, nhưng khác về

hàm lượng collagen. Từ thí nghiệm nấu cách thủy và nấu áp suất cho thấy rằng hỗ trợ vi sóng cho hàm lượng collagen cao nhất so với siêu âm và không xử lý.



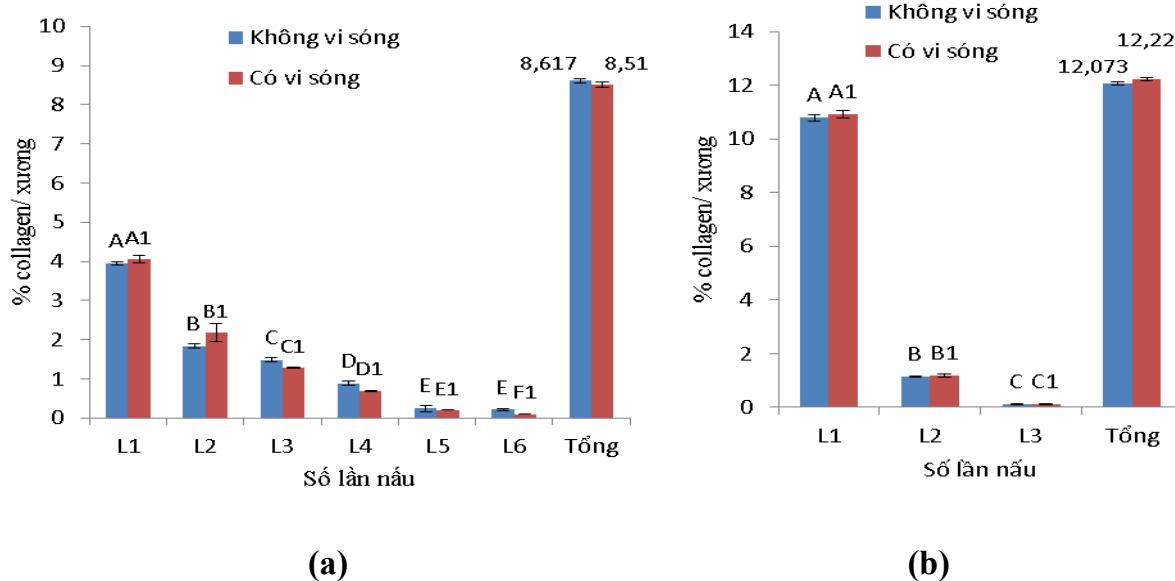
Hình 3.6. Hàm lượng collagen, độ sáng, DPPH, mức độ thủy phân trong dịch trích khi nấu trích mẫu xương ở 121°C, áp suất cao, khác thời gian nấu (a): Hàm lượng collagen; (b): Độ sáng; (c): Độ kháng oxi hóa; (d): Mức độ thủy phân, Các ký tự khác nhau ở mỗi đồ thị thể hiện sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$).

3.2.4 Thời gian cần khi nấu ở điều kiện áp suất khí quyển và áp suất cao

Từ thí nghiệm 3 và 4 chọn chế độ vi sóng là tốt nhất để hỗ trợ cho quá trình nấu này. Theo đồ thị Hình 3.7 (a) thấy rằng nấu lần sau hàm collagen luôn thấp hơn lần trước, giảm không phải theo đường tuyến tính. Ở lần nấu 1 và lần nấu 2 có hỗ trợ vi sóng thì hàm lượng cao hơn không sử dụng vi sóng, tuy nhiên đến lần thứ 3 không hỗ trợ vi sóng nữa thì hàm lượng trích thấp hơn.

Theo số liệu thì trích 6 lần tổng hàm lượng của hai phương pháp trích có hỗ trợ và không hỗ trợ vi sóng bằng nhau. Đồ thị nấu áp suất cho thấy hỗ trợ vi sóng

cũng có hiệu quả, tuy nhiên lần thứ 2 thì không còn hiệu quả. Sau khi nấu cách thủy lần đầu, xương vẫn còn cứng, tuy nhiên nấu nhiệt độ cao 121°C thì xương đã mềm ra, chứng tỏ ngay lần nấu đầu hàm lượng collagen nấu cách thủy trích ít hơn Hình 3.7 (a) và (b). Đối với nấu áp suất khí quyển thì nên dừng lại ở lần trích thứ 4 và trích ở 121°C thì dừng lại ở lần thứ 2 cho kết quả tốt nhất.

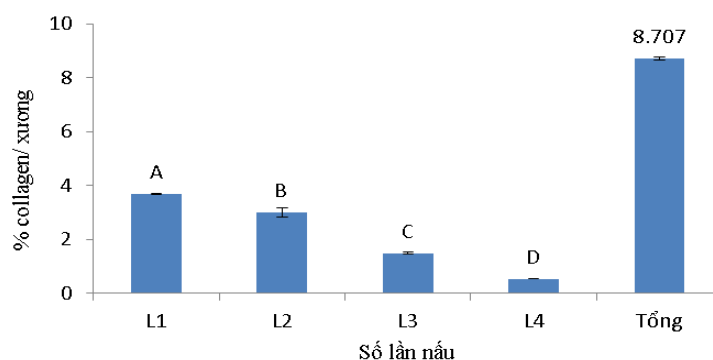


Hình 3.7. Hiệu quả của việc xử lý vi sóng khi sử dụng số lần nấu trích khác nhau của mẫu xương cá sấu

(a): Hàm lượng collagen, nấu cách thủy 8 giờ; (b): Hàm lượng collagen, nấu áp suất 2 giờ/ 121°C; Các ký tự khác nhau ở mỗi đồ thị thể hiện sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$).

Ngoài ra sau khi nấu cách thủy lần thứ 6, hàm lượng protein trong xương sau nấu còn khoảng 6,7%. Và tiến hành lấy xương này ngâm trích bằng acid thì xác định còn lại khoảng 4,8% protein trong xương. Kiểm tra dịch ngâm acid thì được 1,8% đã trích được. Khi trích bằng acid acetic với xương chưa nấu không cao vì xương chưa nấu rất cứng khó trích bằng acid, kết quả sau khi ngâm xương 3 ngày theo tỉ lệ (xương/ acid) 1:10 có hỗ trợ khuấy 350 vòng/ phút, hàm lượng protein chỉ được 2,2% và trong xương còn khoảng 20,8% protein tính theo vật chất khô.

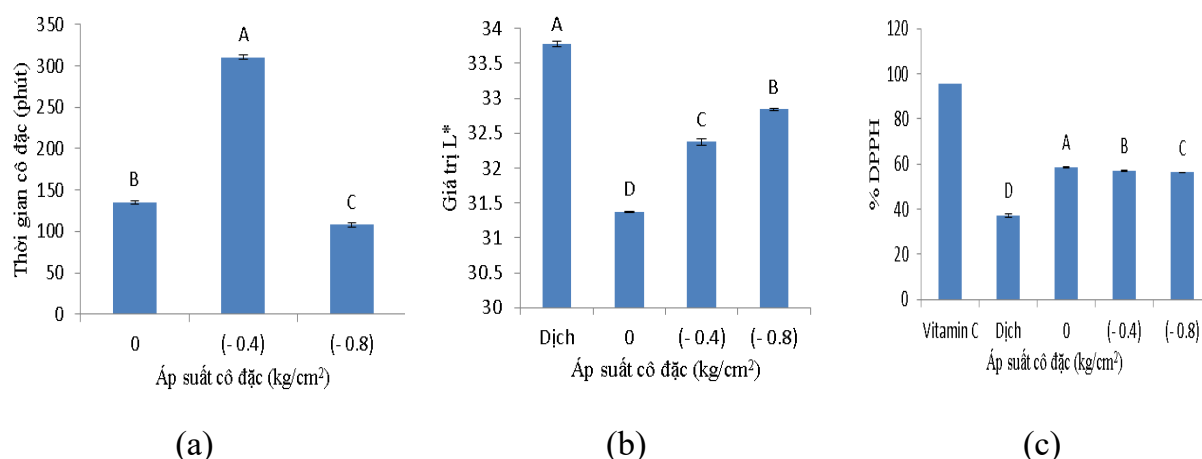
Khi trích ở nhiệt độ 110 và 121°C thì hàm lượng collagen ở 121°C giảm nhanh hơn ở 110°C (Hình 3.7-b và Hình 3.8). Do áp suất càng cao đã làm ép nén các vật chất ở lại trong xương. Khi trích ở 110°C nên dừng lại khi trích lần thứ 3.



Hình 3.8. Hàm lượng collagen trong dịch trích khi nấu mẫu xương trong 2 giờ/ 110°C, không xử lý vi sóng.

Các ký tự khác nhau ở mỗi đồ thị thể hiện sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$).

3.2.5 Ảnh hưởng của áp suất chân không đến quá trình cô đặc dịch collagen



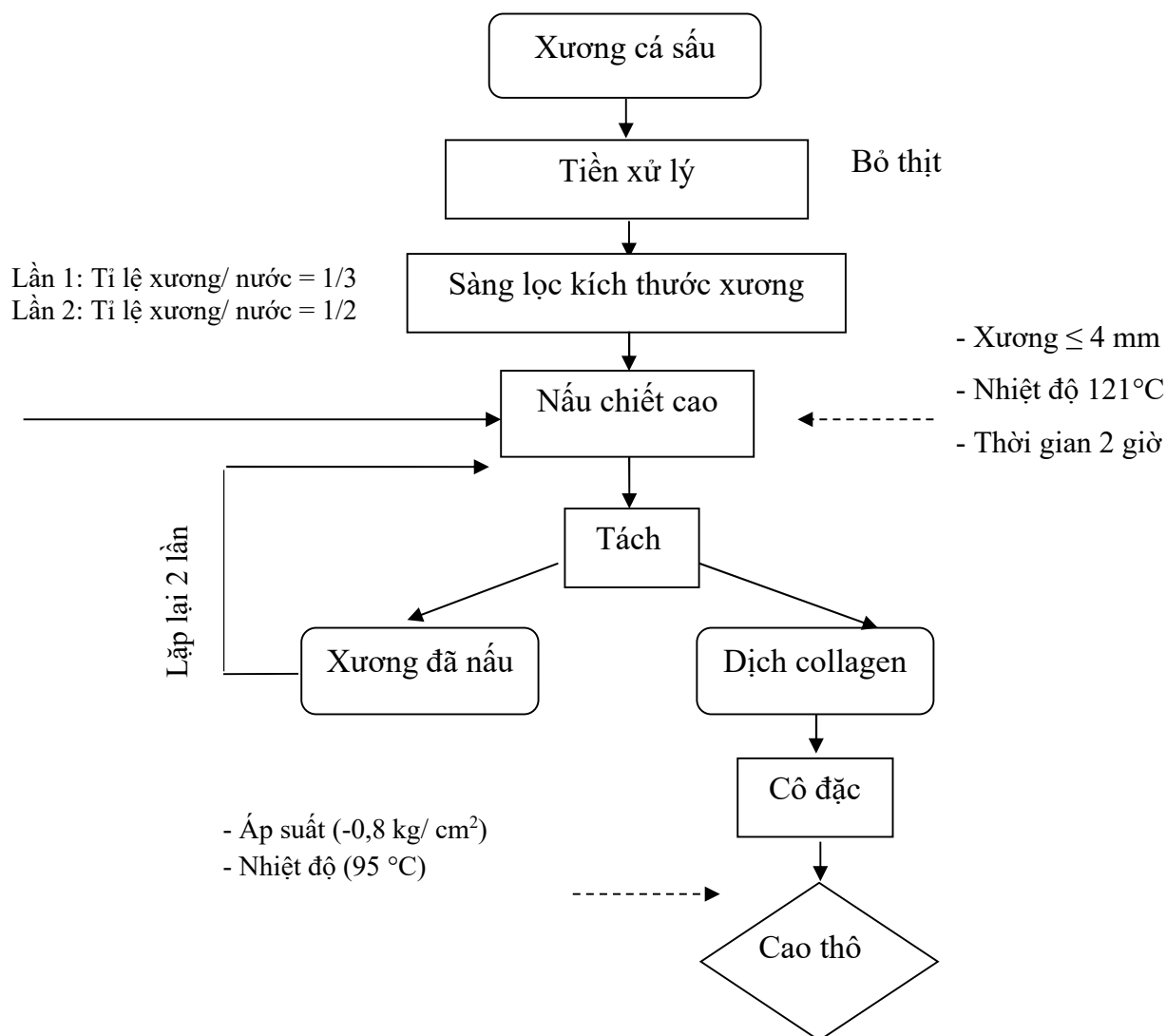
Hình 3.9. Hàm lượng DPPH, độ sáng, thời gian cô đặc của sản phẩm cô đặc ở áp suất khác nhau

(a) Thời gian cô đặc; (b) Độ màu; (c) Độ kháng oxy hóa; Các ký tự khác nhau ở mỗi đồ thị thể hiện sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$); Ở áp suất 0 kg.cm⁻² là mẫu đối chứng

Kết quả cho thấy áp dụng cô đặc chân không cải thiện về màu rất rõ rệt: vàng óng rất đẹp so với mẫu đối chứng (Hình 3.9-b). Mẫu sản phẩm được cô đặc đến độ ẩm từ 28 – 30%, độ ẩm này thấp hơn so với đối chứng khoảng 2 - 4%. Thời gian cô đặc ở - 0,8 kg.cm⁻² khoảng 108 phút thấp hơn cô đặc trên bếp 135 phút, trong khi đó ở - 0,4 kg.cm⁻² hơn 310 phút. Thời gian kéo dài sẽ ảnh hưởng đến màu sắc sản phẩm. Khi cô đặc trên bếp thì nhanh hơn cô đặc ở - 0,4 kg.cm⁻², tuy nhiên sản phẩm dưới

đáy nồi bị cháy và có mùi khét và dẫn đến hiệu suất thu hồi thấp. Đối với thí nghiệm này thông số được chọn cô đặc là $-0,8 \text{ kg.cm}^{-2}$ và ở 95°C .

3.2.6 Quy trình nấu cao xương cá sấu cải tiến



Hình 3.10. Sơ đồ quy trình đề xuất nấu cao thử nghiệm

Quy trình đề xuất đã đạt được mục tiêu đề ra đó là cải thiện được chất lượng của sản phẩm tốt hơn so với sản phẩm nấu theo phương pháp truyền thống, tăng hiệu suất thu hồi (từ 7,28% lên 13,86%), rút ngắn thời gian nấu (từ 6-7 lần, mỗi lần từ 8-12 giờ xuống còn 2 giờ), màu ít sậm hơn.

Quy trình đề xuất như Hình 3.10: Qua thí nghiệm trích ly collagen có hỗ trợ vi sóng hoặc siêu âm thì hàm lượng collagen có tăng thêm nhưng không đáng kể. Vì

vậy qui trình nấu thử nghiệm không đề xuất hỗ trợ siêu âm hoặc vi sóng. Sau khi trích hàm lượng chất khô của dịch trước cô quay 3,36%.

3.2.7 Thành phần hóa lý, hàm lượng amino acid mẫu cao khi áp dụng qui trình nấu đề xuất

Kết quả phân tích mẫu cao ở Bảng 3-5 nhìn chung đạt được mục tiêu của đề tài, kết quả hàm lượng các chỉ tiêu tốt hơn so với sản phẩm hiện tại của cao công ty bán trên thị trường. Chỉ tiêu tro toàn phần cao hơn, vì qui trình nấu cao hiện hành sử dụng xương nguyên trạng nấu nên hàm lượng khoáng xương trong dịch lọc ít. Đối với qui trình nấu đề xuất thì sử dụng kích thước xương ≤ 4 mm, điều này là do khi nấu khoáng xương hòa tan trong dịch nhiều dẫn đến khó khăn trong quá trình lọc dịch collagen nên hàm lượng tro trong sản phẩm cao. Đặc biệt hiệu suất thu hồi của mẫu cao theo qui trình nấu hiện hành là 7,28% trong khi đó đối với qui trình nấu thử nghiệm hiệu suất thu hồi đạt tới 13,86%. Điều này cho thấy việc xay xương có hiệu quả hơn rất nhiều so với không xay xương. Bên cạnh đó việc áp dụng cô đặc chân không sẽ hạn chế sản phẩm bị cháy dưới đáy thiết bị.

Bảng 3-5. Thành phần hóa lý mẫu cao nấu thử nghiệm

Chỉ tiêu phân tích	Kết quả mẫu nấu thử nghiệm (*)	Kết quả sản phẩm của công ty (*)
Hàm lượng protein %	77,10	71,76
Độ ẩm %	28,08	31,28
Chất béo %	0,14	1,65
pH	6,82	6,80
Tro toàn phần %	3,06	2,88
Hiệu suất thu hồi %	13,86	7,28
Hàm lượng collagen %	64,31	61,37
Tổng vi khuẩn hiếu khí (CFU/g)	$4,0 \times 10^1$	$2,45 \times 10^5$
Tổng số nấm men (CFU/g)	Không phát hiện	Không phát hiện
Tổng số nấm mốc (CFU/g)	Không phát hiện	18

(Kết quả phân tích sản phẩm của công ty theo nguồn: Báo cáo của Trung tâm Khoa học Công nghệ Dược Sài Gòn, 2012). Chú thích: (*) được tính toán dựa trên cao khô tuyệt đối.

Các mẫu xương đã loại tủy được dùng để nấu cao được các sản phẩm cao thô. Nhận định ban đầu về sản phẩm cho thấy, sản phẩm cao có dạng lỏng có màu nâu hổ phách, mùi đặc trưng, hơi tanh.

Bảng 3-6. Thành phần amino acid trong mẫu cao nghiên cứu từ xương cá sấu

Hàm lượng amino acid (g/kg) **	Mẫu cao nghiên cứu
Aspartic acid	44,78 ± 0,54
Glutamic acid	106,63 ± 0,16
Serine	38,72 ± 0,66
Glycine + Histidine*	209,28 ± 0,30
Arginine	60,20 ± 0,96
Threonin*	19,33 ± 0,32
Alanine + Prolin	79,95 ± 0,11
Tyrosine	8,05 ± 0,19
Valine*	12,45 ± 0,22
Methionine*	10,56 ± 0,22
Cystine	11,10 ± 0,20
Isoleucine*	19,06 ± 0,28
Leucine*	29,20 ± 0,45
Phenylalanine*	9,91 ± 0,44
Lysine*	8,51 ± 0,25
Tổng (% w/w)	66,77 ^b ± 0,99

* Amino acid thiết yếu

** Kết quả tính trên chất khô tuyệt đối

Kết quả phân tích hàm lượng amino acid trong các mẫu cao thu được từ nguồn nguyên liệu xương (Bảng 3.6). Trong cao cá sấu có thành phần amino acid phong phú, trong đó bao gồm các amino acid thiết yếu như Histidine, Threonin, Valine, Methionine, Isoleucine, Leucine, Phenylalanine, Lysine. Đặc biệt trong các sản phẩm cao cá sấu nghiên cứu có hàm lượng lớn Glu, Gly+His, Arg và Ala+Pro, kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Wood và ctv (2008) khi phân tích thành phần dịch chiết collagen xương cá sấu (*Alligator mississippiensis*) có hàm lượng rất cao Gly, Pro, Ala, đây cũng là đặc điểm chung của collagen.

Tổng hàm lượng các amino acid trong cao cá sấu (66,77%) tương đương với hàm lượng amino acid trong cao hổ cốt (58-74%), cao gấu (73%), cao khi (85%) và lớn hơn so với cao ban long (43%) (Theo Đỗ Tất Lợi, 2006).

Kết quả phân tích hàm lượng hydroxylprolin và collagen (Bảng 3-7) cho thấy hàm lượng hydroxylprolin mẫu cao đạt 8,58%, và hàm lượng collagen đạt 65.98%.

Bảng 3-7. Hàm lượng Hydroxylprolin và collagen trong mẫu cao từ xương cá sấu

Chỉ tiêu nghiên cứu *	Mẫu cao nghiên cứu
Hydroxylprolin (% w/w)	8,58 ± 0,53
Collagen (% w/w)	65,98 ± 0,52

* Kết quả tính trên chất khô tuyệt đối

3.2.8 Thành phần chất khoáng, kim loại trong cao sau khi áp dụng qui trình nấu đề xuất

Kết quả phân tích thành phần chất khoáng, kim loại trong mẫu cao từ xương cá sấu (Bảng 3-8) cho thấy mẫu cao không phát hiện các kim loại As, Cd, Pb, Hg, Cr. Đặc biệt hàm lượng chất khoáng Ca (1,45 g/kg), P (0,29 g/kg), Mg (942,50 mg/kg), và Se (2,21 mg/kg) cao khi so với hàm lượng Canxi trong cao hổ cốt (0,08-0,16%), cao gấu (0,05%), cao khi (0,02%), cao ban long (0,08-0,12%) thì cao cá sấu có hàm canxi cao hơn hẳn (1,45%) (Theo Đỗ Tất Lợi, 2006).

Bảng 3-8 Thành phần chất khoáng, kim loại trong mẫu cao nghiên cứu

Nguyên tố	Đơn vị	Mẫu cao nghiên cứu
As	µg/kg	Không phát hiện
K	g/kg	0,89 ± 0,03
Na	g/kg	6,68 ± 0,23
P	g/kg	0,29 ± 0,08
Ca	g/kg	1,45 ± 0,01
Ba	mg/kg	0,40 ± 0,02
Cd	µg/kg	Không phát hiện
Cr	mg/kg	Không phát hiện
Cu	mg/kg	0,64 ± 0,01

Fe	mg/kg	9,79 ± 0,70
Mg	mg/kg	942,50 ± 0,27
Mn	mg/kg	0,10 ± 0,00
Ni	mg/kg	0,39 ± 0,01
Pb	mg/kg	Không phát hiện
Sb	mg/kg	Không phát hiện
Se	mg/kg	2,21 ± 0,01
Sn	mg/kg	0,39 ± 0,07
Zn	mg/kg	31,20 ± 0,12
Hg	µg/kg	Không phát hiện
Al	mg/kg	25,95 ± 0,22

* Kết quả tính trên chất khô tuyệt đối.

3.3 Nghiên cứu thủy phân protein thịt cá sấu

Ở các kết quả thí nghiệm trên, xương cá sấu đã được nghiên cứu và ứng dụng nấu thành cao để có thể nâng cao giá trị sử dụng. Trong khi đó thịt cá sấu chiếm tỉ lệ cao nhất 34,3% khối lượng (Hoffman và ctv, 2000) vẫn còn được xem là phụ phẩm ngành chăn nuôi, nên việc nghiên cứu thủy phân thịt cá sấu giúp nâng cao lợi nhuận kinh tế đồng thời làm cơ sở cho việc nghiên cứu các sản phẩm thủy phân từ nguồn nguyên liệu khác. Với mục tiêu đó, các thí nghiệm thủy phân thịt cá sấu được tiến hành và đạt được kết quả như sau:

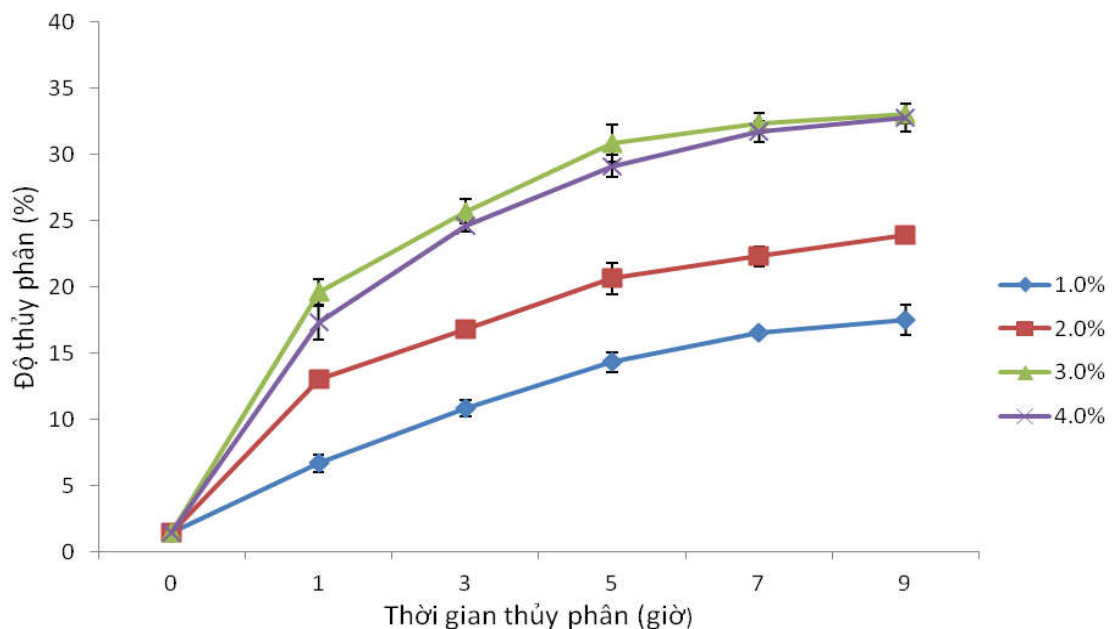
3.3.1 Ảnh hưởng của các enzyme đến quá trình thủy phân protein thịt cá sấu

Để lựa chọn loại enzyme thủy phân protein thịt cá sấu đạt hiệu quả cao, trong nghiên cứu này ba loại enzyme được sử dụng để khảo sát gồm neutral, alcalase và flavourzyme. Vì mỗi loại cơ chất sẽ có điều kiện thủy phân (pH, nhiệt độ và tỷ lệ enzyme bổ sung) khác nhau đối với từng loại enzyme. Vì vậy, để đánh giá hiệu quả của từng enzyme, trong thí nghiệm này, mỗi enzyme được thăm dò pH, nhiệt độ và tỷ lệ enzyme bổ sung thích hợp. Kết quả thủy phân theo từng loại enzyme được trình bày lần lượt bên dưới:

3.3.1.1 Thủy phân bằng enzyme neutral

a) Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme neutral

Kết quả đánh giá mức độ thủy phân của enzyme neutral ở pH 6,5; nhiệt độ 47,5°C và mẫu được lấy ở các mốc thời gian khác nhau: 0, 1, 3, 5, 7 và 9 giờ. Số liệu thu được về sự ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme neutral đối với mức độ thủy phân được trình bày ở Hình 3.11, cho thấy mức độ thủy phân tăng dần theo thời gian thủy phân và tốc độ thủy phân thịt cá sấu tăng nhanh trong khoảng vài giờ đầu và chậm lại ở các giờ thủy phân tiếp theo. Điều này chứng tỏ các liên kết peptid liên tục bị enzyme protease bẻ gãy theo thời gian thủy phân. Đường cong mức độ thủy phân điển hình này cũng đã được báo cáo trong các nghiên cứu thủy phân protein của Diniz và Martin (1996); Benjakul và Morrissey (1997); Guerard và ctv (2002); Ovissipour và ctv (2010). Việc giảm tỷ lệ tăng mức độ thủy phân theo thời gian đã được Guerard và ctv (2002) cho rằng có thể là do sự hạn chế hoạt động của enzyme bởi sự hình thành của các sản phẩm phản ứng tại mức độ thủy phân cao. Hơn nữa, việc giảm tốc độ thủy phân cũng có thể là do giảm nồng độ cơ chất.



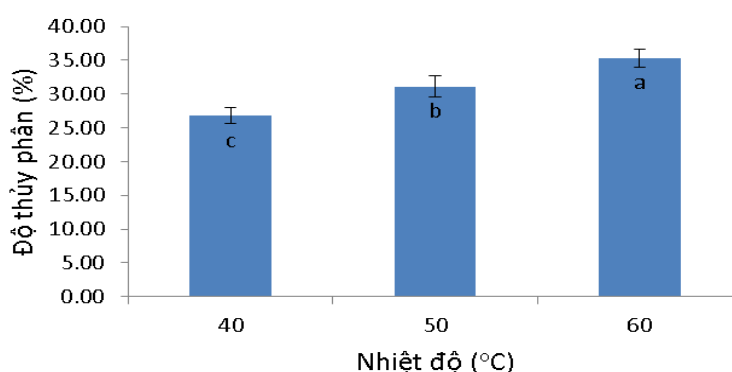
Hình 3.11 Mức độ thủy phân thịt cá sấu theo thời gian ở các tỉ lệ bổ sung enzyme neutral khác nhau

Kết quả Hình 3.11 cho thấy khi thay đổi tỷ lệ enzyme cho vào mẫu thủy phân có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả của quá trình thủy phân. Cụ thể mức độ thủy phân sau 9 giờ của các mẫu bổ sung enzyme theo tỉ lệ 1%, 2%, 3% và 4% lần lượt là 17,54%, 23,89%, 33,07% và 32,75%. Mức độ thủy phân càng cao khi tăng hàm lượng enzyme và đạt cao nhất ở hàm lượng enzyme 3%. Tiếp tục tăng hàm lượng enzyme lên 4% mức độ thủy phân không tăng thêm nữa (sau 7h và 9h thủy phân, không có sự khác biệt có ý nghĩa về mức độ thủy phân giữa tỷ lệ enzyme 3% và 4%). Nguyên nhân là do lượng cơ chất có trong nguyên liệu là không đổi, khi cho enzyme vào với tỷ lệ vượt qua điểm tới hạn thì các peptide đã bị phân cắt hết nên mức độ thủy phân tăng không đáng kể.

Chính vì vậy, tỷ lệ enzyme neutral 3% để bổ sung vào dịch thủy phân thịt cá sấu là thích hợp nhất, đảm bảo tính hiệu quả kinh tế và hiệu quả thủy phân tốt nhất.

b) Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Quá trình thủy phân được thực hiện với tỉ lệ enzyme neutral bổ sung 3%, pH dịch trước khi đem thủy phân được chỉnh về 6,5 và nhiệt độ được thực hiện tại các mốc là 40°C, 50°C và 60°C. Mức độ thủy phân sau 9 giờ khi thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau được thể hiện trong Hình 3.12.



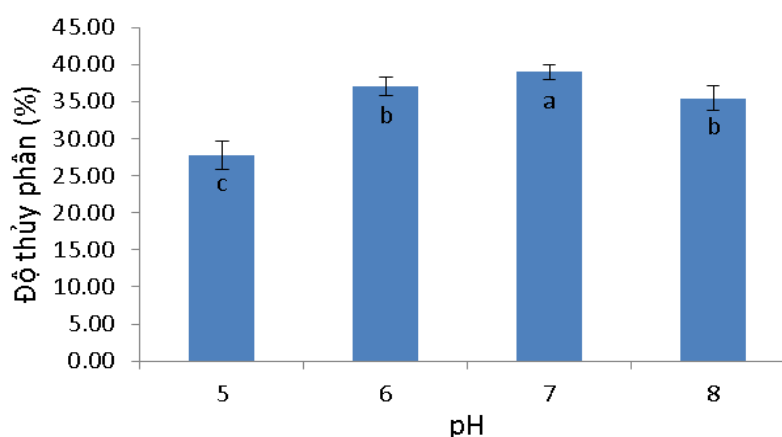
Hình 3.12. Độ thủy phân thịt cá sấu bằng enzyme neutral ở nhiệt độ khác nhau sau 9 giờ
Chú thích: Các kí tự (a, b, c) thể hiện sự khác biệt mức độ thủy phân giữa các nhiệt độ. Các giá trị không có cùng ký tự thì khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95%.

Từ kết quả phân tích thống kê sau 9 giờ thủy phân cho thấy giữa các mức độ thủy phân có sự khác biệt về mặt thống kê khi thay đổi nhiệt độ thủy phân. Điều này chứng tỏ có sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu quả quá trình thủy phân.

Khi thủy phân ở 40°C, 50°C và 60°C, mức độ thủy phân sau 9 giờ tương ứng là 26,80%, 31,07% và 35,29%. Ở nhiệt độ 60°C mức độ thủy phân đạt cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với ở nhiệt độ 40°C và 50°C. Vì vậy, nhiệt độ 60°C là thích hợp cho sự hoạt động của enzyme neutral với cơ chất là protein thịt cá sấu.

c) Khảo sát ảnh hưởng của pH

Để khảo sát ảnh hưởng của pH, thí nghiệm được thực hiện ở các pH 5; 6; 7 và 8 với nhiệt độ cố định 60°C và tỷ lệ enzyme neutral 3%. Mức độ thủy phân sau 9 giờ khi thực hiện ở các pH khác nhau được thể hiện trong Hình 3.13.



Hình 3.13. Ảnh hưởng pH đến mức độ thủy phân bằng enzyme neutral sau 9 giờ.

Chú thích: Các ký tự (a, b, c) thể hiện sự khác biệt mức độ thủy phân tại các pH khác nhau. Các giá trị không có cùng ký tự thì khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95 %.

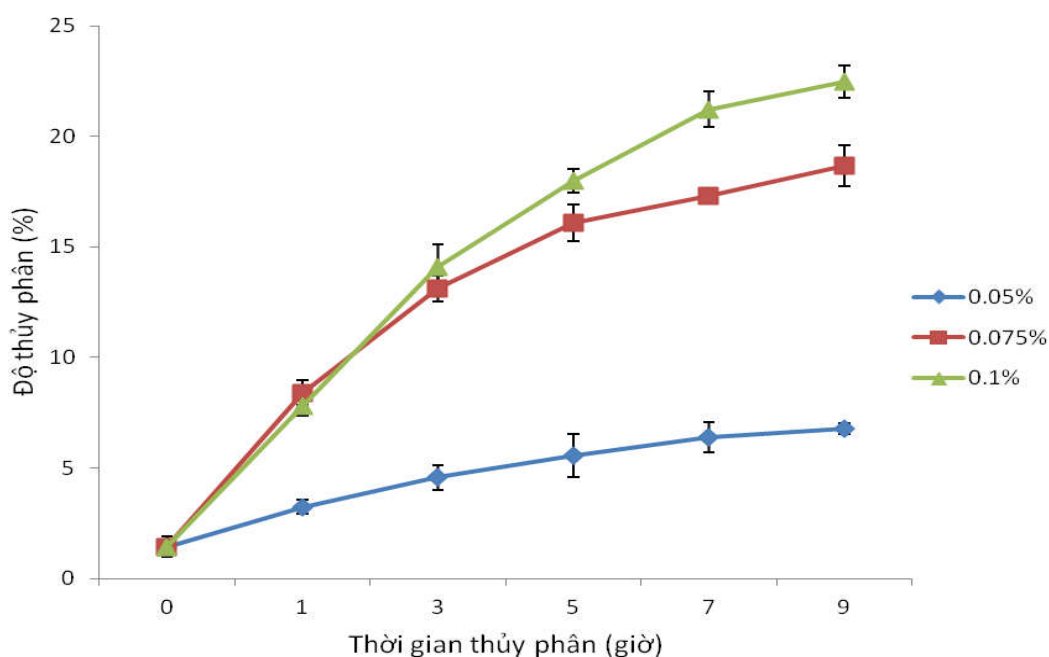
Khi thủy phân ở các pH khác nhau, mức độ thủy phân đạt được ở các mẫu pH 5, 6, 7, 8 lần lượt là 27,79%, 36%, 39,02% và 35,45%. Mức độ thủy phân ở mẫu pH 7 cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với ở pH 5, 6 và 8 sau cùng thời gian. Vì vậy, pH 7 là thích hợp cho sự hoạt động của enzyme neutral với cơ chất là protein thịt cá sấu.

Dựa vào kết quả khảo sát trên, có thể đề xuất điều kiện thủy phân thích hợp cho protein thịt cá sấu bằng enzyme neutral như sau: nhiệt độ thủy phân 60°C, pH 7 và tỷ lệ enzyme 3%.

3.3.1.2 Thủy phân bằng enzyme alcalase

a) Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme alcalase

Thủy phân bằng enzyme alcalase thực hiện ở pH 7,5 và nhiệt độ 52,5°C.



Hình 3.14. Độ thủy phân thịt cá sấu theo thời gian ở các tỉ lệ bổ sung enzyme alcalase khác nhau

Kết quả ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme alcalase đối với mức độ thủy phân được trình bày ở Hình 3.14, cho thấy mức độ thủy phân khi sử dụng enzyme alcalase cũng tăng theo thời gian thủy phân. Độ thủy phân tăng nhanh trong khoảng 5 giờ đầu và có xu hướng tuyến tính trong các giờ thủy phân tiếp theo. Khi tăng tỷ lệ enzyme bổ sung mức độ thủy phân càng cao. Sau 9 giờ thủy phân, độ thủy phân đạt được tương ứng với các mẫu bổ sung 0,05%, 0,075% và 0,1% là 6,77%, 18,66% và 22,48%. Độ thủy phân cao nhất khi tỉ lệ enzyme alcalase bổ sung là 0,1%.

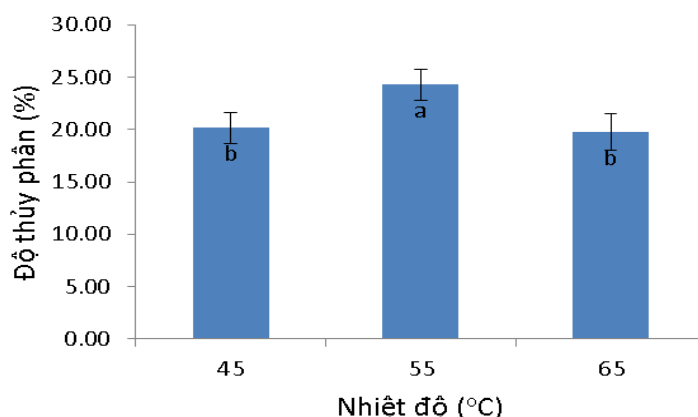
b) Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Quá trình thủy phân được thực hiện với tỉ lệ enzyme alcalase bổ sung 0,1%, pH dịch trước khi đem thủy phân được chỉnh về 7,5 và nhiệt độ được thực hiện tại các mốc 45°C, 55°C và 65°C.

Mức độ thủy phân sau 9 giờ khi thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau được thể hiện trong Hình 3.15.

Từ kết quả phân tích thống kê sau 9 giờ thủy phân và Hình 3.15 cho thấy khi tăng nhiệt độ thủy phân từ 45°C đến 55°C, độ thủy phân tăng từ 20,14% lên 24,26%. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng nhiệt độ lên 65°C mức độ thủy phân lại giảm xuống còn 19,72%. Độ thủy phân sau 9 giờ ở mẫu 55°C cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với độ thủy phân ở các nhiệt độ 45°C và 65°C.

Vì vậy, nhiệt độ 55°C là thích hợp cho enzyme alcalase hoạt động đối với cơ chất là thịt cá sấu.

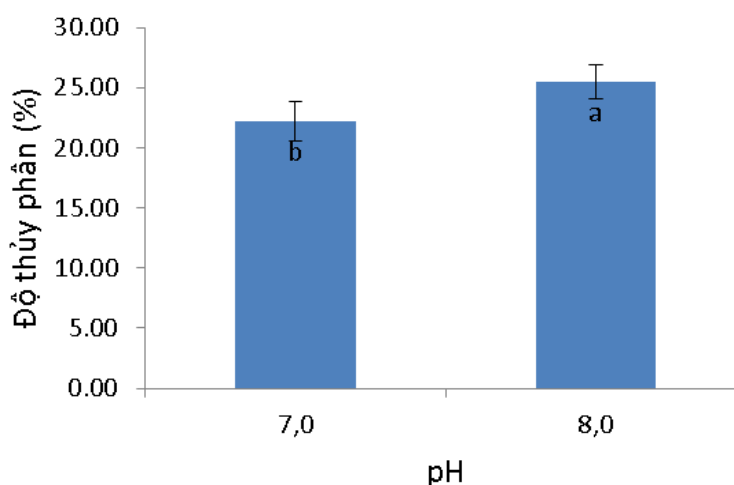


Hình 3.15. Độ thủy phân thịt cá sấu bằng enzyme alcalase ở nhiệt độ khác nhau sau 9 giờ.

Chú thích: Các kí tự (a, b, c) thể hiện sự khác biệt độ thủy phân giữa các nhiệt độ. Các giá trị không có cùng ký tự thì khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95%.

c) Khảo sát ảnh hưởng của pH

Để khảo sát ảnh hưởng của pH, thí nghiệm được thực hiện ở các pH 7 và 8 với nhiệt độ cố định 55°C và tỷ lệ enzyme alcalase 0,1%. Mức độ thủy phân sau 9 giờ khi thực hiện ở các pH khác nhau được thể hiện trong Hình 3.16.



Hình 3.16. Ảnh hưởng của pH đến mức độ thủy phân bằng enzyme alcalase sau 9 giờ
Chú thích: Các kí tự (a, b) thể hiện sự khác biệt độ thủy phân tại các pH khác nhau. Các giá trị không có cùng ký tự thì khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95 %.

Khi thủy phân ở các pH khác nhau, độ thủy phân đạt được cao nhất ở pH 8 (25,52%). Giá trị độ thủy phân này cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với ở pH 7 (22,20%) sau cùng thời gian. Do đó, pH 8 là phù hợp cho hoạt động của enzyme alcalase đối với cơ chất là thịt cá sấu.

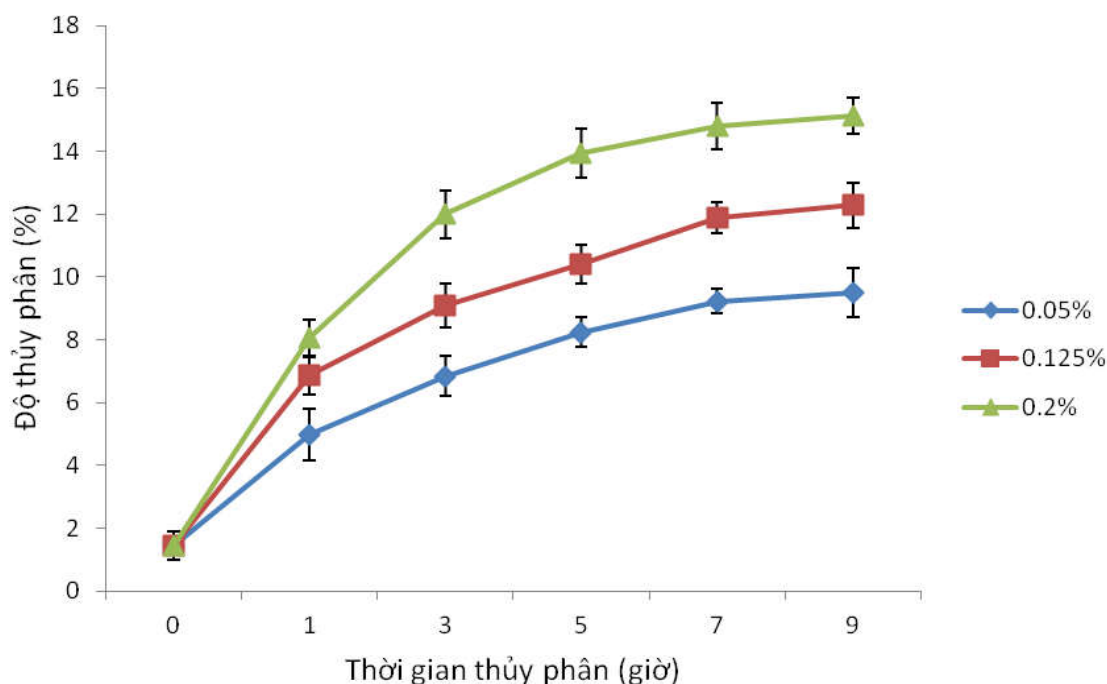
Dựa vào kết quả khảo sát trên, đề xuất điều kiện thủy phân thích hợp cho protein thịt cá sấu bằng enzyme alcalase 2,4L như sau: nhiệt độ thủy phân 55°C, pH 8 và tỷ lệ enzyme 0,1%. Kết quả thăm dò này phù hợp với kết quả tối ưu trong nghiên cứu của Kurozawa và ctv (2008), khi tối ưu hóa thủy phân protein từ thịt gà bằng enzyme alcalase 2,4L cho các điều kiện tối ưu gồm nhiệt độ 52,5°C và pH 8.

3.3.1.3 Thủy phân bằng flavourzyme

a) Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme

Thủy phân bằng enzyme flavourzyme thực hiện ở pH 6 và nhiệt độ 52,5°C.

Kết quả ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme flavourzyme đối với mức độ thủy phân được trình bày ở Hình 3.17.



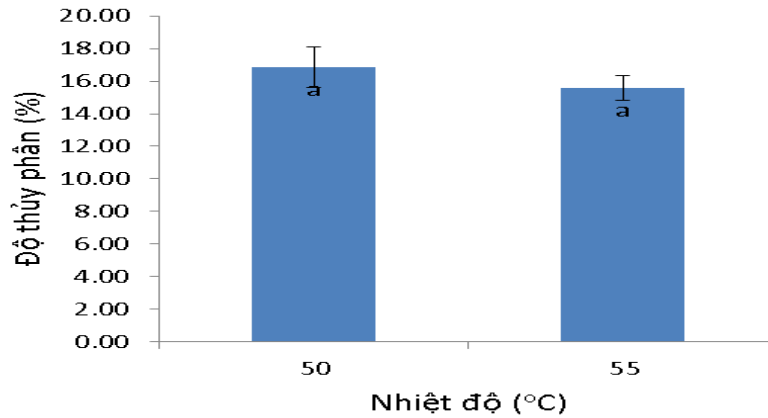
Hình 3.17. Độ thủy phân thịt cá sấu theo thời gian ở các tỉ lệ bổ sung enzyme flavourzyme khác nhau.

Kết quả thí nghiệm Hình 3.17 cho thấy mức độ thủy phân cũng tăng dần theo thời gian thủy phân. Mức độ thủy phân khi sử dụng enzyme flavourzyme tăng đều khi tăng tỷ lệ enzyme từ 0,05% lên 0,2%. Độ thủy phân sau 9 giờ của các mẫu thủy phân ở các mức tỷ lệ E / S 0,05%; 0,125% và 0,2% đạt lần lượt 9,5%; 12,28% và 15,12%. Hiệu quả thủy phân ở mức tỷ lệ E/S 0,2% cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với hai mức tỷ lệ E / S 0,05% và 0,125%.

b) Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Quá trình thủy phân được thực hiện với tỉ lệ enzyme flavourzyme bổ sung 0,2%, dịch trước khi đem thủy phân chỉnh về pH 6 và thực hiện tại 50°C và 55°C.

Mức độ thủy phân sau 9 giờ khi thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau được thể hiện trong Hình 3.18.



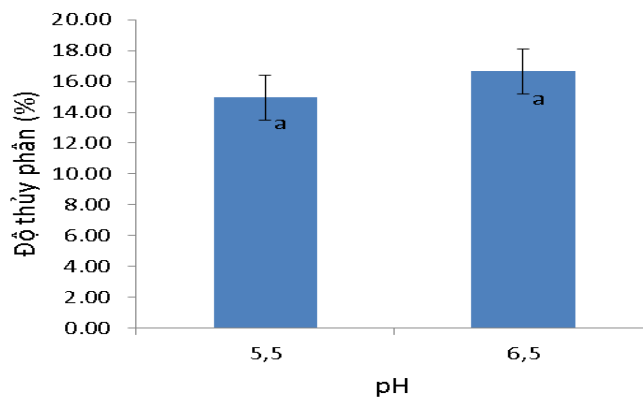
Hình 3.18. Độ thủy phân thịt cá sấu bằng enzyme flavourzyme ở nhiệt độ khác nhau sau 9 giờ

Chú thích: Ký tự a thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa giữa độ thủy phân và các nhiệt độ với độ tin cậy 95%.

Từ kết quả phân tích thống kê sau 9 giờ thủy phân cho thấy khi tăng nhiệt độ thủy phân từ 50°C đến 55°C, độ thủy phân giảm từ 16,86% xuống 15,59%. Độ thủy phân sau 9 giờ ở mẫu 50°C cao hơn và khác biệt không có ý nghĩa so với độ thủy phân ở các nhiệt độ 55°C. Vì vậy, để giảm chi phí, nhiệt độ 50°C là thích hợp cho enzyme flavourzyme hoạt động với độ thủy phân là 16,86% cơ chất là thịt cá sấu.

c) Khảo sát ảnh hưởng của pH

Để khảo sát ảnh hưởng của pH, thí nghiệm được thực hiện ở các pH 5,5 và 6,5 với nhiệt độ cố định 50°C và tỷ lệ enzyme flavourzyme 0,2 %. Mức độ thủy phân sau 9 giờ khi thực hiện ở các pH khác nhau được thể hiện trong Hình 3.19.



Hình 3.19. Ảnh hưởng của pH đến mức độ thủy phân bằng enzyme flavourzyme sau 9 giờ

Chú thích: Kí tự a thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa của độ thủy phân tại các pH khác nhau với độ tin cậy 95 %.

Khi thủy phân ở hai pH khác nhau, độ thủy phân đạt được sau 9 giờ ở pH 6,5 và pH 5,5 lần lượt là 16,64 % và 14,95 %. Giá trị độ thủy phân ở pH 6,5 cao hơn và khác biệt không có ý nghĩa so với ở pH 5,5. Tuy nhiên pH 6,5 gần với pH tự nhiên của dịch thịt cá sấu trước khi thủy phân (6,4). Do đó, pH 6,5 là phù hợp cho hoạt động của enzyme flavourzyme đối với cơ chất là thịt cá sấu.

Dựa vào kết quả khảo sát trên, có thể đề xuất điều kiện thủy phân thích hợp cho protein thịt cá sấu bằng enzyme flavourzyme như sau: nhiệt độ thủy phân 50°C, pH 6,5 và tỷ lệ enzyme 0,2%.

3.3.1.4 So sánh ba loại enzyme

Bảng 3-9. Mức độ thủy phân sau 9 giờ của ba enzyme ở điều kiện thủy phân (tỷ lệ enzyme, nhiệt độ, pH) đã thăm dò

Enzyme	Điều kiện thủy phân			Mức độ thủy phân (%)
	% Enzyme bổ sung	pH	Nhiệt độ (°C)	
Flavourzyme	0,2	6,5	50	16,64 ± 1,45 ^c
Alcalase	0,1	8,0	55	25,52 ± 1,40 ^b
Neutral	3,0	7,0	60	39,02 ± 1,00 ^a

Chú thích: Các kí tự (a, b, c) thể hiện sự khác biệt mức độ thủy phân giữa các enzyme. Các giá trị không có cùng ký tự thì khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95%.

Khi so sánh ba mẫu thủy phân bằng ba enzyme ở điều kiện thủy phân tối ưu đã thăm dò với nhau, Bảng 3-9 cho thấy sau 9 giờ thủy phân thì mức độ thủy phân giữa ba enzyme khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%. Mức độ thủy phân đạt được của từng enzyme flavourzyme, alcalase và neutral lần lượt là 16,64%; 25,52% và 39,02%. Như vậy enzyme neutral có khả năng thủy phân thịt cá sấu cao hơn alcalase hoặc flavourzyme. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của tác giả Fang và ctv (2012) trong nghiên cứu tối ưu hóa sản xuất dịch thủy phân chống oxy hóa từ protein cơ mực. Trong nghiên cứu tác giả thủy phân với năm loại enzyme

protease (pepsin, trypsin, papain, alcalase và flavourzyme). Kết quả cho thấy thủy phân bằng enzyme alcalase cho mức độ thủy phân cao hơn flavourzyme.

Kết quả cho thấy khi sử dụng enzyme flavourzyme, hiệu quả thủy phân thấp nhất sau đó là alcalase và neutral có mức độ thủy phân cao nhất. Enzyme flavourzyme có mức độ thủy phân thấp nhất nên phân cắt các peptide yếu hơn do đó sản phẩm thủy phân có chứa các peptide có khối lượng phân tử lớn, tiếp theo là các peptide của dịch thủy phân bằng alcalase và dịch thủy phân bằng neutral chứa các peptide có khối lượng phân tử nhỏ nhất. Chứng tỏ mức độ thủy phân cao hơn dẫn đến số lượng các peptide phân tử thấp nhiều hơn. Kết quả này phù hợp với kết quả của Mitsuda và cộng sự (1966) trong nghiên cứu hoạt động chống oxy hóa của các hợp chất indole trong suốt quá trình oxy hóa của acid linoleic.

3.3.2 Tối ưu hóa thủy phân protein thịt cá sấu bằng enzyme neutral

Nhằm đánh giá quá trình tối ưu hóa thủy phân protein thịt cá sấu bằng enzyme neutral, phương pháp quy hoạch hóa thí nghiệm với mô hình thiết kế Box- Behnken (BBD – thiết kế thí nghiệm theo mô hình ngẫu nhiên đầy đủ của Box - Behnken) được áp dụng với ba biến X_1 (T), X_2 (pH), X_3 (tỷ lệ enzyme/ cơ chất). Ba yếu tố khảo sát được nghiên cứu ở 3 mức mã hóa (-1, 0, +1) ở Bảng 3-10 và gồm 15 đơn vị thí nghiệm ở Bảng 3-11.

Hàm mục tiêu là mức độ thủy phân, %DH (Y_1) và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH oxy hóa, % DPPH (Y_2).

Bảng 3-10. Các mức thí nghiệm với ba biến X_1 (T), X_2 (pH), X_3 (E/S)

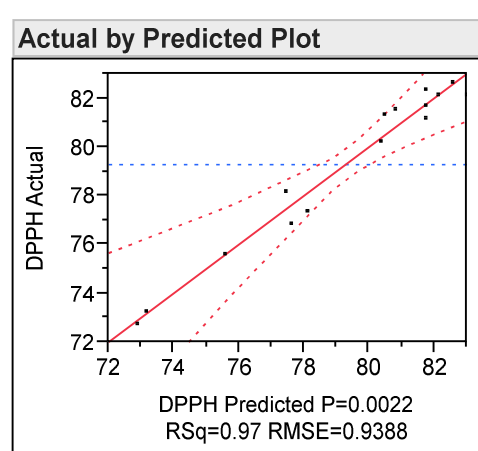
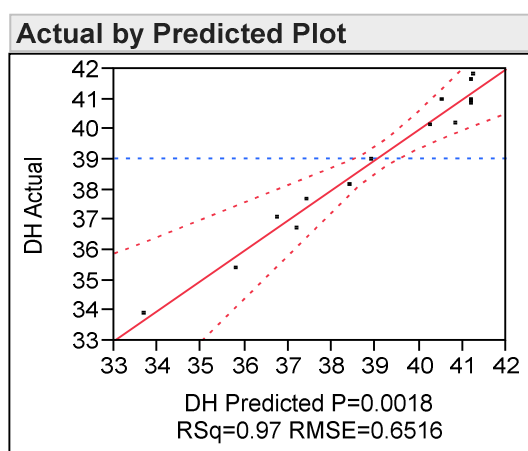
Các biến độc lập	Các giá trị được mã hóa		
	-1	0	1
X_1 : Nhiệt độ (°C)	55	60	65
X_2 : pH	6,5	7	7,5
X_3 : [E] / [S] ^a (%)	2,5	3	3,5

Chú thích: ^a: tỷ lệ giữa khối lượng enzyme trên khối lượng protein trong mẫu.

Bảng 3-11. Bảng bố trí thí nghiệm.

NT	x ₁	x ₂	x ₃	Dạng thức	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂
1	-1	-1	0	--0	55	6,5	3,0	39,23	76,85
2	-1	0	-1	-0-	55	7,0	2,5	37,10	72,47
3	-1	0	1	-0+	55	7,0	3,5	41,06	78,35
4	-1	1	0	--+0	55	7,5	3,0	38,36	73,27
5	0	-1	-1	0--	60	6,5	2,5	37,66	81,31
6	0	-1	1	0+-	60	6,5	3,5	39,32	83,12
7	0	0	0	000	60	7,0	3,0	40,88	81,14
8	0	0	0	000	60	7,0	3,0	41,00	82,34
9	0	0	0	000	60	7,0	3,0	41,67	81,66
10	0	1	-1	0+-	60	7,5	2,5	40,22	75,26
11	0	1	1	0++	60	7,5	3,5	40,64	82,14
12	1	-1	0	+--0	65	6,5	3,0	33,90	80,62
13	1	0	-1	+0-	65	7,0	2,5	36,30	77,38
14	1	0	1	+0+	65	7,0	3,5	35,10	82,70
15	1	1	0	++0	65	7,5	3,0	41,85	81,37

Để đánh giá sự tương tác của các yếu tố nhiệt độ, pH và tỷ lệ enzyme bổ sung đến mức độ thủy phân cũng như hoạt tính bắt giữ gốc DPPH, các giá trị thực nghiệm đã được xử lý thống kê bằng phần mềm JMP 10.0.2 và kết quả được thể hiện ở Hình 3.20.



Summary of Fit		Summary of Fit	
RSquare	0.974612	RSquare	0.972389
RSquare Adj	0.928914	RSquare Adj	0.92269
Root Mean Square Error	0.651643	Root Mean Square Error	0.938804
Mean of Response	39.04067	Mean of Response	79.27667
Observations (or Sum Wgts)	15	Observations (or Sum Wgts)	15

a) Độ thủy phân

b) Hoạt tính bắt giữ gốc DPPH

Hình 3.20. Tương quan của độ thủy phân và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH dự đoán cho quá trình thủy phân.

Độ thủy phân: dựa vào Hình 3.20, giá trị p của mô hình nhỏ hơn 0,05, điều đó chứng tỏ các yếu tố khảo sát có ảnh hưởng đến mức độ thủy phân. Với hệ số tương quan $R^2 = 0,97$ kết luận được mức độ thủy phân lý thuyết và thực nghiệm có sự tương thích với nhau. $R^2_{\text{hiệu chỉnh}} = 0,92$ sai số khá nhỏ khoảng 0,05 so với R^2 nên phương trình hồi quy có độ chính xác khá cao.

Bảng 3-12. Hệ số hồi quy và giá trị p của các chỉ tiêu theo dõi

Thông số	Chỉ tiêu theo dõi			
	Độ thủy phân DH (%)		Hoạt tính bắt giữ gốc DPPH (%)	
	Hệ số hồi quy	Giá trị p	Hệ số hồi quy	Giá trị p
Hằng số	41,18	<0,0001*	81,71	<0,0001*
Bậc 1				
X ₁	-1,08	0,0054*	2,60	0,0005*
X ₂	1,29	0,0025*	-0,10	0,0302*
X ₃	0,60	0,0483*	2,26	0,0010*
Bậc 2				
X ₁ ²	-2,27	0,0011*	-3,14	0,0014*
X ₂ ²	-0,39	0,3059	-0,60	0,2755
X ₃ ²	-1,36	0,0102*	-0,83	0,1490
Tương tác				
X ₁ X ₂	-2,50	0,0006*	1,23	0,0468*

Thông số	Chỉ tiêu theo dõi			
	Độ thủy phân DH (%)		Hoạt tính bắt giữ gốc DPPH (%)	
	Hệ số hồi quy	Giá trị p	Hệ số hồi quy	Giá trị p
X ₁ X ₃	-1,30	0,0103*	-0,02	0,9636
X ₂ X ₃	-0,14	0,6958	1,44	0,0277*

Chú thích: “*” cho biết các yếu tố ảnh hưởng có ý nghĩa ($p < 0,05$)

Hệ số của phương trình hồi quy và các giá trị p tương ứng được trình bày trong Bảng 3-12, từ giá trị p có thể được kết luận rằng các biến nghiên cứu độc lập (X_1 , X_2 , X_3) và bậc hai (X_1^2 , X_2^2 , X_3^2) có ảnh hưởng đến độ thủy phân. Về tương tác giữa các yếu tố, có ảnh hưởng của sự tương tác giữa nhiệt độ - pH và nhiệt độ - tỷ lệ enzyme lên mức độ thủy phân. Trong các biến ảnh hưởng trên, sự tương tác giữa nhiệt độ và pH có ảnh hưởng mạnh nhất lên mức độ thủy phân.

Hoạt tính bắt giữ gốc DPPH: giá trị p của mô hình nhỏ hơn 0,05, chứng tỏ các yếu tố khảo sát có ảnh hưởng đến hoạt tính bắt giữ gốc DPPH. Dựa vào giá trị p Bảng 3-12 cho thấy các biến độc lập (X_1 , X_2), bậc hai (X_1^2) có ảnh hưởng đến hoạt tính bắt giữ gốc DPPH và có ảnh hưởng của sự tương tác giữa nhiệt độ - pH và pH - tỷ lệ enzyme đến hoạt tính bắt giữ gốc DPPH. Nhiệt độ có ảnh hưởng mạnh nhất lên hoạt tính bắt giữ gốc DPPH.

Từ những biện luận trên cho thấy cả ba yếu tố khảo sát nhiệt độ, pH và tỷ lệ enzyme đều có ảnh hưởng đến độ thủy phân và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH. Qua Bảng 3.3, mô hình các đáp ứng mức độ thủy phân và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH được xác định bằng các phương trình mã hóa như sau:

$$\text{Mức độ thủy phân: } Y_1 = 41,18 - 1,08X_1 + 2,29X_2 + 0,6X_3 - 2,27 X_1^2 - 1,36 X_3^2 + 2,5X_1X_2 - 1,3X_1X_3.$$

$$\text{Hoạt tính bắt giữ gốc DPPH: } Y_2 = 81,71 + 2,6X_1 - 0,1X_2 + 2,26X_3 - 3,14X_1^2 + 1,23X_1X_2 + 1,44X_2X_3.$$

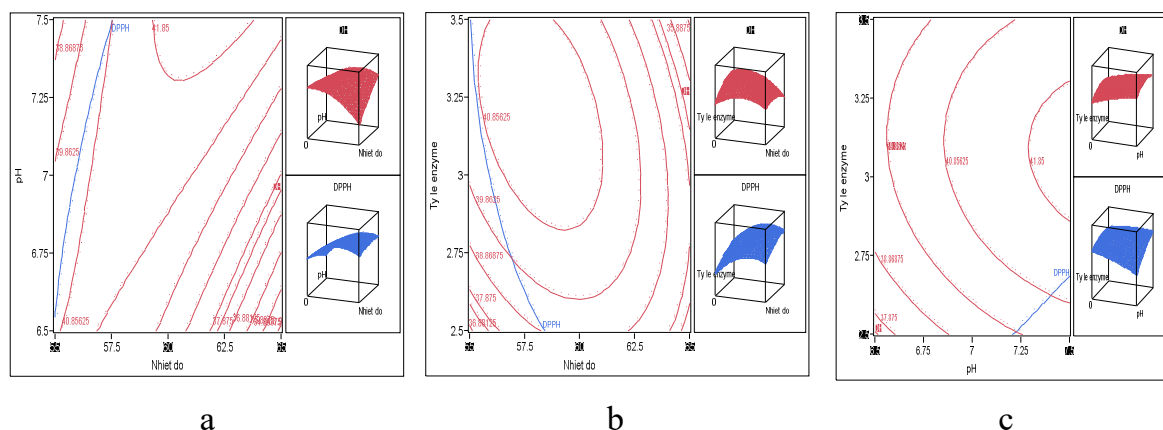
Hình 3.21 và Hình 3.22 cho thấy các bề mặt đáp ứng với những đường tròn đồng tâm tối ưu cho biết sự ảnh hưởng qua lại giữa hai yếu tố khảo sát. Những số này

thể hiện sự tương tác giữa 2 biến độc lập, trong đó biến thứ 3 được duy trì tại các mức trung tâm.

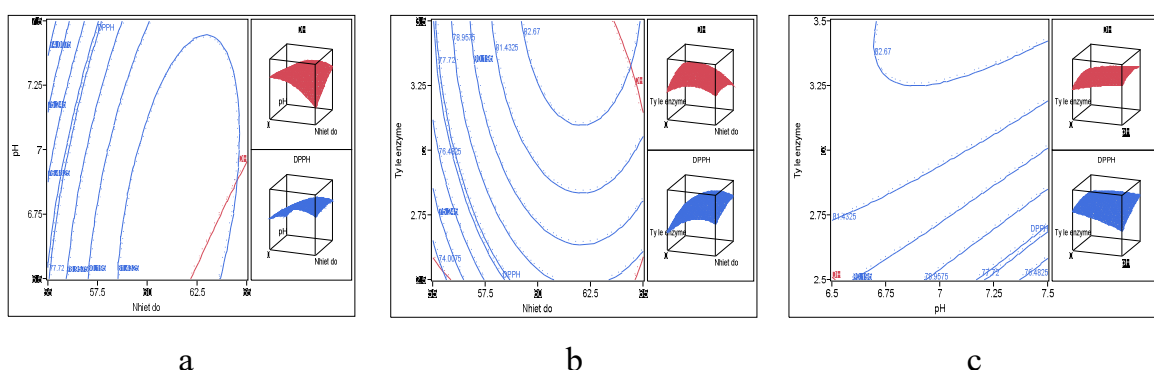
Trong Hình 3.21 (a, b) và Hình 3.22 (a, b) có thể thấy tương tác giữa nhiệt độ và các biến phụ thuộc. Mức độ thủy phân và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH đạt cao nhất khoảng nhiệt độ 60 - 62,5°C. Ở mức nhiệt độ cao hơn, có sự giảm mức độ thủy phân do cấu trúc protease của enzyme bị biến tính làm giảm hoạt độ của enzyme. Kết quả tương tự đã được tìm thấy trong các nghiên cứu thủy phân của một số nguồn protein thực phẩm như cá hồi (Liaset và ctv, 2002) và cá catla (Bhaskar và ctv, 2008).

Trong Hình 3.21 (a, c) và Hình 3.22 (a, c) mức độ thủy phân và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH cao thu được tại các giá trị pH lớn hơn 7.

Phân tích Hình 3.21 (b, c) và Hình 3.22 (b, c) ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme/ cơ chất trên các đáp ứng cho thấy khi tăng nồng độ enzyme dẫn đến mức độ thủy phân và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH cao hơn. Khi nồng độ enzyme cao, có nhiều enzyme kết hợp với cơ chất nên phân cắt các liên kết peptide nhiều hơn và do đó sự hòa tan của các protein lớn hơn. Kết quả tương tự đã được tìm thấy trong nghiên cứu thủy phân protein từ thịt gà (Kurozawa và ctv, 2008).

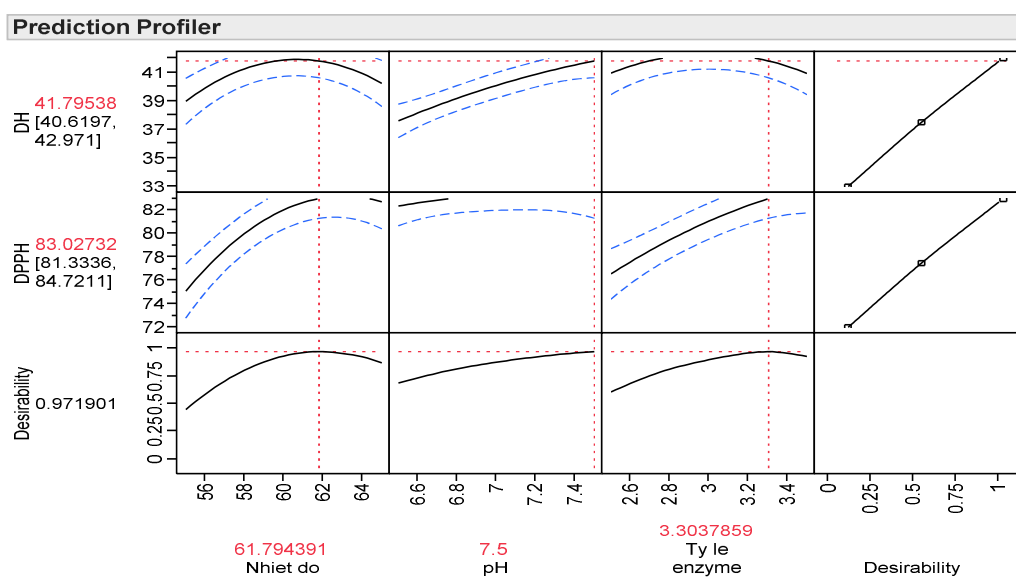


Hình 3.21. Ảnh hưởng của a) nhiệt độ và pH; b) nhiệt độ và tỷ lệ enzyme; c) pH và tỷ lệ enzyme lên độ thủy phân



Hình 3.22. Ảnh hưởng của a) nhiệt độ và pH; b) nhiệt độ và tỷ lệ enzyme; c) pH và tỷ lệ enzyme lên hoạt tính bắt giữ gốc DPPH

Dựa vào những biện luận trên, có thể thấy rằng các thông số nhiệt độ, pH và tỷ lệ enzyme/ cơ chất có tác động qua lại với nhau và ảnh hưởng lên từng đáp ứng. Đối với quá trình thủy phân, kết quả mong đợi là đạt được mức độ thủy phân cao. Tuy nhiên, sản phẩm thu được cũng cần có hoạt tính sinh học cao. Vì vậy cần lựa chọn điều kiện thủy phân thích hợp để mang lại hiệu quả cao nhất. Hiệu quả thủy phân cao khi mức độ thủy phân và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH cao. Bằng phần mềm xử lý, có thể đề xuất điều kiện thủy phân để đạt các giá trị tối ưu cho đồng thời các đáp ứng mức độ thủy phân và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH như sau: pH 7,5; nhiệt độ 61,8°C và tỷ lệ enzyme 3,3%, khi đó mức độ thủy phân đạt 41,80%, hoạt tính bắt giữ gốc DPPH đạt 83,03% (Hình 3.23).



Hình 3.23. Chế độ thủy phân tối ưu cho protein từ thịt cá sấu

Để kiểm chứng lại giá trị tối ưu cho quá trình thủy phân theo mô hình dự đoán, thí nghiệm xác minh đã được thực hiện 3 lần với các điều kiện được dự đoán như trên. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong Bảng 3-13.

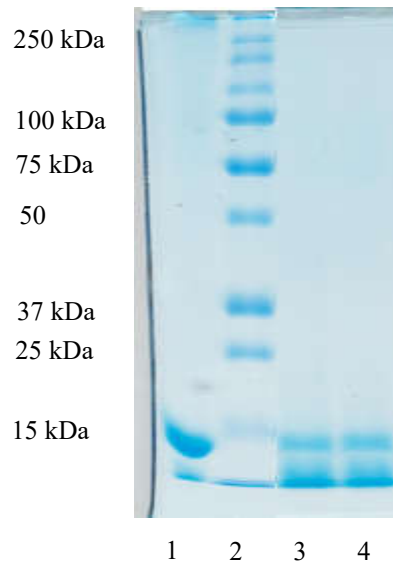
Bảng 3-13. Kết quả dự đoán và thực tế các đáp ứng theo dõi

Đáp ứng	Dự đoán	Kiểm chứng	Sai số (%)
Mức độ thủy phân %	41,80	39,70 ± 2,74	5,02
Hoạt tính bắt giữ gốc DPPH %	83,03	80,0 ± 2,15	3,65

Kết quả giữa giá trị dự đoán và giá trị thực nghiệm như Bảng 3-13. Theo mô hình, kết quả dự đoán về mức độ thủy phân protein là 41,80% và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH 83,03%, gần với kết quả thu được dưới điều kiện tối ưu (mức độ thủy phân 39,70% và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH 80%). Vì vậy, đã có một sự phù hợp giữa kết quả dự đoán và kết quả thử nghiệm với sai số tương đối trung bình 5,02% và 3,65% tương ứng cho mức độ thủy phân và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH.

Tỉ lệ thu hồi nitơ của sản phẩm dịch thủy phân thu được đạt 82,92%. Kết quả này tương tự kết quả của Nguyễn Thị Mỹ Hương (2012) trong nghiên cứu sản xuất sản phẩm thủy phân protein từ đầu cá ngừ vây vàng bằng protease (85,1%).

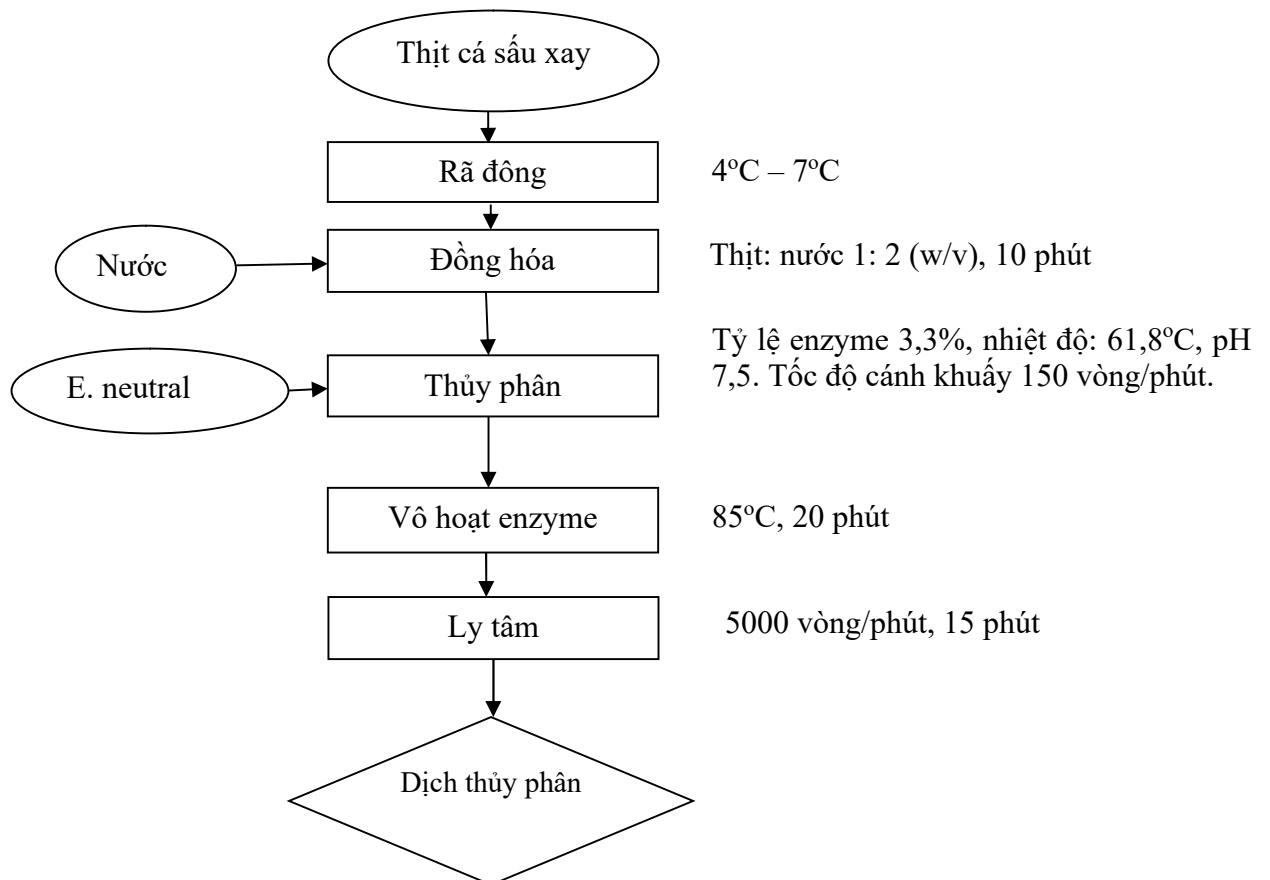
Bên cạnh mức độ thủy phân, khối lượng các phân tử peptit trong các mẫu thủy phân là một tiêu chí quan trọng nhằm đánh giá hiệu quả thủy phân của enzyme. Sự phân bố các peptit với các khối lượng khác nhau như Hình 3.24. Cho thấy dịch thịt cá sấu ban đầu chưa thủy phân có khối lượng phân tử hầu hết trên 250 kD. Sau thủy phân, các peptide trong dịch thu được có khối lượng phân tử thấp dưới 15 kD.



Hình 3.24. Hình ảnh điện di dịch trước và sau thủy phân

1) Dịch trước khi thủy phân 2) Maker (10 – 250 kDa) 3), 4) Dịch sau thủy phân

3.3.3 Hoàn thiện quy trình thủy phân protein từ thịt cá sấu



Hình 3.25. Sơ đồ qui trình thủy phân protein từ thịt cá sấu hoàn thiện

3.4 Nghiên cứu sấy phun dịch protein thịt cá sấu thủy phân thành bột

3.4.1 Khảo sát ảnh hưởng của maltodextrin đến hiệu suất thu hồi chất khô, protein và các đặc tính của bột sấy phun

Kết quả xử lý số liệu thống kê cho thấy việc bổ sung maltodextrin vào dịch thủy phân protein có ảnh hưởng đến các chỉ tiêu chất lượng của bột và hiệu suất thu hồi của quá trình sấy phun với độ tin cậy 95% ($p < 0,05$).

Bảng 3-14 Ảnh hưởng của nồng độ maltodextrin đến việc thu hồi chất khô, thu hồi protein, tổng hàm lượng protein và độ ẩm của bột sấy phun

Nồng độ maltodextrin(% w/w)	Hiệu suất thu hồi chất khô (%)	Độ ẩm (%w/w)	Tổng protein (% w/w)	Hiệu suất thu hồi protein (%)
0	60,38±1,11 ^a	7,57±0,08 ^d	91,74±0,08 ^a	67,68±1,34 ^a
10	62,52±1,02 ^b	6,56±0,09 ^c	54,42±0,55 ^b	82,68±2,12 ^b
20	68,67±0,75 ^c	4,82±0,09 ^b	30,82±0,49 ^c	82,23±0,45 ^c
30	69,15±0,39 ^c	4,77±0,04 ^b	21,36±0,43 ^c	85,74±1,30 ^c
40	73,08±0,23 ^d	4,28±0,05 ^a	12,8±0,54 ^b	77,95±3,45 ^b

Giá trị là trung bình ± độ lệch chuẩn của các mẫu. Các giá trị có chỉ số trên khác nhau trong cột là khác nhau đáng kể (Tukey's test, $p < 0,05$).

Khi sấy phun với hàm lượng 0% maltodextrin thì hiệu suất thu hồi bột của quá trình sấy phun đạt $60,38 \pm 1,11\%$ và hiệu suất thu hồi protein đạt $67,68 \pm 1,34\%$ (Bảng 3-14). Khi bổ sung maltodextrin thì hiệu suất thu hồi chất khô và hiệu suất thu hồi protein đã tăng lên. Sự tăng của hiệu suất thu hồi chất khô là tuyến tính với sự tăng của hàm lượng maltodextrin bổ sung. Trong khi đó, sự gia tăng của hiệu suất thu hồi protein là không tuyến tính.

Hiệu suất thu hồi chất khô và hiệu suất thu hồi protein tăng với các mức hàm lượng bổ sung maltodextrin 10%, 20%, 30%. Kết quả xử lý thống kê đối với hiệu suất thu hồi chất khô giữa các mức 20% và 30% cho thấy sự khác biệt là không có ý nghĩa thống kê. Với mức bổ sung maltodextrin 40%, hiệu suất thu hồi chất khô là cao nhất $73,08 \pm 0,23\%$. Trong khi hiệu suất thu hồi protein đạt $77,95 \pm 3,45\%$ đã giảm so với các mức hàm lượng bổ sung trước đó. Tuy nhiên hiệu suất vẫn cao hơn so với khi không bổ sung maltodextrin. Hiệu suất thu hồi protein đạt cao nhất là $85,74 \pm$

1,30% với mức hàm lượng maltodextrin 30%. Với mức maltodextrin 20% hiệu suất thu hồi protein lần lượt đạt $82,23 \pm 0,45\%$ nhưng sự khác biệt về hiệu suất thu hồi protein là không có ý nghĩa thống kê giữa các mức hàm lượng maltodextrin 20% và 30%. Theo Kurozawa và ctv (2009), khi sấy phun dịch thủy phân protein từ thịt gà, sự khác biệt về hiệu suất thu hồi chất khô khi tỷ lệ bổ sung maltodextrin so với hàm lượng vật chất khô trong dịch nguyên liệu lần lượt là 2:1 và 3:1 thì không có ý nghĩa thống kê. Nhận xét này tương đồng với hiệu suất thu hồi chất khô ở các mức maltodextrin 20% và 30%.

Việc bổ sung maltodextrin vào dịch sấy phun giúp làm tăng hiệu suất thu hồi chất khô và hiệu suất thu hồi protein. Điều này phù hợp với các kết quả nghiên cứu của Chegini và Ghobadian (2005), Goula và Adamopoulos (2008), Kurozawa và ctv (2009). Maltodextrin khi được bổ sung vào sẽ liên kết với các thành phần vật chất khô trong dịch thủy phân giúp làm tăng nhiệt độ hóa gương (T_g) của khối nguyên liệu, giảm sự chênh lệch giữa nhiệt độ hóa gương các phân tử trong buồng sấy phun với nhiệt độ của không khí sấy. Kết quả là giúp giảm hiện tượng bám dính, cải thiện hiệu suất thu hồi chất khô và hiệu suất thu hồi protein. Nhiệt độ hóa gương của khối nguyên liệu tăng theo sự tăng của hàm lượng maltodextrin bổ sung.

Khi thêm quá nhiều maltodextrin thì hàm lượng vật chất khô trong dịch sẽ tăng cao, độ nhớt của dịch nguyên liệu tăng. Do đó một số loại peptit sẽ gây tắc nghẽn, cản trở sự phun của hệ thống vòi phun và làm giảm hiệu suất của quá trình sấy phun. Khi tiến hành thí nghiệm ở mức hàm lượng maltodextrin 40%, quá trình sấy phun cho thấy hiện tượng vòi phun bị nghẽn, quá trình phun tạo hạt rất khó khăn. Ở mức bổ sung maltodextrin 40%, hiệu suất thu hồi bột và protein cao hơn mẫu maltodextrin 0%, tuy nhiên khối lượng bột thu được là ít hơn nhiều so với lượng vật chất khô ban đầu có trong dịch nguyên liệu và hàm lượng protein trong mẫu bột cũng thấp hơn các mức bổ sung maltodextrin 10%, 20%, 30%.

Âm độ của các mẫu bột sấy giảm khi tăng hàm lượng maltodextrin bổ sung. Kết quả này tương tự với các kết quả của Goula và Adamopoulos (2008). Maltodextrin có tính hút ẩm kém, do vậy giúp làm ẩm độ của mẫu bột sấy. Khả năng hút ẩm và độ tái

hòa tan của các mẫu bột phụ thuộc vào ẩm độ và thành phần của mẫu bột. Các mẫu bột có nhiều maltodextrin thì khả năng hút ẩm và độ tái hòa tan thấp. Khi sấy phun với hàm lượng maltodextrin 0%, ẩm độ của mẫu là cao nhất $7,57 \pm 0,08\%$,

Ẩm độ của các mẫu bột hàm lượng maltodextrin 20%, 30%, 40% đều thấp hơn 5%. Kết quả xử lý thống kê cho sự khác biệt về ẩm độ, của các mẫu bột ở các mức maltodextrin 20% và 30% là không có ý nghĩa thống kê. Khả năng hút ẩm và độ tái hòa tan của các mẫu bột khi bổ sung maltodextrin là thích hợp cho các sản phẩm bột sấy phun.

Như vậy, tổng hợp các kết quả phân tích thống kê về hiệu suất thu hồi chất khô, hiệu suất thu hồi protein và các chỉ tiêu chất lượng của bột. Hàm lượng bổ sung maltodextrin 20% được lựa chọn để tiến hành cho các thí nghiệm khảo sát nhiệt độ, tốc độ bơm và thí nghiệm tối ưu.

3.4.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ không khí sấy đến hiệu suất thu hồi chất khô, protein và đặc tính của bột sấy phun

Theo Chegini và Ghobadian (2005), nhiệt độ không khí sấy ảnh hưởng đến các tính chất vật lý của bột như ẩm độ, độ hút ẩm, tỷ trọng và kích thước hạt. Nhiệt độ sấy phun thường 120 - 220°C. Khi tốc độ bơm dòng nhập liệu không thay đổi, sự tăng nhiệt độ không khí sấy sẽ giúp làm giảm độ ẩm của bột sấy. Kết quả này được ghi nhận từ nhiều nghiên cứu quá sấy phun các loại dịch quả khác nhau của Quek và ctv (2007), Goula và Adamopoulos (2008), Tonon và ctv (2008), Tonon và ctv (2011), Jittanit và ctv (2010). Nhiệt độ tăng giúp cho quá trình trao đổi nhiệt diễn ra nhanh nên sẽ làm giảm ẩm độ của bột.

Trong thí nghiệm này hàm lượng maltodextrin và tốc độ bơm dòng nhập liệu được giữ cố định, khi tăng nhiệt độ không khí sấy thì ẩm độ của các mẫu bột thu được giảm dần. Sự khác biệt về ẩm độ giữa các mẫu bột là có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$). Khi sấy ở nhiệt độ 160°C, độ ẩm của mẫu là $4,35 \pm 0,04\%$. Độ ẩm của bột giảm khi nhiệt độ tăng. Điều này có thể do nhiệt độ không khí đầu vào cao hơn dẫn đến truyền nhiệt nhanh hơn giữa dịch thủy phân protein và không khí làm khô.

Sự gia tăng của gradien nhiệt độ giữa dịch thủy phân protein và không khí làm khô có thể tạo ra động lực cho sự bay hơi nước (Theo Shabde và Hoo, 2008).

Nhiệt độ không khí sấy cũng ảnh hưởng đến tính hút ẩm của bột (Tonon và ctv, 2008). Các mẫu được sấy với nhiệt độ không khí sấy cao hơn sẽ hút ẩm tốt hơn do độ ẩm trong bột thấp. Kết quả tương tự với nghiên cứu của Goula và ctv (2005) khi sấy phun dịch cà chua. Độ hút ẩm của mẫu khi sấy ở nhiệt độ 160°C là $16,49 \pm 0,40\%$. Mặc dù sự khác biệt về ẩm độ của bột là có ý nghĩa thống kê và giá trị độ ẩm của mẫu bột khi sấy ở 160°C là thấp nhất, tuy nhiên sự khác biệt về độ hút ẩm khi sấy ở nhiệt độ 150°C và 160°C là không có ý nghĩa thống kê. Theo Tonon và ctv (2008), Nijdam và ctv (2006), khi nhiệt độ không khí sấy cao sự thoát ẩm trên bề mặt các hạt diễn ra nhanh, do đó sẽ làm cho bề mặt các hạt trở nên khô cứng. Lớp vỏ bề mặt này sẽ cản trở sự thoát ẩm của bên trong hạt cũng như sự hút ẩm lại từ môi trường bên ngoài. Như vậy, dù độ ẩm của mẫu bột ở hai mức nhiệt độ 150°C và 160°C có sự khác biệt, nhưng do khi sấy ở nhiệt độ 160°C lớp bề mặt hạt bột khô cứng ngăn cản một phần sự hút ẩm trở lại nên khả năng hút ẩm giữa hai mẫu trên không có sự khác biệt.

Bảng 3-15. Ảnh hưởng của nhiệt độ không khí sấy đến hiệu suất thu hồi chất khô, protein, tổng protein, độ ẩm và khả năng kháng oxy hóa của bột sấy phun

Nhiệt độ (°C)	Hiệu suất thu hồi của chất khô (%)	Độ ẩm (% w/w)	Protein tổng (% w/w)	Hiệu suất thu hồi của protein (%)	Độ hút ẩm (%)	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)
130	59,92±0,58 ^a	6,72±0,11 ^d	24,52±0,66 ^c	59,27±0,95 ^a	13,98 ± 0,07 ^b	4,134±0,056 ^b
140	66,27±0,58 ^b	5,49±0,15 ^c	30,01±0,30 ^b	77,76±0,26 ^b	14,64 ± 0,16 ^b	3,548±0,193 ^c
150	69,06±0,24 ^c	4,77±0,13 ^b	30,77±0,45 ^b	82,46±1,12 ^c	16,23 ± 0,85 ^a	3,819±0,033 ^c
160	69,65±0,64 ^c	4,35±0,04 ^a	21,42±0,37 ^a	57,64±1,23 ^a	16,49 ± 0,40 ^a	3,813±0,151 ^d

Giá trị là trung bình ± độ lệch chuẩn của các mẫu. Các giá trị có chỉ số trên

khác nhau trong cột là khác nhau đáng kể (Tukey's test, p < 0,05)

Hiệu suất thu hồi chất khô và protein tăng khi nhiệt độ không khí sấy tăng. Hiệu suất thu hồi chất khô $69,06 \pm 0,24\%$ và hiệu suất thu hồi protein $82,46 \pm 1,12\%$

được ghi nhận khi sấy ở nhiệt độ sấy 150°C là cao nhất. Tuy nhiên sự khác biệt về hiệu suất thu hồi protein khi sấy với nhiệt độ 140°C và 150°C là không có ý nghĩa thống kê. Khi tăng nhiệt độ đến 160°C, hiệu suất thu hồi protein giảm. Đó là do tính hút ẩm của các peptit phân tử thấp hơn so với các hợp chất maltodextrin. Ảnh hưởng của nhiệt độ không khí sấy đến hiệu suất của quá trình sấy phun đã được nghiên cứu bởi Tonon và ctv (2008). Nhiệt độ không khí sấy càng cao khi hàm lượng maltodextrin không đổi sẽ làm tăng sự chênh lệch giữa nhiệt độ hóa gương của các hạt ẩm và nhiệt độ không khí sấy. Ngoài ra, theo Chegini và Ghobadian (2007), Dolinsky và ctv (2000), việc tăng nhiệt độ không khí sấy gây ra sự nóng chảy của bột, làm các hạt bám dính vào thành buồng sấy và tính nhạy cảm với nhiệt của protein do đó làm giảm hiệu suất thu hồi.

Hoạt tính kháng oxy hóa của mẫu bột được xác định bằng phương pháp ABTS và thể hiện qua giá trị IC_{50} . Kết quả xử lý cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hoạt tính kháng oxy hóa của các mẫu bột khi tăng nhiệt độ sấy và so với mẫu dịch thủy phân (Bảng 3-15). Khi tăng nhiệt độ sấy, hoạt tính kháng oxy hoá của các mẫu bột giảm dần và có khác biệt, tuy nhiên sự khác biệt này là không lớn và hoạt tính kháng oxy hoá của các mẫu bột vẫn khá cao thông qua giá trị IC_{50} .

IC_{50} của bột thu được ở 140°C, 150°C và 160°C đều thấp hơn ở 130°C. Do đó, khả năng kháng oxy hóa của bột ở các nhiệt độ này cao hơn khả năng chống oxy hóa của mẫu ở 130°C. Khả năng kháng oxy hóa của quá trình thủy phân protein phụ thuộc vào hàm lượng amino acid của nó. Như vậy, các amino acid của mẫu bột ở 140°C, 150°C và 160°C có khả năng kháng oxy hóa cao so với các amino acid của mẫu bột ở 130°C. Bên cạnh đó, hàm lượng protein của bột ở 140°C và 150°C cao hơn hàm lượng protein ở 130°C.

Nhiệt độ không khí sấy tăng thì hoạt tính sinh học của các chất dễ bị biến đổi và hao hụt sau khi sấy. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Quek và ctv (2007), Goula và Adamopoulos (2008), Tonon và ctv (2008)

Như vậy tổng hợp các kết quả phân, khi sấy phun ở nhiệt độ 140°C mẫu bột thu được có hoạt tính kháng oxy hoá tốt nhất. Độ ẩm, tốc độ hút ẩm và hiệu suất thu hồi

của quá trình sấy phun đều tốt hơn so với các mức nhiệt độ sấy phun khác nên nhiệt độ 140°C được chọn để tiến hành thí nghiệm tối ưu.

3.4.3 Ảnh hưởng của tốc độ dòng nhập liệu đến hiệu suất thu hồi chất khô, protein và các đặc tính của bột sau sấy phun

Trong cùng điều kiện nhiệt độ không khí sấy và hàm lượng chất trợ sấy, kết quả khảo sát tốc độ bơm dòng nhập liệu cho thấy ẩm độ và tính hút ẩm của các mẫu bột khi sấy với tốc độ bơm nhanh là cao hơn so với các mẫu sấy với tốc độ bơm chậm. Theo Chegini và Ghobadian (2005), tốc độ bơm dòng nhập liệu có ảnh hưởng đến độ ẩm, đặc tính hút ẩm, kích thước hạt bột sấy phun. Khi dòng nguyên liệu được bơm với tốc độ chậm, các hạt ẩm được vòi phun phân tán có kích thước nhỏ, thời gian để các hạt tiếp xúc với không khí sấy lâu hơn nên quá trình trao đổi ẩm tốt hơn, kết quả là bột sấy có độ ẩm thấp và tính hút ẩm mạnh hơn. Hiệu suất thu hồi bột cũng tốt hơn do mật độ các hạt trong buồng sấy thấp nên hạt ít bị kết dính lại với nhau sau quá trình phun và sự dính bám vào thành buồng sấy cũng giảm.

Khi tăng tốc độ bơm dòng nhập liệu, các hạt được phun ra nhanh, liên tục và nhiều hơn. Mật độ các hạt ẩm trong buồng sấy tăng lên làm cho quá trình trao đổi ẩm kém hơn, kết quả là các hạt có độ ẩm cao hơn. Mật độ các hạt trong buồng sấy quá dày làm cho các hạt dễ kết dính lại với nhau, điều này gây nên sự gia tăng kích thước hạt, đồng thời các hạt cũng dễ dàng dính bám vào thành buồng sấy nên hiệu suất thu hồi bột thấp hơn so với khi sấy với tốc độ bơm chậm.

Bảng 3-16. Ảnh hưởng của dòng nhập liệu đến hiệu suất thu hồi chất khô, protein, protein tổng, độ ẩm của bột sấy phun

Tốc độ bơm (mL.min ⁻¹)	Hiệu suất thu hồi chất khô (%)	Ẩm độ (% w/w)	Protein tổng (% w/w)	Hiệu suất thu hồi protein (%)
5	68,92±0,76 ^b	4,82±0,04 ^a	29,31±0,43 ^b	78,4±1,54 ^b
10	67,91±0,27 ^b	4,93±0,03 ^a	29,34±0,64 ^b	77,35±1,83 ^b
15	67,15±0,80 ^b	5,20±0,09 ^b	29,32±0,34 ^b	76,68±1,68 ^b
20	50,44±0,76 ^a	5,98±0,03 ^c	21,22±0,32 ^a	42,03±1,20 ^a

Giá trị là trung bình \pm độ lệch chuẩn của các mẫu. Các giá trị có chỉ số trên khác nhau trong cột là khác nhau đáng kể (Tukey's test, $p < 0,05$)

Kết quả phân tích cho thấy sự khác biệt về hiệu suất thu hồi chất khô và hiệu suất thu hồi protein của các mức tốc độ bơm 15 và 20 ml.phút⁻¹, không có ý nghĩa về mặt thống kê nhưng có ảnh hưởng đến quá trình sấy phun của dịch thủy phân (Bảng 3-16). Điều này là do dung dịch khi bị bơm ở tốc độ cao không được phun ra trước khi vào buồng sấy. Do đó độ ẩm của bột tăng lên đáng kể do sự truyền nhiệt và khối lượng thấp (Samborska và ctv, 2015).

Khả năng thu hồi chất khô ngày càng giảm do các thành phần chất khô bị kẹt trong buồng sấy, đặc biệt là các peptit phân tử thấp có giá trị hút ẩm cao. Tổng hàm lượng Protein tổng và hiệu suất thu hồi của protein cũng có xu hướng tương tự. Tuy nhiên, theo Tukey, ngoại trừ độ ẩm, kết quả của các thông số còn lại khác nhau không đáng kể ở ba mức tốc độ dòng 5, 10, 15 ml.phút⁻¹. Dựa trên giá trị của độ ẩm, hai mức tốc độ dòng cấp, 5 mL.phút⁻¹ và 10 mL.phút⁻¹ là phù hợp cho thí nghiệm tiếp theo. Tuy nhiên, vì 10 mL.min⁻¹ có thời gian làm khô ngắn hơn, nên nó đã được chọn cho thí nghiệm tiếp theo.

3.4.4 Tối ưu hóa các điều kiện sấy phun để đạt hiệu suất thu hồi chất khô và protein cao nhất, hàm lượng ẩm thấp nhất

Hiệu suất thu hồi chất khô, hiệu suất thu hồi protein, độ ẩm và hoạt tính kháng oxy hóa lần lượt được mô hình hóa là hàm số của 2 yếu tố “hàm lượng maltodextrin, nhiệt độ không khí sấy” bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Sử dụng phần mềm JMP 11 để xử lý số liệu, xác định các điều kiện tối ưu cho quá trình sấy phun và tìm được giá trị hiệu suất thu hồi bột, thu hồi protein, độ ẩm và hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất có thể đạt được.

Bảng 3-17. Ảnh hưởng của nhiệt độ không khí sấy và nồng độ maltodextrin đến hiệu suất thu hồi chất khô, protein, độ ẩm của bột sấy phun

No	Mã hóa	Nhiệt độ không khí sấy (°C) x ₁	Nồng độ maltodextrin (%) x ₂	Hiệu suất thu hồi chất khô (%) y ₁	Hiệu suất thu hồi protein tổng (%) y ₂	Độ ẩm (%) y ₃	Hoạt tính kháng oxy hóa (mg.mL ⁻¹) y ₄
1	a0	133	20	59,28	64,31	6,57	2,77
2	--	135	19	60,25	57,37	6,27	2,57
3	-+	135	21	57,74	61,90	6,64	2,38
4	0a	140	18,6	62,72	60,42	5,31	2,02
5	00	140	20	67,82	76,51	5,29	1,95
6	00	140	20	67,55	75,63	5,33	2,02
7	00	140	20	67,33	78,61	5,35	1,85
8	00	140	20	67,76	75,97	5,49	2,12
9	00	140	20	67,57	76,40	5,44	2,15
10	0A	140	21,4	58,42	57,84	6,04	2,56
11	+-	145	19	72,39	78,46	5,92	1,87
12	++	145	21	59,84	54,97	6,05	2,35
13	A0	147	20	64,27	63,79	5,58	2,11

Theo kết quả hiệu suất thu hồi chất khô, protein, độ ẩm và hoạt tính kháng oxy hóa thực tế và lý thuyết do mô hình dự đoán có sự tương thích với nhau với độ tin cậy 95%. Các giá thực tế của thí nghiệm khá gần với giá trị lý thuyết được mô hình dự đoán do có nhiều điểm kết quả nằm trên đường kết quả dự đoán và hầu hết các điểm giá trị thực tế còn lại đều nằm trong vùng sai số cho phép 5%. Sự chênh lệch giữa hai giá trị R² và R² hiệu chỉnh thấp nên phương trình hồi quy tuyến tính có độ tương thích với phương trình bậc 2 và thí nghiệm có độ chính xác khá cao.

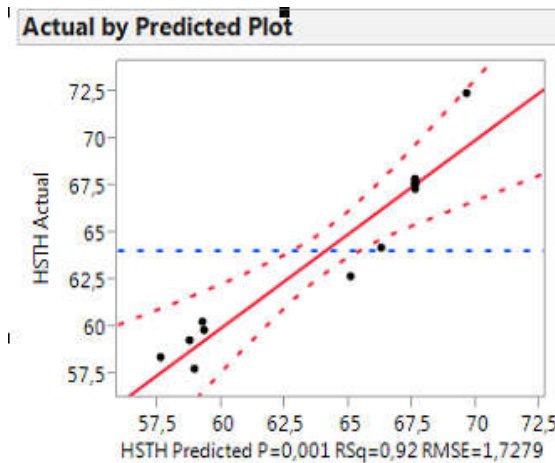
Giá trị p < 0,05 cho thấy 2 yếu tố khảo sát là hàm lượng maltodextrin bổ sung và nhiệt độ không khí sấy có ảnh hưởng đến các đáp ứng là hiệu suất thu hồi chất khô, protein, ẩm độ và hoạt tính kháng oxy hóa với độ tin cậy 95%.

Từ bảng kết quả phân tích “Parameter Estimates” thiết lập được phương trình hồi quy dạng đường cong của bề mặt các đáp ứng (Bảng 3-18).

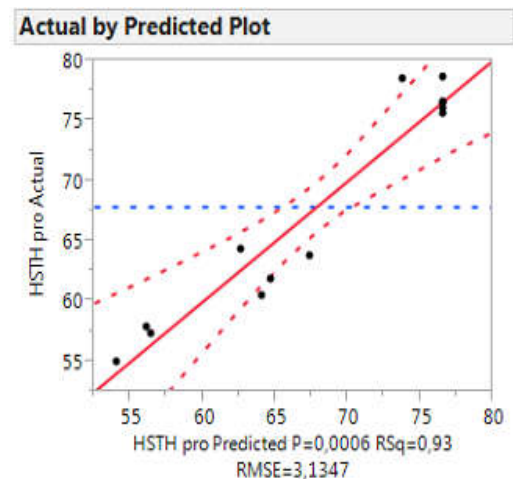
Bảng 3-18. Phương trình hồi quy dạng đường cong của bề mặt các đáp ứng

Đáp ứng	Phương trình hồi quy	R ²
Hiệu suất thu hồi bột (%)	$y_1 = 67,59 + 2,67x_1 - 2,66x_2 - 2,51x_1x_2 - 2,59x_1^2 - 3,19x_2^2$	0,92
Hiệu suất thu hồi protein (%)	$y_2 = 76,61 + 1,69x_1 - 2,85x_2 - 7x_1x_2 - 5,93x_1^2 - 8,44x_2^2$	0,89
Độ ẩm (%)	$y_3 = 5,37 + 0,29x_1 - 0,19x_2 - 0,06x_1x_2 + 0,44x_1^2 + 0,24x_2^2$	0,93
Hoạt tính kháng oxy hóa (IC ₅₀)	$y_4 = 2,02 + 0,13x_1 - 0,21x_2 - 0,17x_1x_2 + 0,19x_1^2 + 0,12x_2^2$	0,89

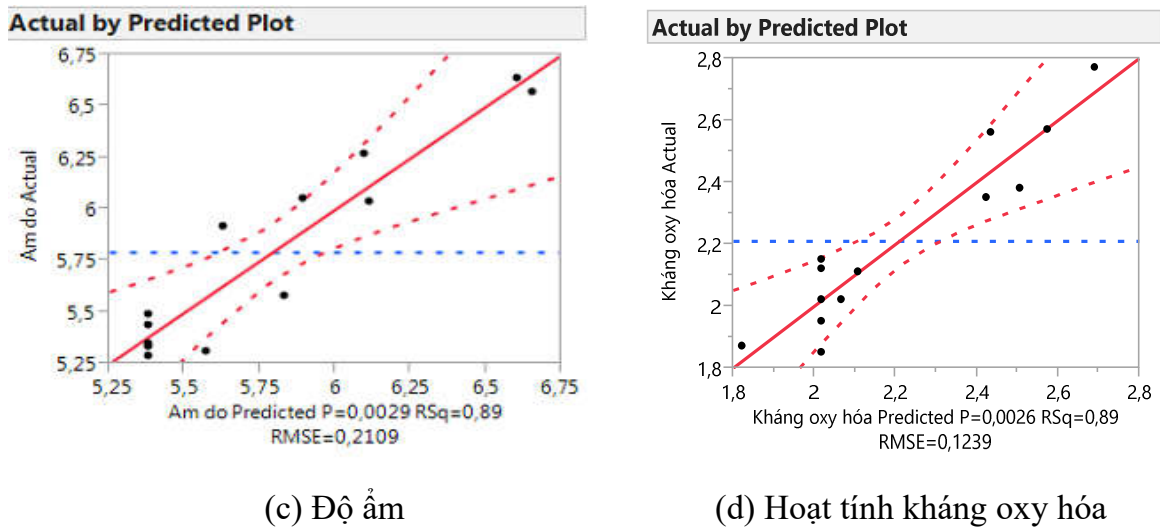
Giá trị của R² đo lường mức độ phù hợp của mô hình ước tính với dữ liệu thử nghiệm. Điều này chứng tỏ có một mối tương quan cao giữa giá trị thực nghiệm và giá trị dự đoán.



(a) Hiệu suất thu hồi chất khô



(b) Hiệu suất thu hồi protein tổng



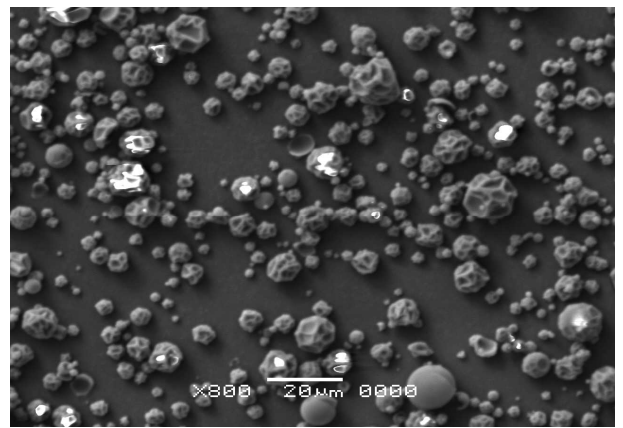
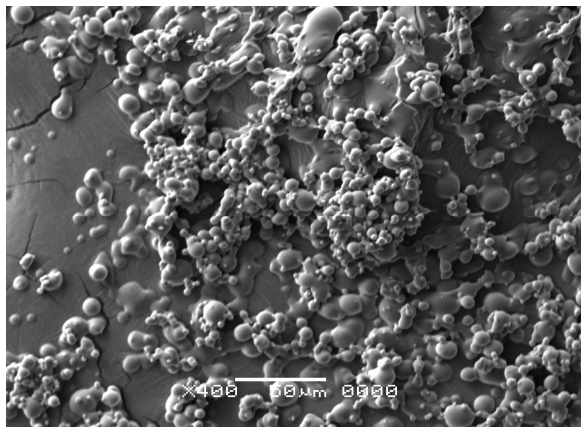
Hình 3.26 Mối tương quan giữa giá trị dự đoán và giá trị thực nghiệm

Mối tương quan của các giá trị này được thể hiện trong Hình 3.26. Hơn nữa, giá trị p của các phản hồi này là 0,001; 0,0006; 0,0029; 0,0026 cho thấy rằng có những tác động đáng kể từ các biến độc lập đến các phản hồi. Do đó, nhiệt độ không khí đầu vào và nồng độ maltodextrin có ảnh hưởng đáng kể đến việc thu hồi chất khô, thu hồi protein, độ ẩm và hoạt tính chống oxy hóa của bột.

Kết quả xử lý thống kê cho thấy sự tương quan giữa kết quả thực nghiệm và mô hình dự đoán là khá cao. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa giá trị thực tế và giá trị mô hình dự đoán. Dựa trên kết quả thí nghiệm kiểm tra giá trị tối ưu của các đáp ứng (Bảng 3-19) cho thấy khi sấy phun dịch thủy phân protein từ thịt cá sấu với nhiệt độ không khí sấy là 142,4°C, tốc độ bơm dòng nguyên liệu là 10 ml.phút⁻¹ kết hợp với việc bổ sung hàm lượng maltodextrin với tỷ lệ 19,6% thì quá trình sấy phun sẽ đạt hiệu suất thu hồi bột là 69,52%, hiệu suất thu hồi protein 77,18%, độ ẩm của bột sấy đạt 5,31% và hoạt tính kháng oxy hóa có giá trị IC₅₀ là 1,87 mg/ml. Đây là các giá trị tốt nhất có thể đạt được khi tối ưu tất cả các chỉ tiêu. Hiệu suất thu hồi bột của nghiên cứu đạt khoảng 69%, kết quả này gần tương tự với kết quả nghiên cứu của Kurozawa và ctv (2011), khi nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình sấy phun dịch protein thủy phân từ thịt gà, kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi bột của quá trình sấy phun đạt khoảng 69%. Hình ảnh SEM của bột cá sấu được trình bày ở Hình 3.27.

Bảng 3-19. Giá trị thực tế và giá trị dự đoán tối ưu của các đáp ứng

Đáp ứng	Giá trị thực tế	Giá trị dự đoán	Sai số tương đối
Hiệu suất thu hồi chất khô (%)	70,54	69,33	1,15
Hiệu suất thu hồi protein (%)	77,82	77,18	0,83
Âm độ (%)	5,38	5,31	1,34
IC ₅₀ (mg/ml)	1,79	1,87	0,08



(a)

(b)

Hình 3.27. Mẫu sau khi sấy được chụp bằng kính hiển vi điện tử SEM

(a) Hiện tượng đông vón của mẫu bột đối chứng (0% maltodextrin)

(b) Mẫu bột bổ sung 19,6% maltodextrin

3.5 Nghiên cứu công thức sản phẩm dinh dưỡng có bổ sung cao cá sấu

3.5.1 Công thức sản phẩm dinh dưỡng từ cao cá sấu

3.5.1.1 Hàm lượng đường bổ sung

Sản phẩm sau khi phối trộn theo qui trình ở Hình 2.4, được hòa tan trong nước và đánh giá cảm quan, mẫu được phối trộn với nồng độ đường là 38; 40; 42%. Kết quả đánh giá cảm quan của 20 cảm quan viên theo thang điểm 5 được thể hiện trong Bảng 3-20. Hàm lượng ẩm của mẫu bột collagen thủy phân là 6,0%, bột protein thủy phân từ thịt là 5,4%.

Bảng 3-20 Đánh giá cảm quan khi khảo sát ở các nồng độ đường 38%, 40% và 42%

Chỉ tiêu	Trung bình điểm cảm quan sản phẩm theo hàm lượng đường khác nhau (%)		
	38 (Mẫu 131)	40 (Mẫu 863)	42 (Mẫu 529)
Màu	3,67 ± 0,02	3,33 ± 0,01	3,33 ± 0,00
Mùi	2,53 ± 0,00	2,33 ± 0,02	2,26 ± 0,01
Vị	2,26 ± 0,01	3,53 ± 0,01	2,33 ± 0,02

Điểm trung bình càng lớn tương đương với mức độ ưa thích càng cao

Về màu: Không có sự khác biệt lớn giữa 3 mẫu, các cảm quan viên phản hồi là 3 mẫu có màu vàng tương đối đẹp, dung dịch trong suốt, không bị lắng cặn.

Về vị: mẫu có hàm lượng đường 40% (mẫu 863) là mẫu nhận được nhiều sự ưa thích nhất từ các cảm quan viên về độ ngọt.

Các cảm quan viên phản hồi rằng sản phẩm có mùi tanh rõ nên chỉ tiêu mùi không được đánh giá cao. Thành phần chủ yếu gây mùi tanh là bột collagen. Mặc dù sau thủy phân thì mùi có phần nhẹ hơn trước thủy phân, tuy nhiên mùi tanh của cá sấu vẫn còn cảm nhận rõ.

Tỷ lệ đường 40% được chọn cho thí nghiệm tiếp theo.

3.5.1.2 Hàm lượng acid ascorbic bổ sung vào sản phẩm

Kết quả đánh giá cảm quan của 20 cảm quan viên bằng phép thử thị hiếu theo thang điểm 5 với các mẫu có hàm lượng 0,5% acid ascorbic (mẫu 294), mẫu có 1% acid ascorbic (mẫu 563), mẫu có 1,5% acid ascorbic (mẫu 961) thể hiện trong Bảng 3-21.

Bảng 3-21. Ảnh hưởng của tỉ lệ acid ascorbic đến vị sản phẩm

Chỉ tiêu	Trung bình điểm cảm quan sản phẩm theo tỷ lệ acid ascorbic		
	Mẫu 294 (0,5%)	Mẫu 563 (1,0%)	Mẫu 961 (1,5%)
Vị	2,96 ^a ± 0,01	3,33 ^a ± 0,00	4,00 ^b ± 0,01

Các giá trị trung bình có ký tự theo sau không giống nhau có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$)

Các mẫu 563 và 961 được hầu hết các cảm quan viên nhận xét khá tốt về vị, tuy nhiên mẫu 961 có kết quả tốt hơn so với 2 mẫu còn lại, vị chua ngọt hài hòa. Như vậy hàm lượng acid ascorbic 1,5% là thông số cố định cho thí nghiệm tiếp theo.

3.5.1.3 Kết quả khảo sát tỷ lệ bột gừng

Kết quả đánh giá cảm quan của 20 cảm quan viên về ảnh hưởng của nồng độ bột gừng lên chất lượng cảm quan của sản phẩm theo thang điểm 5, mẫu có hàm lượng bột gừng 12% (mẫu 367), 14% (mẫu 121) và 16% (mẫu 564).

Bảng 3-22. Ảnh hưởng tỉ lệ bột gừng đến chất lượng cảm quan sản phẩm

Chỉ tiêu	Trung bình điểm cảm quan sản phẩm theo tỷ lệ bột gừng bổ sung		
	Mẫu 367 (12%)	Mẫu 121 (14%)	Mẫu 564 (16%)
Màu	3,96 ± 0,00	3,53 ± 0,02	4,00 ± 0,01
Mùi	2,33 ± 0,01	2,24 ± 0,01	2,26 ± 0,02
Vị	3,67 ± 0,01	3,33 ± 0,00	3,67 ± 0,02

Kết quả xử lý JMP cho thấy, về cả 3 chỉ tiêu: màu, mùi, vị, không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 95%. Điều này chứng tỏ, ở nồng độ bột gừng 12, 14 và 16%, rất ít cảm quan viên nhận thấy được sự khác biệt, điều này có thể do khoảng chênh lệch giữa các hàm lượng này không đủ gây ra khác biệt để cảm nhận bằng cảm quan. Màu sắc của cả 3 mẫu được đánh giá khá cao, màu đẹp, sáng, vị chua ngọt dễ chịu nhưng mùi vẫn chưa được đánh giá cao. Việc bổ sung bột gừng giảm rất đáng kể mùi tanh của sản phẩm. Tuy nhiên, cảm quan viên vẫn còn phát hiện rõ. Người tiêu dùng cần biết tác dụng của sản phẩm để bớt ngại về mùi khi sử dụng. Tỷ lệ gừng 12% được lựa chọn.

3.5.1.4 Mẫu sản phẩm thử nghiệm

Sau khi lựa chọn được tỷ lệ các thành phần bổ sung. Một lượng sản phẩm được chế biến và đóng gói trong túi PE tráng nhôm với 5g bột sản phẩm/ gói. Sản phẩm được pha với khoảng 50mL nước ấm trước khi dùng. Sản phẩm được đóng gói 5g ước tính như trong Bảng 3-23. Các chỉ tiêu phân tích đều nằm dưới giá trị tối đa cho phép với sữa bột uống liền (TCVN 5538:2002).

Theo tham khảo với thầy thuốc của Công ty TNHH Cá sấu Hoa cà, liều dùng cho người lớn có bệnh xương khớp hay cho các bé bị xương thủy tinh mức nghiêm trọng khoảng 1g cao/ ngày (cao chứa 70 - 75% collagen) và cho người bệnh nhẹ hay

phòng ngừa ở khoảng $\frac{1}{2}$ liều lượng. Như vậy, tùy người bình thường muốn phòng ngừa hay trị bệnh xương khớp mà lượng sản phẩm có thể dùng 1 – 2 gói/ ngày.

Bảng 3-23. Thành phần của gói thành phẩm 5g

Thành phần	Khối lượng (g)	Tỷ lệ %
Bột gừng hòa tan	0,6	12
Đường	2	40
Ascorbic acid	0,075	1,50
Bột collagen	1,16	23,25
Bột protein	1,16	23,25

3.5.2 Kết quả đánh giá cảm quan, thành phần hoá lý, khoáng và vi sinh của sản phẩm bột dinh dưỡng

3.5.2.1 Đánh giá cảm quan sản phẩm bột dinh dưỡng

Tiến hành đánh giá cảm quan sản phẩm dinh dưỡng (bột collagen và bột protein có bổ sung nguyên liệu gừng và đường phèn) phối trộn theo các thí nghiệm trước ký hiệu BDD. Mẫu đối chứng là bột thủy phân không bổ sung.

Bảng 3-24. Kết quả đánh giá cảm quan bột thủy phân đối chứng và bột dinh dưỡng (Bột collagen và bột protein bổ sung đường, gừng)

Chỉ tiêu	Mẫu nghiên cứu	
	Bột thủy phân đối chứng	Bột dinh dưỡng
Trạng thái	Bột mịn	Bột mịn
Vị	Mặn nhẹ	Hơi ngọt, cay nhẹ
Màu sắc	Trắng ngà	Trắng ngà
Mùi vị	Tanh nhẹ đặc trưng của cao cá sấu	Mùi thơm nồng của gừng và dịu ngọt của đường phèn
Tạp chất lạ	Không có	Không có

Kết quả cảm quan ban đầu được liệt kê trong Bảng 3-24, cho thấy bột dinh dưỡng có vị ngọt, cay nhẹ với mùi thơm nồng của gừng và dịu của đường phèn đã cải thiện đáng kể mùi tanh vị mặn của cao xương cá sấu, tăng cảm quan cho sản phẩm nghiên cứu.

3.5.2.2 Thành phần cơ bản của sản phẩm bột dinh dưỡng bổ sung

Phân tích sơ bộ thành phần sản phẩm từ bột thủy phân và bột thủy phân bổ sung đường phèn, gừng (Bảng 3-25) cho thấy không có sự khác biệt giữa các thông số độ ẩm, pH, hàm lượng tro, chất béo tổng số. Hàm lượng protein trong bột dinh dưỡng (41,25%) lớn hơn so với trong mẫu bột thủy phân đối chứng (38,02%) nhưng sự khác biệt vẫn chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3-25. Kết quả phân tích một số thành phần hóa lý của bột thủy phân đối chứng và bột dinh dưỡng

Chỉ tiêu	Mẫu nghiên cứu	
	Bột thủy phân đối chứng	Bột dinh dưỡng
Độ ẩm (%)	4,88 ± 0,10	4,58 ± 0,14
pH	6,34 ± 0,18	6,30 ± 0,15
Tro tổng số (% w/w) *	0,50 ± 0,05	0,53 ± 0,01
Tro không tan trong axit (% w/w) *	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Nitơ tổng số (% w/w) *	6,09 ± 0,15	6,60 ± 0,06
Protein thô (% w/w) *	38,02 ± 0,94	41,25 ± 0,40
Chất béo (% w/w) *	0,22 ± 0,01	0,28 ± 0,08

* Kết quả tính trên chất khô tuyệt đối

3.5.2.3 Hàm lượng amino acid và collagen của sản phẩm bột dinh dưỡng bổ sung

Kết quả phân tích hàm lượng các amino acid trong bột thủy phân đối chứng và bột dinh dưỡng (bột collagen thủy phân và bột protein thủy phân bổ sung đường phèn, gừng) được liệt kê trong Bảng 3-26. Kết quả phân tích cho thấy trong các sản phẩm có hàm lượng lớn các amino acid Glu, Gly+His, Ala+Pro. Tổng hàm lượng amino acid trong mẫu bột dinh dưỡng (22,68%) lớn hơn không đáng kể so với mẫu bột thủy phân (20,83) ($p > 0,05$). Điều này chứng tỏ khi bổ sung gừng và đường phèn các amino acid không bị tác động làm giảm hàm lượng của chúng.

Bảng 3-26 Hàm lượng amino acid trong bột thủy phân đối chứng và bột dinh dưỡng

Hàm lượng amino acid (g/kg) **	Mẫu nghiên cứu	
	Bột thủy phân đối chứng	Bột dinh dưỡng
Aspartic acid	13,55 ± 0,97	14,10 ± 0,73
Glutamic acid	32,84 ± 0,18	35,58 ± 0,65
Serine	8,78 ± 0,40	9,48 ± 0,87
Glycine + Histidine*	59,39 ± 0,36	65,01 ± 0,12
Arginine	18,09 ± 0,12	22,19 ± 0,41
Threonin*	5,51 ± 0,18	7,67 ± 0,17
Alanine + Prolin	22,68 ± 0,14	23,58 ± 0,11
Tyrosine	1,88 ± 0,47	1,97 ± 0,46
Valine*	4,70 ± 0,30	4,93 ± 0,17
Methionine*	2,12 ± 0,33	2,18 ± 0,40
Cystine	4,31 ± 0,32	3,96 ± 0,78
Isoleucine*	5,73 ± 0,38	6,05 ± 0,13
Leucine*	9,48 ± 0,75	9,64 ± 0,22
Phenylalanine*	10,03 ± 0,26	10,75 ± 0,42
Lysine*	9,20 ± 0,16	9,74 ± 0,12
Tổng (% w/w)	20,83 ± 0,16	22,68 ± 0,12

* Amino acid thiết yếu

** Kết quả tính trên chất khô tuyệt đối

Kết quả cho thấy không có sự khác biệt về hàm lượng Hydroxyprolin và collagen trong mẫu bột thủy phân và bột dinh dưỡng (Bảng 3-27).

Bảng 3-27 Hàm lượng Hydroxylprolin và collagen trong mẫu bột thủy phân đối chứng và bột dinh dưỡng

Chỉ tiêu nghiên cứu*	Mẫu nghiên cứu	
	Bột thủy phân đối chứng	Bột dinh dưỡng
Hydroxylprolin (% w/w)	3,74 ± 0,20	3,68 ± 0,18
Collagen (% w/w)	28,32 ± 0,18	28,74 ± 0,20

* Kết quả tính trên chất khô tuyệt đối

3.5.2.4 Thành phần khoáng chất và kim loại trong sản phẩm bột dinh dưỡng

Kết quả phân tích thành phần khoáng chất và hàm lượng các kim loại trong hai sản phẩm bột thủy phân và bột dinh dưỡng (Bảng 3-28) cho thấy thành phần các khoáng chất và hàm lượng kim loại không có sự khác biệt giữa hai nhóm mẫu. Đặc biệt không phát hiện các kim loại có tính độc cao như As, Cd, Pb, Hg trong cả hai nhóm mẫu bột thủy phân và bột dinh dưỡng.

Bảng 3-28. Thành phần khoáng chất, hàm lượng kim loại trong mẫu bột thủy phân đối chứng và bột dinh dưỡng

Nguyên tố	Đơn vị	Mẫu nghiên cứu	
		Bột thủy phân đối chứng	Bột dinh dưỡng
As	µg/kg	Không phát hiện	Không phát hiện
K	g/kg	0,27 ± 0,01	0,22 ± 0,02
Na	g/kg	1,57 ± 0,01	1,33 ± 0,01
P	g/kg	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,00
Ca	g/kg	0,13 ± 0,07	0,12 ± 0,05
Ba	mg/kg	0,54 ± 0,01	0,52 ± 0,02
Cd	µg/kg	Không phát hiện	Không phát hiện
Cr	mg/kg	Không phát hiện	Không phát hiện
Cu	mg/kg	0,44 ± 0,01	0,49 ± 0,01
Fe	mg/kg	11,94 ± 0,21	13,32 ± 0,59
Mg	mg/kg	13,11 ± 0,16	10,13 ± 0,12
Mn	mg/kg	0,37 ± 0,01	0,31 ± 0,02
Ni	mg/kg	0,26 ± 0,00	0,21 ± 0,00
Pb	mg/kg	Không phát hiện	Không phát hiện
Sb	mg/kg	Không phát hiện	Không phát hiện
Se	mg/kg	0,76 ± 0,02	0,66 ± 0,05
Sn	mg/kg	0,26 ± 0,03	0,16 ± 0,05
Zn	mg/kg	28,96 ± 0,33	23,77 ± 0,58
Hg	µg/kg	Không phát hiện	Không phát hiện
Al	mg/kg	14,12 ± 0,59	14,44 ± 0,33

* Kết quả tính trên chất khô tuyệt đối

3.5.2.5 Hàm lượng vi sinh các sản phẩm bột dinh dưỡng

Kết quả phân tích các chỉ tiêu vi sinh các nhóm mẫu bột thủy phân đối chứng được trình bày trong Bảng 3-29. Kết quả cho thấy đối với nhóm sản phẩm bột dinh dưỡng, đạt tiêu chuẩn theo QCVN 8-3:2012/BYT về giới hạn ô nhiễm vi sinh vật trong thực phẩm.

Bảng 3-29. Hàm lượng vi sinh trong các sản phẩm bột dinh dưỡng và đối chứng

Chỉ tiêu nghiên cứu	Đơn vị tính	Mẫu nghiên cứu	
		Bột thủy phân đối chứng	Bột dinh dưỡng
Tổng số vi khuẩn hiếu khí	CFU/g	10 ¹	10 ¹
<i>E.Coli</i>	CFU/g	KPH	KPH
<i>Coliforms</i>	CFU/g	KPH	KPH
<i>Staphylococcus aureus</i>	CFU/g	KPH	KPH
<i>Samonella spp.</i>	CFU/g	KPH	KPH
<i>Clostridium perfringens</i>	CFU/g	KPH	KPH
Tổng số nấm men	CFU/g	KPH	KPH
Tổng số nấm mốc	CFU/g	KPH	KPH

KPH: Không phát hiện

Để cải thiện và tăng tính ứng dụng trong thực phẩm từ cao xương cá sấu bước đầu đã tạo ra sản phẩm bột collagen thủy phân và bột protein thủy phân có bổ sung thêm đường, gừng. Kết quả phân tích cảm quan, xác định các thành phần trong sản phẩm cho thấy các sản phẩm thu được có nhiều cải tiến so với nhóm đối chứng.

Đối với mẫu bột dinh dưỡng đã cải thiện đáng kể mùi tanh đặc trưng của cao, khi hòa vào nước cho mùi thơm của gừng và đường, từ đó tăng tính cảm quan, bổ sung được một số tác dụng quý của gừng và đường. Kết quả kiểm tra các chỉ tiêu hóa lý cho thấy khi bổ sung gừng và đường, không có tác động làm thay đổi các thành phần protein, amino acid, collagen, khoáng chất, hàm lượng kim loại.

3.6 Nghiên cứu độc tính của các sản phẩm cao xương cá sấu

3.6.1 Nghiên cứu độc tính cấp của các sản phẩm cao xương cá sấu

Sau một vài thử nghiệm thăm dò, chuột được chia lô thí nghiệm và cho uống cao xương thô và sản phẩm bột dinh dưỡng bổ sung với liều tăng dần cho đến mức liều tối đa mà cao cá sấu có thể dùng được, bơm qua kim tiêm.

3.6.1.1 Biến động về khối lượng

Kết quả theo dõi chuột ở các lô thí nghiệm và đối chứng Bảng 3-30 được cân khi đói ở các mốc thời gian trước thử nghiệm, sau thử nghiệm 1, 3 và sau 7 ngày nhằm đánh giá khả năng ảnh hưởng của cao cá sấu đến khối lượng của chuột.

Bảng 3-30. Khối lượng của chuột trước và sau thử nghiệm độc tính cấp

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	n	Liều (g/kg)	Khối lượng cơ thể chuột (g)			
				Ban đầu	Sau 1 ngày	Sau 3 ngày	Sau 7 ngày
Cao loại tủy	1	10	5	19,72 ± 0,94	20,15 ± 0,87	21,02 ± 0,94	22,86 ± 1,26
	2	10	10	19,33 ± 1,02	19,60 ± 1,00	20,75 ± 0,99	22,98 ± 1,17
	3	10	20	20,14 ± 1,19	20,43 ± 1,18	21,69 ± 1,32	23,31 ± 0,99
	4	10	30	19,68 ± 0,94	19,91 ± 1,03	21,00 ± 0,91	23,03 ± 0,87
	5	10	37	19,73 ± 0,78	20,06 ± 0,94	21,29 ± 1,25	23,15 ± 1,25
Bột thủy phân	1	10	5	19,97 ± 0,81	20,16 ± 0,78	21,39 ± 1,04	23,87 ± 0,92
	2	10	10	20,11 ± 1,09	20,52 ± 0,92	21,78 ± 1,31	24,09 ± 1,40
	3	10	20	20,10 ± 1,39	20,59 ± 1,15	21,98 ± 1,36	24,05 ± 1,23
	4	10	30	20,16 ± 1,01	20,28 ± 1,09	21,42 ± 1,28	23,60 ± 1,13
	5	10	36,75	19,91 ± 0,97	20,05 ± 0,89	21,59 ± 1,00	23,74 ± 1,00
Bột dinh dưỡng	1	10	5	19,52 ± 0,82	19,67 ± 0,83	20,75 ± 1,17	23,05 ± 0,98
	2	10	10	20,11 ± 1,11	20,66 ± 1,17	21,10 ± 0,84	23,25 ± 0,84
	3	10	20	20,06 ± 0,90	20,43 ± 1,10	21,49 ± 1,05	23,54 ± 1,38
	4	10	30	20,29 ± 0,92	20,80 ± 0,99	21,92 ± 1,08	24,23 ± 1,02
	5	10	36,75	19,75 ± 1,10	20,00 ± 1,08	21,41 ± 1,11	24,70 ± 0,63
Đối chứng	1	10	Nước cất	20,13 ± 1,11	20,37 ± 1,16	21,60 ± 1,43	23,84 ± 1,25

Kết quả cho thấy khối lượng cơ thể của chuột ở tất cả các lô thí nghiệm và đối chứng sử dụng nước cất đều tăng ở mức trước và sau khi cho uống cao cá sấu liều cao ($p < 0,05$). Khối lượng cơ thể chuột của các liều thử nghiệm tại cùng thời điểm có mức tăng trước và sau khi uống cao xương cá sấu không có sự khác biệt giữa các lô ($p > 0,05$).

3.6.1.2 Đặc điểm sinh lý của chuột sau thử nghiệm và giá trị LD₅₀

Sau khi cho chuột uống cao cá sấu ở liều cao nhất (37 g/kg cao loại tủy; 36,75 g/kg bột thủy phân; 36,65 g/kg bột dinh dưỡng) trên khối lượng cơ thể (liều cao nhất có thể bơm qua kim tiêm), quan sát thấy chuột có biểu hiện đầu tiên là gãi mõm liên tục, có thể do cao cho uống quá đặc lại khó tan trong nước cất, sau 1 giờ các dấu hiệu không còn.

Bảng 3-31. Phân suất tử vong của chuột trong thí nghiệm độc tính cấp tính

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	n	Liều (g/kg)	Số chuột chết/sống			Phân suất tử vong (%)
				Sau 24 giờ	Sau 72 giờ	Sau 7 ngày	
Cao loại tủy	1	10	5	0/10	0/10	0/10	0 %
	2	10	10	0/10	0/10	0/10	0 %
	3	10	20	0/10	0/10	0/10	0 %
	4	10	30	0/10	0/10	0/10	0 %
	5	10	37	0/10	0/10	0/10	0 %
Bột thủy phân	1	10	5	0/10	0/10	0/10	0 %
	2	10	10	0/10	0/10	0/10	0 %
	3	10	20	0/10	0/10	0/10	0 %
	4	10	30	0/10	0/10	0/10	0 %
	5	10	36,75	0/10	0/10	0/10	0 %
Bột dinh dưỡng	1	10	5	0/10	0/10	0/10	0 %
	2	10	10	0/10	0/10	0/10	0 %
	3	10	20	0/10	0/10	0/10	0 %
	4	10	30	0/10	0/10	0/10	0 %
	5	10	36,75	0/10	0/10	0/10	0 %
Đối chứng	1	10	Nước cất	0/10	0/10	0/10	0 %

Theo dõi tình trạng chung cho thấy chuột ở các lô đều khỏe mạnh, ăn uống bình thường, phân và nước tiểu không có hiện tượng bất thường.

Tiếp tục theo dõi 7 ngày sau khi cho uống cao cá sấu, cá thể chuột tất cả các lô thí nghiệm hoạt động ăn uống, bài tiết bình thường. Không thấy biểu hiện ngộ độc trên chuột và không có con nào chết trong suốt thời gian theo dõi (Bảng 3-31). Điều đó chứng tỏ sản phẩm cao cá sấu không thể hiện độc tính cấp và nên không xác định được LD₅₀ của các sản phẩm cao cá sấu trên chuột theo đường uống.

Với mức liều cao nhất cho chuột uống 37 g/kg cao loại tủy, 36,75 g/kg bột thủy phân, 36,75 g/kg bột dinh dưỡng tương đương với 157,25 g/kg cao loại tủy, 156,18 g/kg bột thủy phân và bột dinh dưỡng trên người có cân nặng 50 kg. Cho tới hiện nay chưa có tài liệu quy định liều dùng cụ thể khi sử dụng cao cá sấu. Theo sách đông y, cao hổ cốt được khuyến cáo liều dùng 4 – 6 g/ngày, cao khi 5 – 10 g/ngày, cao ban long 5 – 10 g/ngày, đối với sản phẩm cao cá sấu Hoa Cà được công ty khuyến cáo sử dụng 6 – 12 g/ngày. Một số nghiên cứu cho thấy liều 1,8 g/kg và 3,7 g/kg đã có tác dụng hỗ trợ sức khỏe trên chuột thí nghiệm. Như vậy nếu so sánh liều tối đa có thể đưa qua kim tiêm với liều khuyến cáo và liều có tác dụng hỗ trợ sức khỏe thì liều tối đa cho chuột uống lớn hơn rất nhiều, chứng tỏ cao cá sấu không thể hiện độc cấp tính khi sử dụng.

3.6.2 Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của các sản phẩm cao xương cá sấu

3.6.2.1 Thông số huyết học trong máu chuột sau khi sử dụng các sản phẩm cao xương cá sấu

Kết quả theo dõi các chỉ số hồng cầu được liệt kê trong Bảng 3-32, kết quả cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các lô nghiên cứu tại cùng một thời điểm. Số lượng hồng cầu tại thời điểm sau một tháng ở lô bột thủy phân liều 3,68 g/kg có mức tăng đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với thời điểm ban đầu, nhưng sau hai tháng giảm xuống đến mức không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với thời điểm ban đầu. Như vậy các sản phẩm cao xương cá sấu không ảnh hưởng tới số lượng hồng cầu trong máu chuột.

Bảng 3-32. Số lượng hồng cầu trong máu chuột ở các lô thí nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	Số lượng hồng cầu ($10^6/\mu\text{l}$)		
			Ban đầu	Sau 1 tháng	Sau 2 tháng
Cao loại tủy	1	1,85	$8,93 \pm 0,40$	$8,99 \pm 0,21$	$9,05 \pm 0,23$
	2	3,70	$8,22 \pm 1,00$	$8,61 \pm 0,43$	$8,81 \pm 0,14$
Bột thủy phân	3	1,84	$8,39 \pm 1,41$	$8,85 \pm 0,62$	$8,54 \pm 0,41$
	4	3,68	$8,20 \pm 0,45$	$8,66 \pm 0,48$	$8,48 \pm 0,47$
Bột dinh dưỡng	5	1,84	$8,75 \pm 0,19$	$8,34 \pm 1,01$	$8,55 \pm 0,39$
	6	3,68	$8,03 \pm 0,30$	$8,34 \pm 0,50$	$8,63 \pm 0,51$
Đối chứng	7	-	$8,48 \pm 0,16$	$8,65 \pm 0,38$	$8,68 \pm 0,22$

Kết quả Bảng 3-33 cho thấy, sau hai tháng cho chuột uống cao cá sấu và sản phẩm bột dinh dưỡng bổ sung thì hàm lượng hemoglobin sau tháng thứ hai tăng cao, đạt ý nghĩa thống kê so với thời điểm ban đầu thử nghiệm ($p < 0,05$).

Bảng 3-33. Hàm lượng hemoglobine trong máu chuột các thí nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	Hàm lượng hemoglobin (g/dL)		
			Ban đầu	Sau 1 tháng	Sau 2 tháng
Cao loại tủy	1	1,85	$12,43 \pm 0,32$	$14,23 \pm 1,02$	$14,53 \pm 0,49$
	2	3,70	$12,33 \pm 0,15$	$12,97 \pm 1,65$	$14,77 \pm 0,72$
Bột thủy phân	3	1,84	$12,40 \pm 0,17$	$12,27 \pm 1,06$	$14,47 \pm 0,35$
	4	3,68	$12,40 \pm 0,52$	$12,60 \pm 1,23$	$14,13 \pm 1,66$
Bột dinh dưỡng	5	1,84	$13,10 \pm 0,26$	$13,80 \pm 0,61$	$14,13 \pm 0,55$
	6	3,68	$12,60 \pm 0,70$	$13,73 \pm 1,56$	$14,67 \pm 0,92$
Đối chứng	7	-	$12,70 \pm 0,69$	$13,37 \pm 1,02$	$14,33 \pm 0,95$

Hàm lượng hemoglobin giữa lô đối chứng và các lô thử nghiệm không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê tại thời điểm ban đầu thử nghiệm, sau một tháng và hai tháng ($p > 0,05$). Chứng tỏ cao xương cá sấu và sản phẩm bột dinh dưỡng bổ sung thử nghiệm không có tác động ảnh hưởng đến hàm lượng hemoglobin trong máu chuột.

Kết quả theo dõi hàm lượng hematocrit trong máu chuột (Bảng 3-34) cũng cho thấy không có sự khác biệt về hàm lượng hematocrit trong máu chuột ở các lô thí nghiệm tại cùng thời điểm, cũng như trong cùng một lô tại giai đoạn trước và sau một tháng, hai tháng thí nghiệm cho chuột uống cao cá sấu và các sản phẩm bột dinh dưỡng bổ sung cao cá sấu. Như vậy cao cá sấu và các sản phẩm bột dinh dưỡng bổ sung ở các liều khác nhau không có tác động đến hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột thí nghiệm.

Bảng 3-34. Hàm lượng hematocrit trong máu chuột ở các thí nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	Hàm lượng Hematocrit (%)		
			Ban đầu	Sau 1 tháng	Sau 2 tháng
Cao loại tủy	1	1,85	41,40 ± 1,35	40,40 ± 0,52	41,67 ± 1,39
	2	3,70	38,40 ± 2,23	39,67 ± 1,34	41,60 ± 1,82
Bột thủy phân	3	1,84	37,37 ± 4,65	39,53 ± 1,63	40,00 ± 2,10
	4	3,68	38,83 ± 1,48	39,17 ± 2,57	41,23 ± 4,42
Bột dinh dưỡng	5	1,84	40,27 ± 0,84	40,17 ± 1,90	41,23 ± 3,54
	6	3,68	38,93 ± 0,49	39,70 ± 1,71	41,83 ± 3,88
Đối chứng	7	-	39,33 ± 2,51	40,77 ± 0,61	40,27 ± 0,86

Bảng 3-35. Số lượng bạch cầu trong máu chuột ở các lô thí nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	Số lượng bạch cầu ($10^3/\mu\text{l}$)		
			Ban đầu	Sau 1 tháng	Sau 2 tháng
Cao loại tủy	1	1,85	7,10 ± 1,35	8,67 ± 1,93	9,37 ± 1,01
	2	3,70	7,37 ± 0,81	8,73 ± 0,49	9,90 ± 1,97
Bột thủy phân	3	1,84	8,07 ± 0,68	9,07 ± 0,29	9,73 ± 0,49
	4	3,68	7,47 ± 1,04	9,07 ± 0,45	9,43 ± 1,10
Bột dinh dưỡng	5	1,84	7,97 ± 0,59	8,63 ± 0,67	9,53 ± 1,70
	6	3,68	7,63 ± 1,07	8,77 ± 1,62	9,27 ± 1,16
Đối chứng	7	-	7,50 ± 1,00	8,13 ± 0,95	9,10 ± 1,40

Kết quả theo dõi số lượng bạch cầu khi cho chuột uống cao cá sấu và sản phẩm bột dinh dưỡng (Bảng 3-35) cho thấy, ở tất cả các lô nghiên cứu mặc dù số lượng bạch cầu có xu hướng tăng lên sau một tháng và hai tháng thử nghiệm, tuy nhiên mức độ tăng vẫn chưa đạt ý nghĩa thống kê. Tại các thời điểm ban đầu, sau một tháng và sau hai tháng số lượng hồng cầu giữa các lô không có sự khác biệt ($p>0,05$). Vậy khi cho chuột uống cao cá sấu và sản phẩm thử nghiệm đã không làm ảnh hưởng đến số lượng bạch cầu trong máu chuột.

Kết quả phân tích số lượng tiểu cầu trong máu chuột thí nghiệm (Bảng 3-36) cũng cho thấy khi sử dụng cao cá sấu và sản phẩm thử nghiệm số lượng tiểu cầu trong máu chuột không có sự khác biệt sau một tháng và hai tháng so với ban đầu, giữa các lô thí nghiệm cùng thời điểm lấy máu cũng không có sự khác biệt ($p>0,05$).

Bảng 3-36. Số lượng tiểu cầu trong máu chuột ở các lô thí nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	Số lượng tiểu cầu ($10^3/\mu\text{l}$)		
			Ban đầu	Sau 1 tháng	Sau 2 tháng
Cao loại tủy	1	1,85	$532,3 \pm 3,06$	$580 \pm 44,58$	$534,0 \pm 73,12$
	2	3,70	$520,3 \pm 11,50$	$532,0 \pm 92,02$	$541,3 \pm 83,56$
Bột thủy phân	3	1,84	$516,7 \pm 52,58$	$557,3 \pm 89,19$	$545,7 \pm 94,04$
	4	3,68	$530,7 \pm 9,45$	$571,3 \pm 29,30$	$566,7 \pm 84,39$
Bột dinh dưỡng	5	1,84	$573,7 \pm 57,81$	$581,7 \pm 62,64$	$549,0 \pm 79,57$
	6	3,68	$527,0 \pm 13,00$	$529,3 \pm 71,11$	$582,3 \pm 88,79$
Đối chứng	7	-	$537,0 \pm 7,21$	$536,7 \pm 26,10$	$514 \pm 26,50$

Như vậy khi sử dụng cao xương cá sấu và sản phẩm bột dinh dưỡng từ cao xương cá sấu không có tác động ảnh hưởng đến công thức máu của chuột thí nghiệm.

3.6.2.2 Thông số chức năng gan

Kết quả phân tích chỉ tiêu sinh hóa gan như trong Bảng 3-37, Bảng 3-38, Bảng 3-39, Bảng 3-40 với các tiêu theo dõi chính là nồng độ Bilirubin, GOT, GPT, và protein toàn phần. Kết quả cho thấy nồng độ bilirubin, GOT, GPT ổn định không có sự thay đổi có ý nghĩa thống kê so với thời điểm ban đầu và so với đối chứng.

Bảng 3-37. Nồng độ bilirubin trong máu chuột ở các lô thí nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	Nồng độ bilirubin (mg/dl)		
			Ban đầu	Sau 1 tháng	Sau 2 tháng
Cao loại tủy	1	1,85	0,37 ± 0,05	0,40 ± 0,01	0,39 ± 0,02
	2	3,70	0,34 ± 0,04	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,07
Bột thủy phân	3	1,84	0,38 ± 0,01	0,40 ± 0,08	0,40 ± 0,06
	4	3,68	0,38 ± 0,02	0,38 ± 0,04	0,39 ± 0,01
Bột dinh dưỡng	5	1,84	0,37 ± 0,06	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,02
	6	3,68	0,39 ± 0,02	0,40 ± 0,04	0,38 ± 0,08
Đối chứng	7	-	0,38 ± 0,05	0,39 ± 0,04	0,40 ± 0,02

Bảng 3-38. Chỉ số GOT trong máu chuột ở các lô thí nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	GOT (U/L)		
			Ban đầu	Sau 1 tháng	Sau 2 tháng
Cao loại tủy	1	1,85	125,3 ± 10,97	128,0 ± 13,75	127,7 ± 12,66
	2	3,70	126,7 ± 8,14	130,7 ± 7,23	133,7 ± 9,02
Bột thủy phân	3	1,84	126,3 ± 10,41	135,7 ± 8,74	132,3 ± 11,72
	4	3,68	128,7 ± 2,89	131,0 ± 3,46	136,0 ± 7,21
Bột dinh dưỡng	5	1,84	124,7 ± 4,94	130,7 ± 10,79	134,3 ± 6,81
	6	3,68	125,7 ± 16,56	129,0 ± 4,36	133,3 ± 21,55
Đối chứng	7	-	122,0 ± 11,14	129,3 ± 5,69	128,3 ± 10,02

Bảng 3-39. Chỉ số GPT trong máu chuột ở các lô thí nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	GPT (U/L)		
			Ban đầu	Sau 1 tháng	Sau 2 tháng
Cao loại tủy	1	1,85	54,37 ± 4,79	55,10 ± 4,49	58,52 ± 3,77
	2	3,70	50,74 ± 7,55	54,50 ± 5,61	59,40 ± 12,07
Bột thủy phân	3	1,84	50,91 ± 3,03	51,03 ± 2,77	52,20 ± 5,37
	4	3,68	51,10 ± 7,36	55,15 ± 5,06	55,77 ± 10,53
Bột dinh dưỡng	5	1,84	57,93 ± 4,06	54,03 ± 8,10	58,23 ± 4,19
	6	3,68	51,88 ± 2,96	52,11 ± 7,20	53,89 ± 4,80
Đối chứng	7	-	53,67 ± 1,48	55,18 ± 1,90	56,73 ± 4,07

Bảng 3-40. Hàm lượng protein toàn phần trong máu chuột ở các lô thí nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	Protein toàn phần (g/dl)		
			Ban đầu	Sau 1 tháng	Sau 2 tháng
Cao loại tùy	1	1,85	5,14 ± 0,22	5,54 ± 0,18	6,94 ± 0,80
	2	3,70	4,90 ± 0,33	5,80 ± 0,55	7,17 ± 0,46
Bột thủy phân	3	1,84	4,92 ± 0,60	5,11 ± 0,67	6,28 ± 0,65
	4	3,68	4,84 ± 0,42	5,36 ± 0,13	6,40 ± 0,21
Bột dinh dưỡng	5	1,84	5,04 ± 0,39	5,80 ± 0,55	6,54 ± 1,06
	6	3,68	5,17 ± 0,45	5,53 ± 0,69	6,67 ± 0,39
Đối chứng	7	-	5,17 ± 0,33	5,59 ± 0,46	6,16 ± 0,58

Đối với chỉ tiêu protein toàn phần, kết quả phân tích (Bảng 3-40) cho thấy có khác biệt đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) đối với lô 4 cho uống cao sấy phun sau thời gian thử nghiệm hai tháng so với thời điểm ban đầu, nhưng lại không có sự khác biệt với nhóm chứng và các nhóm còn lại. Nhìn chung protein toàn phần trong máu chuột thí nghiệm tăng lên ở tất cả các lô, lớn nhất ở lô 2, sau thời gian 2 tháng so với ban đầu (7,17 mg/dl), nhưng vẫn không khác biệt so với nhóm chứng.

3.6.2.3 Thông số chức năng thận

Kết quả phân tích các thông số đánh giá ảnh hưởng của cao cá sấu và sản phẩm liên quan được liệt kê trong các Bảng 3-41, Bảng 3-42 với chỉ tiêu theo dõi chính là urea và creatinin trong máu chuột thí nghiệm.

Bảng 3-41. Chỉ số urea trong máu chuột ở các lô thí nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	Urea (mg/dl)		
			Ban đầu	Sau 1 tháng	Sau 2 tháng
Cao loại tùy	1	1,85	52,92 ± 1,55	52,66 ± 2,11	50,29 ± 0,16
	2	3,70	51,10 ± 2,69	52,50 ± 2,37	49,71 ± 4,26
Bột thủy phân	3	1,84	50,73 ± 2,46	50,82 ± 1,53	48,65 ± 1,05
	4	3,68	51,14 ± 3,47	49,43 ± 1,17	50,22 ± 0,86
Bột dinh dưỡng	5	1,84	52,06 ± 3,81	52,03 ± 3,39	50,93 ± 1,51
	6	3,68	51,54 ± 4,73	51,24 ± 3,01	50,38 ± 5,22
Đối chứng	7	-	53,10 ± 1,60	52,69 ± 2,18	54,64 ± 2,49

Số liệu thống kê cho thấy hàm lượng creatinin và urea sau một tháng, hai tháng không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với trước thí nghiệm.

Chỉ số creatinin thấp nhất thuộc 2 lô 5 và 6, đạt giá trị 0,56 mg/dl ở liều 1,84 g/kg và 0,58 mg/dl ở liều 3,68 g/kg. Tuy nhiên tại cùng thời điểm, giữa các lô nghiên cứu không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Bảng 3-42. Chỉ số Creatinin trong máu chuột ở các lô thí nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	Creatinin (mg/dl)		
			Ban đầu	Sau 1 tháng	Sau 2 tháng
Cao loại tủy	1	1,85	0,64 ± 0,05	0,62 ± 0,05	0,61 ± 0,03
	2	3,70	0,66 ± 0,04	0,67 ± 0,03	0,60 ± 0,10
Bột thủy phân	3	1,84	0,64 ± 0,08	0,64 ± 0,09	0,62 ± 0,04
	4	3,68	0,66 ± 0,09	0,63 ± 0,06	0,61 ± 0,08
Bột dinh dưỡng	5	1,84	0,62 ± 0,09	0,58 ± 0,09	0,56 ± 0,02
	6	3,68	0,60 ± 0,07	0,59 ± 0,06	0,58 ± 0,06
Đối chứng	7	-	0,61 ± 0,04	0,60 ± 0,03	0,65 ± 0,03

3.6.2.4 Chỉ tiêu cholesterol và triglycerid trong máu chuột thí nghiệm

Hàm lượng cholesterol trong máu chuột thí nghiệm (Bảng 3-43) ở lô đối chứng và các lô sử dụng sản phẩm bột dinh dưỡng ở các liều khác nhau sau một tháng, hai tháng không có sự khác biệt so với trước thí nghiệm.

Hàm lượng cholesterol cao nhất trong lô cho chuột uống cao loại tủy liều 3,70 g/kg (151,55 mg/dl), thấp nhất trong nhóm chuột cho uống bột dinh dưỡng liều 1,84 g/kg (144,80 mg/dl), tuy nhiên các lô tại các thời điểm không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p>0,05$).

Bảng 3-43. Chỉ số cholesterol trong máu chuột ở các lô thí nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	Cholesterol (mg/dl)		
			Ban đầu	Sau 1 tháng	Sau 2 tháng
Cao loại tủy	1	1,85	147,66 ± 5,84	148,87 ± 5,77	148,91 ± 6,86
	2	3,70	145,54 ± 8,39	149,54 ± 4,29	151,55 ± 6,99
Bột thủy phân	3	1,84	148,80 ± 3,40	150,98 ± 4,84	146,77 ± 2,17
	4	3,68	143,10 ± 3,61	143,69 ± 4,61	148,21 ± 5,67
Bột dinh dưỡng	5	1,84	142,13 ± 3,45	144,21 ± 3,51	144,80 ± 5,73
	6	3,68	146,14 ± 11,03	148,87 ± 5,06	146,84 ± 9,43
Đối chứng	7	-	141,58 ± 5,13	142,58 ± 5,51	145,28 ± 0,64

Bảng 3-44. Chỉ số Triglycerid trong máu chuột ở các lô thí nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	Triglycerid (mg/dl)		
			Ban đầu	Sau 1 tháng	Sau 2 tháng
Cao loại tủy	1	1,85	107,40 ± 5,00	114,45 ± 8,27	121,21 ± 7,78
	2	3,70	100,84 ± 4,42	117,61 ± 8,14	125,50 ± 17,58
Bột thủy phân	3	1,84	110,69 ± 10,93	119,76 ± 3,79	119,17 ± 7,41
	4	3,68	104,71 ± 6,30	110,39 ± 9,57	120,25 ± 12,47
Bột dinh dưỡng	5	1,84	107,46 ± 4,32	110,02 ± 9,94	112,47 ± 8,62
	6	3,68	104,06 ± 2,13	101,39 ± 11,53	108,76 ± 21,50
Đối chứng	7	-	108,99 ± 6,57	117,44 ± 9,10	122,10 ± 11,57

Phân tích thống kê hàm lượng triglycerid của các lô thí nghiệm (Bảng 3-44) cho thấy ở lô đối chứng và các lô thí nghiệm không có sự khác biệt hàm lượng triglycerid tại các thời điểm sau một tháng và hai tháng so với thời điểm ban đầu. Hàm lượng triglycerid cao nhất ở nhóm chuột sử dụng cao loại tủy liều 3,70 g/kg, thấp nhất trong nhóm chuột sử dụng bột dinh dưỡng liều 3,68 g/kg. Tuy nhiên các giá trị này không có khác biệt so với các nhóm còn lại ($p > 0,05$).

3.6.2.5 Khối lượng tim, gan, thận và khảo sát vi thể

Bảng 3-45. Tỷ trọng gan, tim, thận so với khối lượng cơ thể chuột ở các lô thí nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	Khối lượng tương đối/cơ thể (%)		
			Gan	Tim	Thận
Cao loại tùy	1	1,85	4,71 ± 0,26	0,44 ± 0,03	1,21 ± 0,08
Bột thủy phân	2	3,70	4,64 ± 0,25	0,44 ± 0,02	1,21 ± 0,05
Bột dinh dưỡng	3	1,84	4,60 ± 0,46	0,45 ± 0,03	1,23 ± 0,17
	4	3,68	4,57 ± 0,49	0,44 ± 0,05	1,26 ± 0,15
	5	1,84	4,83 ± 0,27	0,47 ± 0,02	1,20 ± 0,09
	6	3,68	4,78 ± 0,43	0,46 ± 0,02	1,24 ± 0,07
Đối chứng	7	-	4,81 ± 0,22	0,45 ± 0,01	1,23 ± 0,07

Sau hai tháng cho chuột uống cao cá sấu và các sản phẩm từ cao cá sấu cho thấy khối lượng tương đối của gan, tim, thận ở lô đối chứng và các lô nghiên cứu không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê (Bảng 3-45).

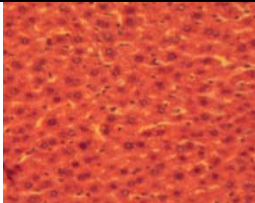
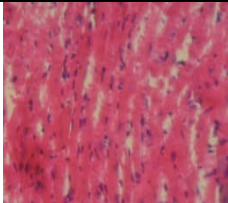
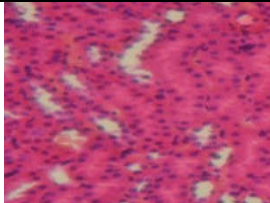
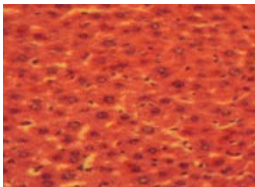

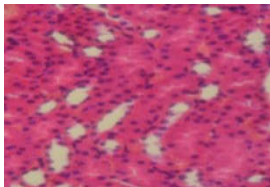
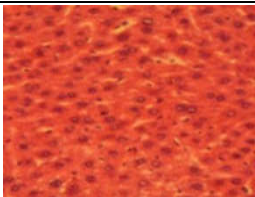
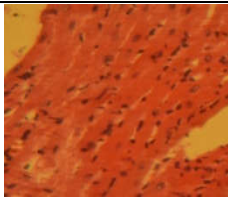
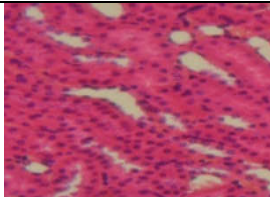
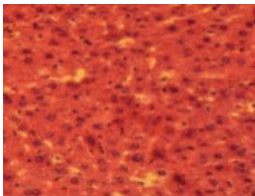
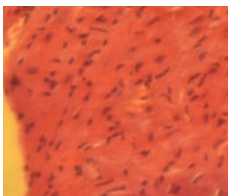
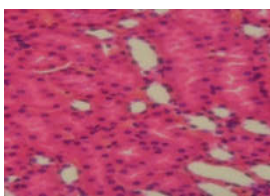
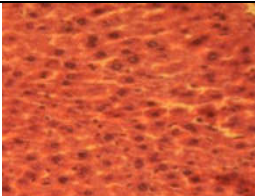
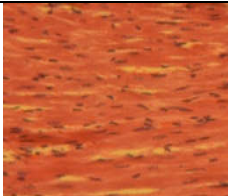
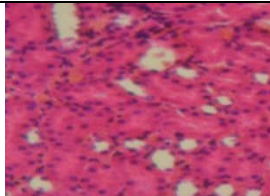
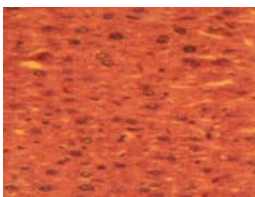
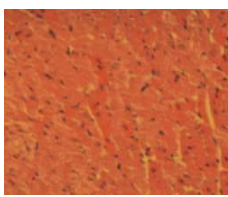
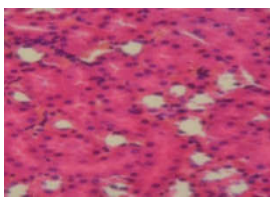
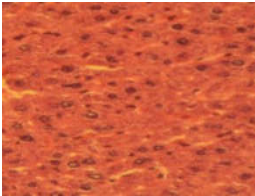
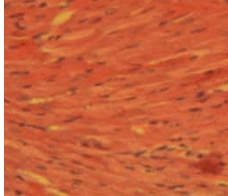

Nhận định ban đầu cho thấy hình dạng, màu sắc bên ngoài của các cơ quan tim, gan, thận không có sự khác biệt giữa các lô sử dụng sản phẩm cao cá sấu và lô đối chứng, tiến hành lấy gan, thận, tim làm tiêu bản để đánh giá vi thể (Hình 3.28).

Kết quả quan sát tiêu bản vi thể gan ở tất cả các lô cho thấy, các bè gan có cấu trúc bình thường, thành mạch máu không có bất thường, không tìm thấy các ổ viêm, các tế bào phân tán đều, không có hiện tượng hủy hoại tế bào gan. Không có sự khác biệt giữa hình ảnh vi thể gan nhóm đối chứng và các nhóm nghiên cứu.

Đối với hình ảnh vi thể thận, cho thấy cấu trúc thận ở trong giới hạn bình thường, không thấy hiện tượng hoại tử, không thấy ổ viêm. Như vậy tiêu bản vi thể thận ở các nhóm nghiên cứu không có khác biệt so với nhóm đối chứng.

Kết quả quan sát tiêu bản vi thể tim cũng có kết quả tương tự, cấu trúc thành mạch, tế bào tim không có sự khác biệt so với nhóm đối chứng.

Hình 3.28. Tiêu bản vi thể gan, tim, thận chuột ở các lô nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu	Liều (g/kg)	Hình ảnh vi thể (HE - 40X)		
		Gan	Tim	Thận
Cao loại tủy	1,85			
	3,70			
Bột thủy phân	1,84			
	3,68			
Bột dinh dưỡng	1,84			
	3,68			
Đối chứng	-			

Nhận xét

Theo hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu ban hành kèm quyết định 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015, mức liều thử cho thí nghiệm độc tính bán trường diễn phải lựa chọn sao cho có ý nghĩa trong việc đánh giá về khả năng an toàn hay mức độ gây độc của mẫu thử, mức liều thử thường được tính từ các thông tin thu được khi thử nghiệm độc tố cấp tính. Ở đây chúng tôi lựa chọn liều thử ở mức 1/10 và 1/20 so với liều cao nhất có thể cho chuột uống, tính toán được liều dùng trong thử nghiệm độc tính bán trường diễn đối với cao loại tủy là 3,7 g/kg và 1,85 g/kg, 3,68 g/kg và 1,84 g/kg đối với sản phẩm dạng sáy phun.

So với liều khuyến cáo sử dụng cao xương cá sấu và cao một số động vật cho thấy, liều 3,7 g/kg và 1,85 g/kg trên chuột nhắt trắng khi suy liều sang người nặng 50 kg được lần lượt hai liều tương ứng 15,73 g/kg và 7,86 g/kg, với dạng sản phẩm sáy phun khi chuyển liều sang người khối lượng trung bình 50 kg cũng được hai liều tương ứng 15,64 g/kg và 7,82 g/kg, như vậy các liều lựa chọn nằm trong khoảng giữa và cao hơn liều dự kiến dùng trên người, phù hợp theo tiêu chí đánh giá độc tính bán trường diễn, liều này cũng phù hợp với một số nghiên cứu.

Chuột sau khi uống cao cá sấu và các sản phẩm từ cao cá sấu vẫn hoạt động ăn uống bài tiết bình thường, mức độ tăng khối lượng giữa các lô không có sự khác biệt.

Xét nghiệm công thức máu chuột ở các lô thí nghiệm cho thấy, các chỉ số nhóm hồng cầu như số lượng hồng cầu, hemoglobin, hematocrit đều tăng nhẹ, không có sự khác biệt so với nhóm chứng. Số lượng bạch cầu và tiểu cầu ở tất cả các lô đều ở mức bình thường so với nhóm chứng.

Để tìm hiểu sâu hơn ảnh hưởng của cao cá sấu và các sản phẩm liên quan lên các chức năng gan, thận, thành tim mạch, các chỉ tiêu huyết học được xét nghiệm thêm. Kết quả cho thấy, các chỉ tiêu nhóm chức năng gan như bilirubin, GOT, GPT, protein toàn phần thay đổi không khác biệt so với nhóm đối chứng. Các chỉ tiêu sinh hóa thận như urea, creatinin và nhóm cholesterol, triglycerid sau thời gian một tháng, hai tháng cũng không có sự khác biệt với thời điểm ban đầu thí nghiệm. Tiến hành phẫu thuật các nhóm chuột thí nghiệm, quan sát ngoại quan và vi thể cho thấy không

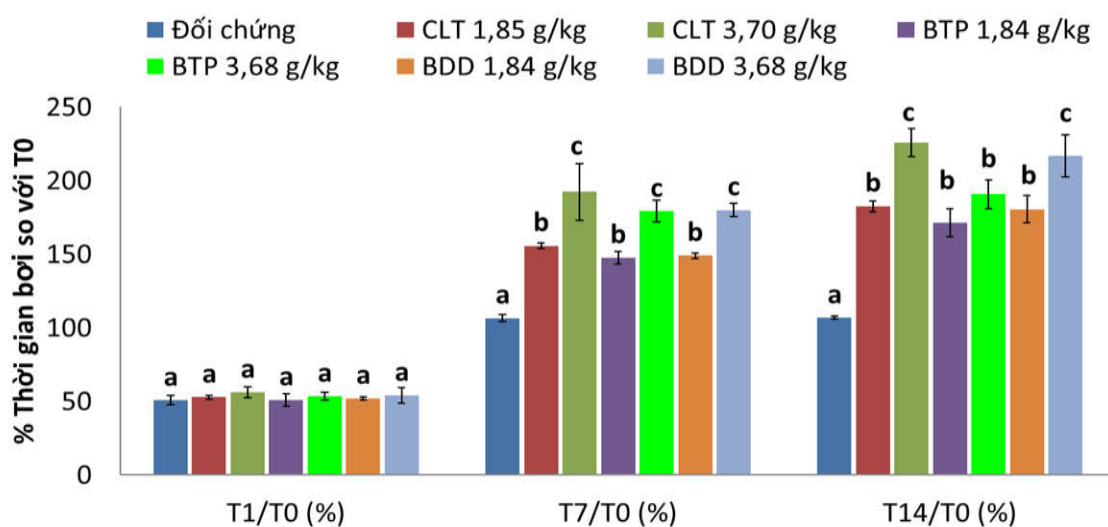
có sự khác biệt về hình dạng và cấu trúc gan, thận, tim giữa nhóm đối chứng và các nhóm thí nghiệm. Như vậy cao cá sấu và các sản phẩm bột dinh dưỡng từ cao cá sấu không có tác động lên chức năng gan, thận, không làm tăng lipid và cholesterol trong máu chuột nghiên cứu.

Tóm lại, cao cá sấu liều 1,85 g/kg, 3,70 g/kg, bột thủy phân và bột dinh dưỡng liều 1,84 g/kg, 3,68 g/kg không thể hiện độc tính bán trường diễn trên chuột nhắt trắng.

3.7 Nghiên cứu tác dụng hỗ trợ sức khỏe của sản phẩm cao xương cá sấu

3.7.1 Đánh giá khả năng tăng lực (mô hình chuột bơi kiệt sức Brekhman)

Thời điểm T_1/T_0 : tỉ lệ % thời gian bơi ở lô uống cao cá sấu và các sản phẩm bột thủy phân từ cá sấu không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy cao cá sấu và các sản phẩm liên quan ở các liều khác nhau không thể hiện tác dụng tăng lực tức thời.



Hình 3.29. Tỉ lệ % thời gian bơi ở các thời điểm $T_{1\text{giờ}}$, $T_{7\text{ngày}}$, $T_{14\text{ngày}}$ so với T_0 ở các lô thử nghiệm

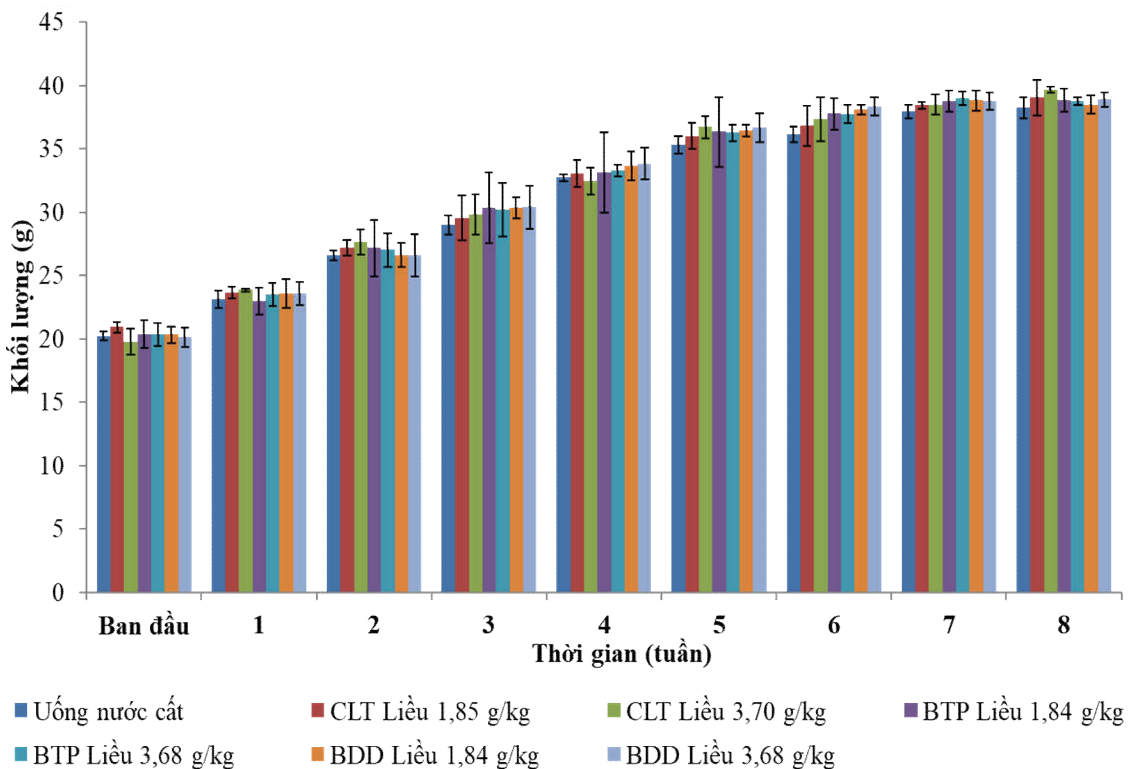
Thời điểm T_7/T_0 : Tỉ lệ % thời gian bơi ở các lô uống cao cá sấu và sản phẩm từ cao cá sấu tăng cao so với lô chứng và đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Tỉ lệ % thời gian bơi sau 7 ngày cao nhất ở lô chuột thí nghiệm sử dụng cao loại tủy liều 3,70 g/kg (192,35%), tiếp theo đó là nhóm chuột sử dụng bột dinh dưỡng liều 3,68 g/kg

(180,10%). Không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê giữa các lô chuột thí nghiệm cho uống cao loại tùy liều 3,70 g/kg, bột thủy phân liều 3,68 g/kg, bột dinh dưỡng 3,68 g/kg ($p>0,05$). Như vậy, cao cá sấu và các sản phẩm có tác dụng tăng lực sau 7 ngày sử dụng.

Thời điểm T_{14}/T_0 : Tỷ lệ % thời gian bơi ở các lô uống cao cá sấu và sản phẩm từ cao cá sấu tăng cao so với lô chứng và đạt ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). Tỷ lệ tăng cao nhất vẫn ở lô chuột thí nghiệm sử dụng cao loại tùy liều 3,70 g/kg (225,85%), và không có sự khác biệt với tỷ lệ % thời gian bơi ở lô chuột sử dụng bột dinh dưỡng liều 3,68 g/kg (217 %). Như vậy, cao cá sấu và các sản phẩm thể hiện tác dụng tăng lực sau 14 ngày sử dụng.

3.7.2 Đánh giá khối lượng chuột và chiều dài cơ thể chuột

Về tình trạng chung, ở các lô sử dụng cao cá sấu và sản phẩm bổ sung cao cá sấu, chuột hoạt động, ăn uống, bài tiết bình thường, không có sự khác biệt nào so với lô đối chứng sử dụng nước cất.



Hình 3.30. Biến đổi khối lượng các nhóm chuột trong quá trình uống cao và thực phẩm bổ sung cao cá sấu

Theo dõi biến động khối lượng của chuột thí nghiệm cho thấy ở tất cả các lô nghiên cứu khối lượng chuột đều tăng so với trước thí nghiệm ($p < 0,05$). Tại cùng thời điểm khối lượng cơ thể chuột không có sự khác biệt giữa các lô thí nghiệm và lô đối chứng ($p > 0,05$). Như vậy cao cá sấu liều 1,85 g/kg, 3,70 g/kg và bột dinh dưỡng liều 1,84 g/kg, 3,46 g/kg không ảnh hưởng đến mức độ tăng khối lượng của chuột nghiên cứu.

3.7.3 Đánh giá ảnh hưởng của sản phẩm cao lên độ bền chắc của xương chuột

Trong thí nghiệm này chuột được cho ăn cao cá sấu và các sản phẩm liên quan, sau 8 tuần cho ăn liên tục lấy xương chuột đo lực gãy bằng máy đo lực gãy Zwick Roell, kết quả được trình bày trong bảng Bảng 3-46.

Bảng 3-46. Lực gãy xương của các lô chuột thí nghiệm khi dùng sản phẩm cao

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	Lực gãy xương (N)
Cao loại tủy	1	1,85	17,77 ± 2,22 ^{bc}
	2	3,70	20,47 ± 0,59 ^c
Bột thủy phân	3	1,84	16,23 ± 1,50 ^b
	4	3,68	18,25 ± 1,15 ^{bc}
Bột dinh dưỡng	5	1,84	17,61 ± 0,39 ^{bc}
	6	3,68	18,95 ± 0,75 ^{bc}
Đối chứng	7	Nước cất	11,42 ± 2,50 ^a

^{abc} Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có ký tự theo sau không giống nhau có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$)

Kết quả đo cho thấy có sự khác biệt về độ chắc của xương trong các lô thí nghiệm so với lô đối chứng đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Lực gãy xương cao nhất ở lô chuột thí nghiệm cho ăn cao loại tủy liều 3,70 g/kg (20,47 N). Đối với hai sản phẩm bột thủy phân đối chứng và bột dinh dưỡng liều 3,68 g/kg có kết quả độ chắc của xương không khác biệt so với lô chuột thí nghiệm cho ăn cao loại tủy liều cao 3,70 g/kg ($p > 0,05$). Như vậy, cao cá sấu và các sản phẩm từ cao cá sấu đang nghiên cứu đã thể hiện được tính tốt trên xương đối tượng thí nghiệm.

Nhận xét

Kết quả của một vài tác dụng hỗ trợ sức khỏe cho thấy các sản phẩm từ cao cá sấu có tác dụng hỗ trợ sức khỏe tốt, tác dụng tăng lực cao nhất vẫn thuộc nhóm cao loại tủy. Mặc dù sản phẩm bột thủy phân và bột dinh dưỡng cho tác dụng tăng lực thấp hơn nhưng vẫn không có sự khác biệt so với tác dụng tăng lực do cao xương thô tạo ra.

Kết quả cũng cho thấy tác dụng rất tốt của sản phẩm bột dinh dưỡng, nếu so sánh giữa hai sản phẩm bột thủy phân và bột dinh dưỡng, cho thấy hai sản phẩm có các thành phần cơ bản như protein, collagen, amino acid không khác biệt nhau nhưng tạo ra hiệu quả dược tính khác nhau. Trong thí nghiệm đánh giá tác dụng tăng lực, ở lô chuột cho uống bột dinh dưỡng liều 3,68 g/kg kết quả tăng lực (217%) cao hơn so với tác dụng của bột thủy phân liều 3,68 g/kg (191%), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong thí nghiệm đo lực gãy xương, lô chuột cho uống bột dinh dưỡng liều 3,68 g/kg lực gãy xương có xu hướng lớn hơn nhưng vẫn chưa có ý nghĩa thống kê so với lô chuột cho uống bột thủy phân liều 3,68 g/kg. Kết quả này có thể do bổ sung thêm một số tác dụng hỗ trợ sức khỏe tốt của gừng và đường phèn đối với cơ thể chuột thí nghiệm.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

- Nghiên cứu đã thiết lập được quy trình cải thiện so với truyền thống để trích cao (collagen) từ xương cá sấu. Cụ thể, việc nấu trích được thực hiện hai lần ở 121°C, mỗi lần thực hiện 2 giờ. Dung dịch sau khi trích ly được cô đặc ở áp suất chân không 0,8kg.cm⁻². Sản phẩm nấu thử nghiệm có thời gian trích ly 4 giờ (so với 168 giờ theo cách truyền thống), hiệu suất trích ly collagen 13,86% (so với 7,28%) và hàm lượng collagen cao hơn (đạt 64,31% so với 61,37%). Ngoài ra, màu của sản phẩm nấu thử nghiệm đã được cải thiện, nhờ rút ngắn thời gian trích và cô đặc ở áp suất chân không nên nhiệt độ cô đặc thấp hơn.

- Khi thủy phân protein thịt cá sấu bằng các enzyme thương mại. Loại enzyme và tỷ lệ sử dụng có ảnh hưởng đến độ thủy phân và tốc độ thủy phân. Ba loại enzyme là neutral, alcalase, và flavourzyme được so sánh đánh giá và neutral cho hiệu quả tốt hơn về độ thủy phân. Thí nghiệm đa biến được thực hiện và điều kiện phù hợp nhất để thủy phân bằng enzyme neutral là nhiệt độ 61,8°C, pH 7,5 và tỷ lệ enzyme/ cơ chất 3,3%. Ở điều kiện này, độ thủy phân protein thu được là 39,70% và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH của dịch sau thủy phân là 80%.

- Sấy phun dịch thủy phân thịt cá sấu thành dạng bột sẽ tăng tính bảo quản và tính linh hoạt trong ứng dụng. Quy trình sấy phun được nghiên cứu qua đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố bao gồm hàm lượng chất trợ sấy là maltodextrin bổ sung, nhiệt độ không khí sấy, và lưu lượng dòng nhập liệu. Sau các thí nghiệm một biến đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố đã nêu đến tỷ lệ thu hồi vật chất khô, tỷ lệ thu hồi protein, và hoạt tính kháng oxi hóa của bột thu được. Hai yếu tố được chọn để thực hiện thí nghiệm đa biến để chọn điều kiện sấy phun phù hợp nhất là tỷ lệ bổ sung chất trợ sấy và nhiệt độ không khí sấy. Việc bổ sung chất trợ sấy là cần thiết để có hiệu quả về thu hồi bột, tránh dính thành thiết bị và khắc phục tính vón cục của sản phẩm thu được sau sấy. Điều kiện phù hợp nhất để sấy phun thu được là bổ sung 19,46% chất trợ sấy maltodextrin, nhiệt độ không khí sấy là 143°C và tốc độ bơm dòng nhập liệu

là 10 ml.phút⁻¹. Với các thông số này giúp cho hiệu suất thu hồi bột đạt 69,51%, hiệu suất thu hồi protein đạt 76,94% và các chỉ tiêu chất lượng của bột như độ ẩm, hoạt tính kháng oxy hóa lần lượt đạt giá trị 5,33% và 1,87 mg.ml⁻¹.

- Sản phẩm giá trị gia tăng dạng bột, từ phối trộn các thành phần được chế biến thử nghiệm. Công thức phối trộn với 40% đường phèn, 1,5% acid ascorbic và 12% bột gừng cho có kết quả cảm quan tốt nhất. Sản phẩm đã được xét nghiệm cho kết quả đạt tiêu chuẩn về vi sinh vật và kim loại nặng cho sử dụng ở người.

- Để đánh giá kỹ hơn về tính an toàn của cao cá sấu và sản phẩm bột kết hợp, các thí nghiệm được thực hiện để đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn trên mô hình chuột thí nghiệm. Kết quả cho thấy cao cá sấu và sản phẩm bột dinh dưỡng bổ sung cao xương cá sấu không thể hiện độc tính trên chuột thí nghiệm, với liều cao nhất là 37 g/kg cao loại tủy; 36,75 g/kg bột thủy phân; 36,65 g/kg bột dinh dưỡng.

- Kết quả đánh giá ban đầu về tác dụng hỗ trợ sức khỏe của cao và sản phẩm bột trên mô hình chuột rất khích lệ và có tính tiềm năng ứng dụng cao. Cụ thể, cao xương cá sấu, bột thịt cá sấu thủy phân và sản phẩm bột dinh dưỡng ở liều 1,84 g/kg và 3,68 g/kg cho thấy sự cải thiện có ý nghĩa về tác dụng tăng lực thông qua thử nghiệm chuột theo mô hình bơi kiệt sức sau thời gian 8 tuần cho xương chuột chắc hơn, thể hiện qua giá trị lực gãy gãy xương cao hơn có ý nghĩa so với mẫu chuột đối chứng không dùng cao xương cá sấu.

Kiến nghị

Qua các nội dung nghiên cứu phát triển sản phẩm thực phẩm từ nguyên liệu cá sấu, thử nghiệm tác dụng hỗ trợ sức khỏe của các sản phẩm trên chuột, nhóm các sản phẩm này có tiềm năng ứng dụng, nhưng để rõ hơn cần triển khai thêm:

- Cải thiện tính cảm quan của sản phẩm: giảm mùi tanh để tiếp cận tất cả đối tượng người tiêu dùng.
- Nghiên cứu đa dạng các loại sản phẩm sản xuất thử nghiệm đưa vào thị trường.

- Ứng dụng sản phẩm cao để làm thực phẩm chức năng và cần khai thác được tính có lợi của cao trích collagen.
- Tiến đến nghiên cứu lâm sàng về chức năng của cao cá sấu, cũng như của sản phẩm thực phẩm bổ sung trên sức khỏe của cơ bắp và xương ở người.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Hong Phung Vo Cam**, Tan Hoang Dang, Thanh Pham Tang Thanh, Huynh Cang Mai, Don Dinh Le, Thien Le Trung (2021). Spray drying conditions for protein hydrolysate of crocodile meat. Food Research (1): 140-148 (February 2021).
2. **Phùng Võ Cẩm Hồng**, Trần Đại Nhựt, Lê Đình Đôn, Lê Trung Thiên (2017). “Cải thiện hiệu suất trích ly collagen trong quy trình nấu trích truyền thống”. Số 24, kỳ 2, 12.2017. Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn.

HOẠT ĐỘNG NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

1. Poster tại hội nghị SAE: **Phùng Võ Cẩm Hồng**, Nguyễn Trọng Sinh, Đồng Thị Anh Đào, Lê Đình Đôn, Lê Trung Thiên (2020). Nghiên cứu bổ sung chất điều vị nhằm cải thiện chất lượng của bột collagen thủy phân từ xương cá sấu. November 18 -19, 2020. Nong Lam University, HCMC, Vietnam
2. Proceeding Hội thảo: **Vo Cam Hong Phung**, Hoang Tan Dang, Tang Thanh Thanh Pham, Dinh Don Le, Thien Trung Le (2017). Research on spray drying conditions for protein hydrolysate of crocodile meat. “Safety and quality in food chain”. November 12 -14, 2017. Nong Lam University, HCMC, Vietnam.
3. Poster tại hội nghị quốc tế: **Vo Cam Hong Phung**, Thi Bich Hanh Huynh, Trung Thien Le, Dinh Don Le (2015). Enzymatic hydrolysis of crocodile meat protein. “Towards a more efficient use of natural resources”. November 24-26, 2015. Nha Trang University, Nha Trang, Vietnam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abadio, F., Domingues, A.M., Borges, S.V., and Oliveira, V. (2004). Physical properties of powdered pineapple (*Ananas comosus*) juice effect of malt dextrin concentration and atomization speed. *Journal of Food Engineering*, 64, 285-287.
2. Adhikari, B., Howes, T., Bhandari, B., and Troung, V. (2004). Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich foods during convective drying: experiments and modelling. *Journal of Food Engineering*, 62, 53-68.
3. Amisshah, J. (2012). Bioactive properties of salmon skin protein hydrolysates. Department of Bioresource Engineering Macdonald Campus, McGill University, Montreal, Quebec, page 44.
4. Aoe, S., Kato, K., Takada, Y., Toba, Y., and Yamamura, J. (2004). Preparations comprising collagen, vitamin D3 and calcium for strengthening bone. EP0798001 B1.
5. Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A., and Hara, K. (2008). Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. *Food Chemistry*, 108, 49-54.
6. Beilken, S., Eustace, I., and Tume, R. (2007). Composition of new meats: analyses, nutrient composition of innovative meat industries. Rural Industries Research and Development Corporation - Australian Government. p.59.
7. Benjakul, S., and Morrissey, M. (1997). Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes. *Journal of Agri. and Food Chemistry*, 45, 3423- 3430.
8. Bernardini, R., Harnedy, P.A., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A., and Hayes, M.X. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124, 1296-1307.
9. Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., and Lalitha, R. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource technology*, 99 2, 335-43.
10. Bhaskar, N., Modi, V., Govindaraju, K., Radha, C., and Lalitha, R. (2007). Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource technology*, 98 2, 388-94.
11. Bộ Y Tế (2007). QĐ 46/2007 Về việc ban hành "Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm".

12. Buckley, M., Collins, M., and Thomas-Oates, J.(2008). A method of isolating the collagen (I) alpha2 chain carboxyteleopeptide for species identification in bone fragments. *Analytical biochemistry*,374,2,325-34.
13. Cao Xuân Thủy (2013). Nghiên cứu công nghệ sản xuất đạm cá phân lập (FPI – Fish protein isolate) từ phế phụ liệu chế biến cá tra. Đề tài NCKH cấp Bộ. Trường ĐH Công nghiệp thực phẩm TP.HCM.
14. Cai, Y.Z., and Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried amaranthus betacyanin pigments. *Journal of Food Science* 65 (6): 1248 -1252.
15. Chegini, G., and Ghobadian, B. (2007). Spray dryer parameters for fruit juice drying. *World Journal of Agricultural Sciences*,3 (2): 230 – 236.
16. Chegini, G.R., and Ghobadian, B. (2005). Effect of spray drying conditions on physical properties of Orange juice powder. *Drying Technology*,23: 657 -668.
17. Chemat, F., Zill-e-Huma, and Khan, M.K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonictv Sonochemistry*, 18: 813–835.
18. Ding, J., Li, Y., Xu, J., Su, X., Gao, X., and Yue, F. (2011). Study on effect of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation. *Food Hydrocolloids*, 25, 1350-1353.
19. Diniz, F.M., and Martin, A.M. (1997). Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the hydrolysates. *Int'l Journal of Food Sciences and Nutrition* 48 (3):191- 200.
20. Đỗ Tất Lợi (2006). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. NXB Y Học.
21. Fang, X., Xie, N., Chen, X., Yu, H., and Chen, J. (2012). Optimization of antioxidant hydrolysate production from flying squid muscle protein using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing* 90(4):676-682.
22. Fang, Z., and Bhandari, B.R. (2012). Comparing the efficiency of protein and maltodextrin spray drying of bayberry juice. *Food Research Int'l*, 48: 478 – 483.
23. Gabas, A.L., Telis, V.R., Sobral, P., and Telis-Romero, J. (2007). Effect of maltodextrin and arabic gum in water vapor sorption thermodynamic properties of vacuum dried pineapple pulp powder. *Journal of Food Engineering*,82,246-252.
24. Ghorbel, S., Souissi, N., Triki-Ellouz, Y., Dufossé, L., Guérard, F., and Nasri, M. (2005). Preparation and testing of Sardinella protein hydrolysates as nitrogen source for extracellular lipase production by *Rhizopus oryzae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 33-38.

25. Goula, A.M., and Adamopoulos, K. (2005). Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. The effect on powder properties. *Journal of Food Engineering*, 66, 35-42.
26. Goula, A.M., and Adamopoulos, K. (2008). Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. Powder Properties. *Drying Technology*, 26, 726 - 737.
27. Grabowski, J., Truong, V., and Daubert, C.R. (2006). Spray- Drying of Amylase Hydrolyzed Sweetpotato Puree and Physicochemical Properties of Powder. *Journal of Food Science*, 71, 12.
28. 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: 489 - 498.
29. Hoffman, L., Fisher, P., and Sales, J. (2000). Carcass and meat characteristics of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). *Journal of Sci. Food and Agri.*, 80, 390-396.
30. Hoyle, N., and Merritt, J.H. (1994). Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59, 76-79.
31. Hồ Viết Quý, 2006. *Phân tích Hóa lý*. NXB Giáo Dục, 571 trang.
32. Kiew, P.L., and Don, M.M. (2013). Screening of significant factors in collagen extraction from hybrid Clarias sp. using a statistical tool. *International food research journal*, 20, 1913-1920.
33. Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., and Shahidi, F. (2010). Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry*, 119, 1519-1526.
34. Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., and Tanaka, M. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 89, 363-372.
35. Koli, J.M., Basu, S., Nayak, B., Patange, S., Pagarkar, A.U., and Gudipati, V. (2012). Functional characteristics of gelatin extracted from skin and bone of Tiger-toothed croaker (*Otolithes ruber*) and Pink perch (*Nemipterus japonicus*). *Food and Bioproducts Processing*, 90, 555-562.
36. Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F., Infante, J.Z., and Cahu, C. (2007). Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular and integrative physiology*, 147 1, 205-14.

37. Kristinsson, H., and Rasco, B. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 43 - 81.
38. Kuldiloke, J. (2002). Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetable juices.
39. Kurozawa, L., Park, K., and Hubinger, M. (2009). Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate. *Journal of Food Engineering*, 94, 326-333.
40. Kurozawa, L., Park, K., and Hubinger, M. (2008). Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. *Journal of food science*, 73 5, C405-12.
41. Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Đặng Văn Thu, Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi và Lê Doãn Diên (2002). *Hóa sinh công nghiệp*. NXB KH-KT Hà Nội, tr 105-111.
42. Lê Thị Biên, Võ Văn Sự và Phạm Sỹ Tiệp (2006). *Kỹ thuật chăn nuôi một số động vật quý hiếm*. Nhà xuất bản Lao động – Xã hội, tr 132 - 156.
43. Lê Văn Việt Mẫn, Lại Quốc Đạt, Nguyễn Thị Hiền, Tôn Nữ Minh Nguyệt và Trần Thị Thu Trà (2010). *Quá trình hóa học. Trong Công nghệ chế biến thực phẩm*. NXB ĐH Quốc gia TP.HCM, VN, 291 - 300.
44. Li, D., Mu, C., Cai, S., and Lin, W. (2009). Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. *Ultrasonics sonochemistry*, 16 5, 605-9.
45. Li, H., Pordesimo, L.O., and Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37, 731-738.
46. Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., and Espe, M. (2002). Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease. *Process Biochemistry*, 37, 1263-1269.
47. Li-li, C., Li, Z., Hua, L., Huo-gen, H., and Shan, W. (2011). Extraction and characterization of collagen from the eel Bone. 2011 International Conference on New Technology of Agricultural, 1051-1055.
48. Liu, D., Liang, L., Regenstein, J., and Zhou, P. (2012). Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*, 133, 1441-1448.
49. Liu, F., Liu, C., Lorena, D., Zhang, X., and Fu, Z. (2012). Evaluation of the antioxidant activity of collagen peptide additive extracted from cod Skin. *Journal of Environmental Protection and Ecology* 13(3A): 1836–1841.
50. Li, Guixia & Wan, Yunfei & Song, Xuan & Wang, Ying & Zan, Linsen & Zhu, J.. (2018). Effects of Various Processing Methods on the Ultrastructure of Tendon Collagen Fibrils from Qinchuan Beef Cattle Observed with Atomic

- Force Microscopy. *Journal of Food Quality*. 2018. 1-10. 10.1155 /2018/9090831.
51. Lu, X., Jiong, C., Chen, M.Z., Lü, J.N., Shi, Y., and Li, H.Y. (2010). Hydrolysates of swim bladder collagen from miiuy croaker, *Miichthys miiuy*, enhances learning and memory in mice. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 8, 149-156.
 52. McCarthy, A., O'callaghan, Y., and O'Brien, N. (2013). Protein Hydrolysates from Agricultural Crops—Bioactivity and Potential for Functional Food Development. *Agriculture*, 3, 1-19.
 53. Masters, K. (1991). *Spray Drying Handbook*, 5rd ed. Longman Scientific and Technical, England.
 54. Nagai, T. (2000). Isolation of collagen from fish waste material — skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68, 277-281.
 55. Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết, Lê Thị Thủy Tiên, Tạ Thu Hằng, Huỳnh Ngọc Oanh, Nguyễn Thúy Hương, Phan Thị Huyền (2004). *Công nghệ enzyme*, NXB Đại học Quốc Gia Tp.HCM
 56. Nguyễn Minh Đức (2013). Nghiên cứu thành phần cấu tạo tiêu chuẩn và tác dụng tiền lâm sàng của xương cá sấu hoa cà ứng dụng trong điều trị bệnh tạo xương bất toàn (*Osteogenesis Imperfecta*). Đại học Y Dược TP. HCM.
 57. Nguyễn Thị Mỹ Hương (2012). Sản xuất sản phẩm thủy phân protein từ đầu cá ngừ vây vàng bằng protease thương mại. *Tạp chí KH công nghệ-thủy sản*, 2: 25-30.
 58. Nguyễn Trọng Cẩn và Đỗ Minh Phụng (1990). *Công nghệ chế biến thực phẩm thủy sản tập 2- Ướp muối, chế biến nước mắm, chế biến khô, thức ăn chín*. NXB Nông nghiệp, TP HCM, trang 95-115.
 59. Nguyễn Trọng Cẩn, Nguyễn Thị Hiền, Đỗ Thị Giang và Trần Thị Luyên (1998). *Công nghệ enzyme*. NXB Nông nghiệp TP.HCM, 378 trang.
 60. Nguyễn Trọng Sinh (2016). Khảo sát tác dụng dược lý của sản phẩm cao xương cá sấu. Luận văn Thạc sỹ CNSH, ĐH Bách khoa Tp.HCM.
 61. Nguyễn Văn Mùi (2012). *Enzyme học*. NXB Giáo Dục VN. 130 -198.
 62. OECD Guideline (2001). "425: Acute oral toxicity—Up-and-down procedure," OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
 63. Ogawa, M., Portier, R., Moody, M.W., Bell, J., Schexnayder, M., and Losso, J. (2004). Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chemistry*, 88, 495-501.

64. Omokanwaye, T., Wilson, O., Iravani, H., and Kariyawasam, P. (2010). "Extraction and Characterization of a Soluble Chicken Bone Collagen" in 26th Southern Biomedical Engineering Conference SBEC 2010, College Park, Maryland, USA, pp. 520-523.
65. Ovissipour, M., Benjakul, S., Safari, R., and Motamedzadegan, A. (2010). Fish protein hydrolysates production from yellow fin tuna *Thunnus albacares* head using Alcalase and Protamex. *International Aquatic Research*, 2, 87-95.
66. Papadakis, S., Gardeli, C., and Tzia, C. (2006). Spray Drying of Raisin Juice Concentrate. *Drying Technology*, 24, 173 - 180.
67. Pasteris, J.D., Wopenka, B., Freeman, J., Rogers, K., Valsami-Jones, E., Houwen, J.A., and Silva, M. (2004). Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. *Biomaterials*, 25 2, 229-38.
68. Pasupuleti, V.K., Holmes, C., and Demain, A. (2010). Applications of Protein Hydrolysates in Biotechnology. In *Protein Hydrolysates in Biotechnology*. Springer, USA, pp. 1-9.
69. Pataridis, S., Eckhardt, A., Mikulíková, K., Sedláková, P., and Mikšík, I. (2009). Determination and Quantification of Collagen Types in Tissues Using HPLC-MS/MS. *Current Analytical Chemistry*, 5, 316-323.
70. Patel, R., Patel, M.P., and Suthar, A. (2009). Spray Drying Technology: an overview. *Indian journal of science and technology*, 2, 44-47.
71. Phạm Thị Trân Châu và Phan Tuấn Nghĩa (2006). *Công nghệ sinh học*, tập 3: Enzyme và ứng dụng. NXB Giáo dục, Việt Nam, 195 trang.
72. Rossi, D., Flôres, S.H., Venzke, J.G., and Ayub, M.A. (2009). Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein hydrolysate. *Revista De Nutricao-brazilian Journal of Nutrition*, 22, 879-885.
73. Rude, R. K., Singer, F. R., & Gruber, H. E. (2009). Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency. *Journal of the American College of Nutrition*, 28(2), 131-141.
74. Schmidt, C.G., and Salas-Mellado, M. (2009). Influence of alcalase and flavourzyme performance on the degree of hydrolysis of the proteins of chicken meat. *Quim. Nova* 32(5):1144-1150.
75. Shabde, V., and Hoo, K. (2008). Optimum controller design for a spray drying process. *Control Engineering Practice*, 16, 541-552.
76. Shoulders, M.D., and Raines, R. (2009). Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*, 78, 929-58.
77. Silva, V.M., Park, K., and Hubinger, M. (2010). Optimization of the enzymatic hydrolysis of mussel meat. *Journal of food science*, 75 1, C36-42.

78. Silvipriya, K.S., Krishna Kumar, K., Bhat, A.R., Dinesh Kumar, B., John, A., Lakshmanan, P.(2015). Collagen: Animal Sources and Biomedical Application. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 5(03), pp.123-127.
79. Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., and Kishimura, H. (2011). Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Food Chemistry,124,97-105.
80. Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Tp. HCM (2008). Tình hình gây nuôi và tiêu thụ sản phẩm cá sấu trên địa bàn TP.HCM 10/2008.
81. Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn TP. HCM (2013). Kết quả phát triển sản xuất và chuyển dịch cơ cấu nông nghiệp theo hướng nông nghiệp đô thị trên địa bàn thành phố năm 2013, kế hoạch 2014.
82. Soares, L.H., Marques, D.N., Albuquerque, P., and Ayub, M.A.(2000). Influence of some commercial proteases and enzymatic associations on the hydrolytic solubili-zation of deboned poultry meat proteins. Food Sci. and Tech. Int'l, 6, 301-306.
83. Szpak, P. (2011). Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphono-my and stable isotope analysis. Journal of Archaeological Science,38,3358-3372.
84. Taheri, A., Kenari, A.A., Gildberg, A., and Behnam, S. (2009). Extraction and physicochemical characterization of greater Lizardfish (*Saurida tumbil*) skin and bone gelatin. Journal of food science, 74 3, E160-5.
85. Tôn Thất Hưng (2013). Kết quả đột phá trong việc sử dụng cao xương cá sấu điều trị bệnh xương bất toàn - BV Chấn Thương Chính Hình Tp. HCM.
86. Tonon, R., Freitas, S.S., and Hubinger, M. (2011). Spray drying of açai (*euterpe oleraceae mart.*) juice: effect of inlet air temperature and type of carrier agent. Journal of Food Processing and Preservation, 35, 691-700.
87. Trần Minh Tâm (1998). *Các quá trình công nghệ trong chế biến nông sản thực phẩm*. NXB nông nghiệp TP. Hồ Chí Minh, trang 192-197.
88. Trần Minh Thông, Nguyễn Thị Thu Hương, Hà Quang Thanh và Nguyễn Minh Đức (2016). "Khảo sát mô học tác dụng của cao xương cá sấu hoa cà trên chuột nhắt trắng bị gây loãng xương bằng corticoid," TC Dược liệu, 1+2, trang 79-84.
89. Trần Thị Huyền, Nguyễn Anh Tuấn, Hoàng Ngọc Anh và Vũ Lệ Quyên (2012). Tách chiết collagen từ da cá Tra (*Pangasius hypophthalmus*) bằng phương pháp hóa học, Tạp chí KH - Công nghệ Thủy sản, số 2
90. Trần Thị Minh Tâm, Nguyễn Thị Thu Hương và Nguyễn Minh Đức (2015). "Nghiên cứu tác dụng tăng cường miễn dịch của cao xương cá sấu hoa cà," Tạp chí Dược liệu, vol. 20, trang 121.

91. Trần Thị Minh Tâm, Nguyễn Thị Thu Hương, Trần Văn Năm và Nguyễn Minh Đức (2014). "Khảo sát tác dụng tăng lực và tác dụng của cao xương Cá sấu hoa cà trên mô hình tăng acid uric máu thực nghiệm," Tạp chí Dược liệu, 19, tr. 362.
92. UBND Tp.HCM (2021). "Chương trình quản lý, phát triển cá sấu và động vật hoang dã trên địa bàn Tp.HCM: 2011 – 2015 và 2021 – 2025".
93. Vercruyse, L., Camp, J.V., and Smagghe, G. (2005). ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 21, 8106-15.
94. Westergaard, V. (2004). *Milk powder technology: evaporation and spray drying*. 5th edition, Copenhagen, Denmark. pp. 71 – 103
95. Wood, A., Ogawa, M., Portier, R., Schexnayder, M., Shirley, M., and Losso, J. (2008). Biochemical properties of alligator (*Alligator mississippiensis*) bone collagen. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry and molecular biology*, 151 3, 246-9.
96. White, J.A., Hart, R.J., and Fry, J.C. (1986). An evaluation of the waters Pico-Tag system for the amino acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry*, 170-177.
97. Xia, S.H., Wang, Z., and Xu, S.Y. (2007). Characteristics of *Bellamya purificata* snail foot protein and enzymatic hydrolysates. *Food Chemistry*, 101, 1188-1196.
98. Xingwu L, and Hong-jun L.(2012). Optimization of Microwave-assisted Extraction Process for Collagen from Pigskin, *Food science*, 33-06.
99. Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E.J., and Ahn, D. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat science*, 86 1, 15-31.
100. Zhang, Z., Li, G., and Shi, B. (2006). Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *Journal of The Society of Leather Tech. and Chemists*, 90, 23-28.
101. Zhang, Z., Wang, J., Ding, Y., Dai, X., and Li, Y. (2011). Oral administration of marine collagen peptides from Chum Salmon skin enhances cutaneous wound healing and angiogenesis in rats. *Journal of sci. of food and agri.*, 91 12, 2173-9.
102. Zhuang, Y., Li, B., and Zhao, X. (2009). The scavenging of free radical and oxygen species activities and hydration capacity of collagen hydrolysates from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin. *Journal of Ocean Uni. of China*, 8, 171-176.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Hình ảnh một số dụng cụ, thiết bị dùng trong đề tài



Hình 1. Hệ thống vô cơ mẫu



Hình 2. Máy chưng cất nitơ



Hình 3. Máy F-AAS (Varian)



Hình 4. Máy GF-AAS (Varian)



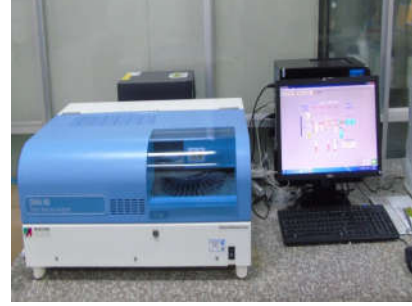
Hình 5. Máy HPLC



Hình 6. Máy UV-Vis (HP)



Hình 7. Kính hiển vi



Hình 8. Máy phân tích thủy ngân (Milestone)

Phụ lục 2. Điều kiện phản ứng của enzyme thí nghiệm do nhà cung cấp đề xuất

Enzyme	pH _{opt}	T _{opt} (°C)	Liều lượng khuyến cáo
Flavourzyme 500MG	5,5 ± 6,5	50 ± 55	0,5 ± 2 g / kg protein (0,05 - 0,2%)
Alcalase 2,4L	7 ± 8	45 ± 60	0,5 ± 1 g / kg protein (0,05 - 0,1%)
Neutral PL	5,5 ± 7,5	35 ± 60	1 ± 45 g / kg protein (0,1 - 4,5%)

Phụ lục 3. Đánh giá phân loại độc tính cấp theo giá trị LD₅₀ gần đúng

Nhóm	Mức độ độc cấp	Liều LD ₅₀ gần đúng
1	Cực kì độc	> 0 – 5 mg/kg

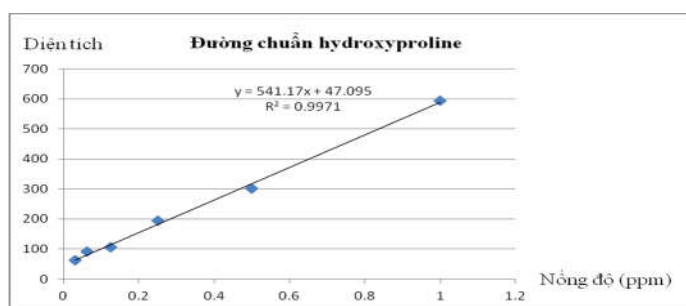
2	Rất độc	> 5 – 50 mg/kg
3	Độc	> 50 – 300 mg/kg
4	Độc trung bình	> 300 – 2000 mg/kg
5	Độc tính thấp	> 2000 – 5000 mg/kg
6	Gần như không độc	> 5000 mg/kg

Phụ Lục 4. Kết quả xây dựng qui trình phân tích collagen trong xương

Khảo sát lượng dung dịch tạo dẫn xuất

STT	Thể tích dung dịch (A) (μl)	Thể tích dung dịch (B) (μl)	Lần lặp lại	Thời gian lưu (phút)	Diện tích peak (mAU*phút)	RSD (%)
NT 1	5	10	1	1,028	561,2	2,04
	5	10	2	1,035	557,8	
	5	10	3	1,034	579,3	
NT 2	10	20	1	1,055	748,8	10,99
	10	20	2	1,019	612,5	
	10	20	3	1,045	634,6	
NT 3	20	30	1	1,039	608,5	7,32
	20	30	2	1,024	698,6	
	20	30	3	1,033	685,1	
NT 4	30	40	1	1,018	700,3	5,12
	30	40	2	1,031	654,3	
	30	40	3	1,040	634,1	

Xây dựng đường chuẩn hydroxyproline



Kết quả xác định hiệu suất thu hồi

STT	Mẫu	Lần lặp lại	Nồng độ thêm chuẩn lý thuyết (ppm)	Diện tích (mAU*phút)	Nồng độ thực tế (ppm)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hiệu suất thu hồi TB ± SD (%)
1	1	1	0	138,5	0,1689	-	-
2		2	0	141,1	0,1737	-	-

3	3	0	139,5	0,1708	-	-
4	1	0,05	164,4	0,2168	95,72	
5	2	2	170,0	0,2271	106,81	95,59 ± 11,27
6	3	0,05	162,3	0,2129	84,26	
7	1	0,15	224,1	0,3271	105,45	
8	3	2	209,6	0,3003	84,39	93,17 ± 10,96
9	3	0,15	212,3	0,3053	89,68	
10	1	0,2	229,8	0,3376	84,35	
11	4	2	243,2	0,3623	94,33	90,45 ± 5,35
12	3	0,2	239,8	0,3561	92,67	

Kết quả xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

STT	Mẫu	Lần lặp lại	Nồng độ (ppm)	S/N*
1	1	1	0,06	22,1
2		2	0,06	21,5
3		3	0,06	22,4
4	2	1	0,03	10,2
5		2	0,03	10,0
6		3	0,03	10,3
7	3	1	0,01	3,8
8		2	0,01	4,1
9		3	0,01	3,9

* S/N: Signal/ Noise (tín hiệu/ nhiễu đường nền)

Như vậy giá trị LOD = 0,01 ppm và LOQ = 0,03 ppm.

Phụ lục 5. Kết quả xây dựng đường chuẩn hydroxylproline

STT	Nồng độ (ppm)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích (mAU*phút)
1	1	1,039	593,8
2	0,5	1,049	302,1
3	0,25	1,055	193,7
4	0,125	1,051	105,7
5	0,0625	1,057	91,0
6	0,03125	1,057	61,7

Phụ lục 6. Thống kê Stagraphic của thí nghiệm 1 đối với dẫn xuất A, theo kiểu LSD

Multiple Range Tests for Dien tích by Nghiem thuc

Method: 95.0 percent LSD

Nghiem thuc	Count	Mean	Homogeneous Groups
-------------	-------	------	--------------------

10	3	566.1	x
40	3	662.9	x
30	3	664.067	x
20	3	665.3	x

<i>Constrat</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
10 - 20	*	-99.2	89.2977
10 - 30	*	-97.9667	89.2977
10 - 40	*	-96.8	89.2977
20 - 30		1.2333	89.2977
20 - 40		2.4	89.2977
30 - 40		1.16667	89.2977

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 3 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.

Phụ lục 7. Thống kê Stagraphic của thí nghiệm 1 đối với dẫn xuất B, theo kiểu LSD

ANOVA table for Dien tich by The tich A

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	2.16127E6	3	720425.	3.20	0.0835
Within groups	1.79945E6	8	224931.		
Total (Corr.)	3.96072E6	11			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of Dien tich into two components: a between- group component and a within- group component. The F-ratio, which in this case equals 3.20287, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is greater than or equal to 0.05, there is not a statistically significant difference between the mean Dien tich from one level of The tich A to another at the 5% significance level.

Phụ lục 8. Bảng Anova cho thí nghiệm 1

Multiple Range Tests for Dien tich by The tich A

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nghiem thuc</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
5	3	5661.0	x
30	3	6629.0	x
20	3	6640.67	x
10	3	6653.0	x
<i>Constrat</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	
5 - 10	*	-992.0	
5 - 20	*	-979.667	
5 - 30	*	-968.0	
10 - 20		12.333	
10 - 30		24.0	
20 - 30		11.6667	

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 3 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Duncan's multiple comparison procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

Phụ lục 9. Thông kê Stagraphic của thí nghiệm 1 đối với dẫn xuất A, theo kiểu Duncan

Multiple Range Tests for Dien tích by The tích A

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nghiem thuc</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
10	3	5661.0	x
40	3	6629.0	x
30	3	6640.67	x
20	3	6653.0	x
<i>Constrat</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	
10 - 20	*	-992.0	
10 - 30	*	-979.667	
10 - 40	*	-968.0	
20 - 30		12.333	
20 - 40		24.0	
30 - 40		11.6667	

* denotes a statistically significant difference.

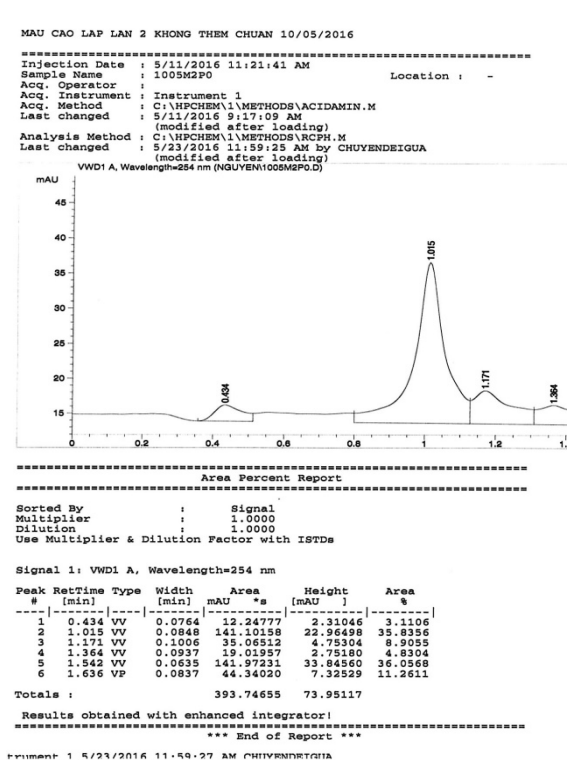
The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 3 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Duncan's multiple comparison procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0

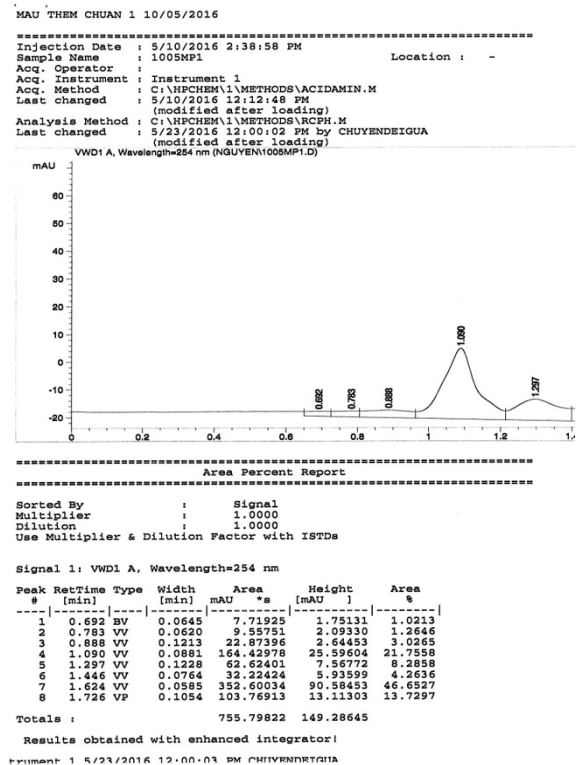
Phụ lục 10. Các hệ số của mẫu cao xương cá sấu sấy phun

ST T	Mẫu	Hệ số pha loãng F	Khối lượng mẫu (g)	Thể tích HCl 6N V ₁ (lít)	Thể tích mẫu được hút V ₂ (μl)	Thể tích định mức V ₃ (μl)
1	MP0	25	1,9261	0,01	2	2000
2	M2P0	25	1,9508	0,01	2	2000
3	M3P0	25	1,9128	0,01	2	2000

Phụ lục 11. Sắc ký đồ mẫu thêm chuẩn

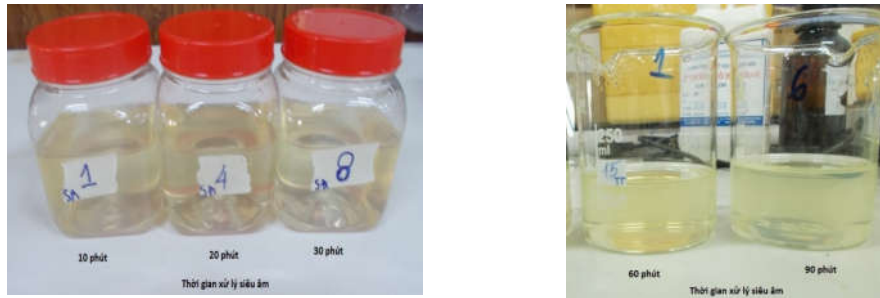


Mẫu không thêm chuẩn



Mẫu thêm chuẩn 0,05 ppm

Phụ lục 12. Dịch trích có hồ trợ siêu âm ở thời gian khác nhau



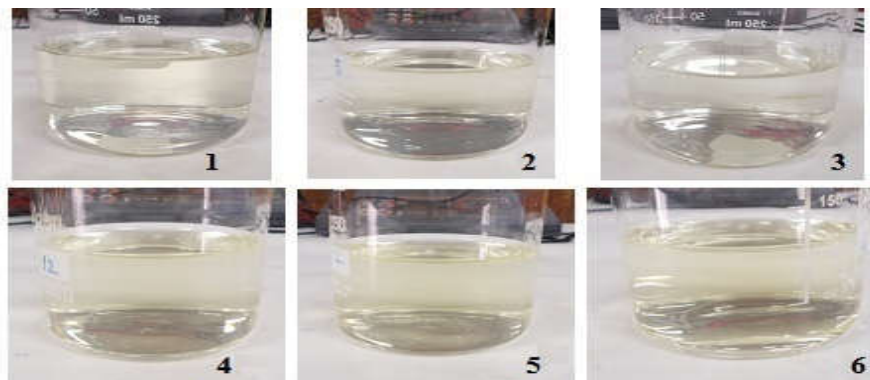
Phụ lục 13. Dịch trích nấu áp suất/ nhiệt độ cao sau 1 giờ



Phụ lục 14. Dịch trích nấu áp suất/ nhiệt độ cao sau 2 giờ

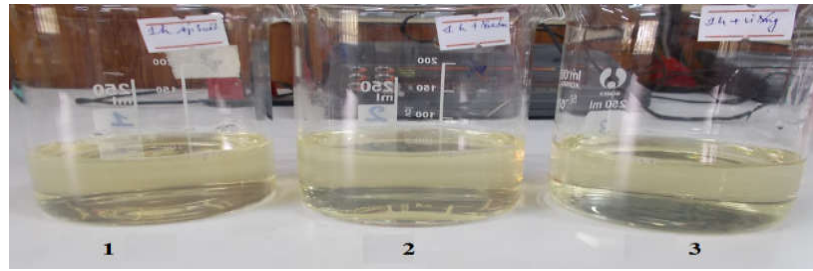


Phụ lục 15. Dịch trích ở 2 mức thời gian 2 giờ và 8 giờ, nấu cách thủy 100 °C



1. Nấu 2 giờ không xử lý; 2. Nấu 2 giờ có siêu âm 30 phút; 3. Nấu 2 giờ có vi sóng 10 phút, 630 W; 4. Nấu 8 giờ không xử lý; 5. Nấu 8 giờ có siêu âm 30 phút; 6. Nấu 8 giờ có vi sóng 10 phút, 630 W.

Phụ lục 16. Dịch trích ở 2 chế độ thời gian 1 giờ và 2 giờ nấu ở 121 °C,

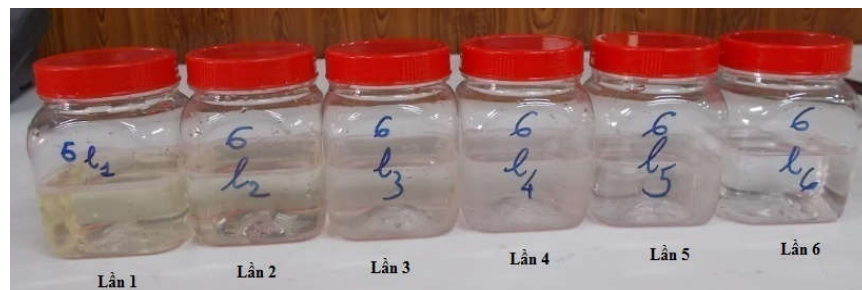


1. Nấu 1 giờ không xử lý;
2. Nấu 1 giờ có siêu âm 30 phút;
3. Nấu 1 giờ có vi sóng 10 phút

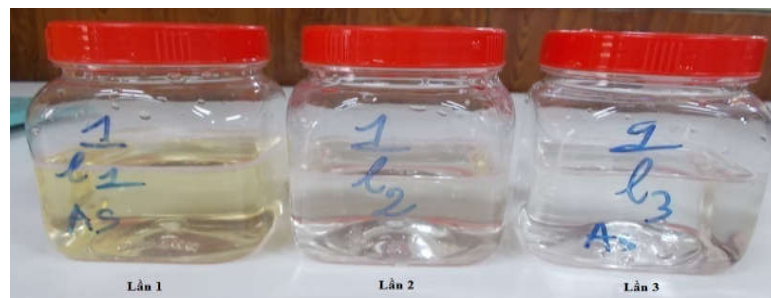
Phụ lục 17. Số lần nấu, nấu 8 giờ/ 100 °C cách thủy, không xử lý vi sóng



Phụ lục 18. Hình ảnh dịch theo số lần nấu, nấu 8h/ 100 °C cách thủy, có xử lý vi sóng 10 phút, 630 W



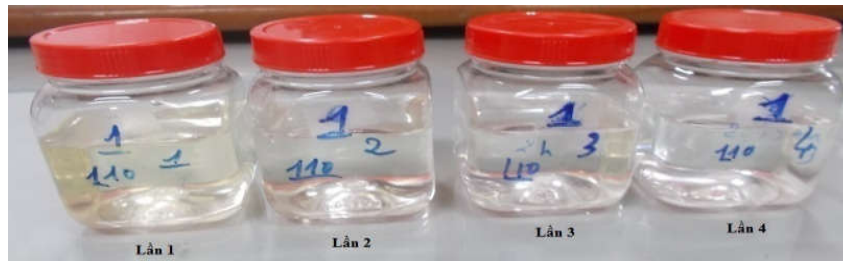
Phụ lục 19. Hình ảnh dịch theo số lần nấu, nấu 2 giờ/ 121 °C áp suất, không xử lý vi sóng



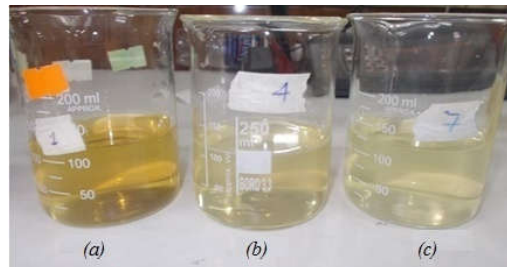
Phụ lục 20. Hình ảnh dịch theo số lần nấu, nấu 2 giờ/ 121 °C áp suất, có xử lý vi sóng 10 phút, 630 W



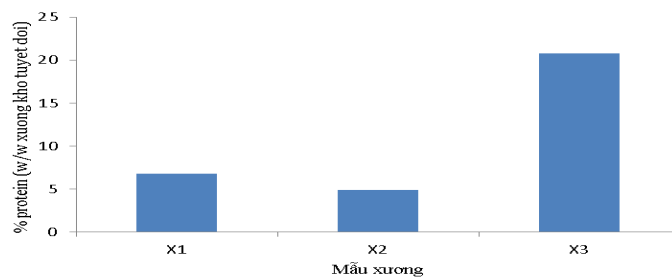
Phụ lục 21. Hình ảnh dịch theo số lần nấu, nấu 2 giờ/ 110 °C áp suất, không xử lý vi sóng



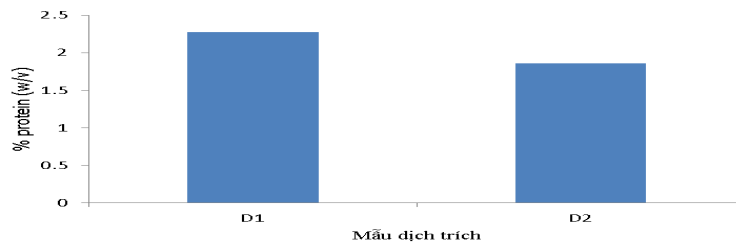
Phụ lục 22. Dịch trích ly collagen có xử lý vi sóng ở công suất - (a): 900W, (b): 630W, (c): 450W



Phụ lục 23. Kết quả phân tích hàm lượng protein (%), X1: Mẫu xương đã nấu 6 lần; X2: Mẫu xương đã nấu 6 lần sau khi trích 1 lần bằng acid acetic; X3: Mẫu xương ban đầu sau khi trích 1 lần bằng acid acetic



Phụ lục 24. Kết quả phân tích hàm lượng protein (%),



D1: Dịch trích bằng acid acetic của mẫu xương ban đầu;

D2: Dịch trích bằng acid acetic của mẫu xương đã nấu 6 lần

Phụ lục 25. Sản phẩm sau khi cô đặc



1. Cô đặc chân không - 0,4kg/cm², 95°C



2. Cô đặc chân không - 0,8kg/cm², 95°C



3. Cô đặc áp suất khí quyển, 100°C



4. Sản phẩm của công ty Cá Sấu Hoa Cà

Phụ lục 26. Sản phẩm bị cháy dưới đáy nồi khi cô đặc ở áp suất khí quyển



Phụ lục 27. Cách xây dựng đường chuẩn protein theo nồng độ, đo ở 595 nm

Xây dựng đường chuẩn: Dung dịch albumin chuẩn 0,1 mg/ ml: cân chính xác 0,0100 g albumin thêm nước cất và định mức tới 10 ml ta được dung dịch albumin chuẩn có nồng độ 1 mg/ ml. Hút 1 ml dung dịch albumin 1 mg/ ml đã pha cho vào bình định mức 10 ml rồi thêm nước cất tới vạch định mức ta được dung dịch albumin có nồng độ 0,1 mg/ ml.

Dung dịch thuốc thử Bradford trong 1000 ml có thành phần như sau: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml ethanol 99,5 %, 100 ml acid phosphoric 85 %. Coomassie Brilliant Blue G-250 được làm tan trong ethanol và acid phosphoric và định mức đến 1000 ml bằng nước cất. Lắc đều, bảo quản trong chai màu tối ở 4 °C, Phụ lục 26 được sử dụng để xây dựng đường chuẩn albumin.

Công thức tính hàm lượng protein trong 1g xương:

$$P \text{ protein} = a \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{V}{m} \text{ (}\mu\text{g protein/ g xương).}$$

a ($\mu\text{g/ ml}$): hàm lượng protein trong thể tích V2

V1(ml): dịch của mẫu sau khi trích

V2(ml): thể tích được pha loãng từ thể tích V1

V (ml): thể tích dịch trích được

m (g): khối lượng xương cá sấu trích

Phụ lục 28. Pha dung dịch chuẩn albumin

Ống số	Dung dịch albumin 0,1 mg/ ml (ml)	Nước cất (ml)	Nồng độ albumin (μg)	Thuốc thử Bradford (ml)
1	0	1	0	5
2	0,05	0,95	5	5
3	0,10	0,90	10	5
4	0,20	0,80	20	5
5	0,30	0,70	30	5
6	0,40	0,60	40	5
7	0,50	0,50	50	5
8	0,75	0,25	75	5
9	1	0	100	5

Lắc đều các ống nghiệm, sau 3 phút (nhưng phải trước 1 giờ) tiến hành đo mật độ quang OD₅₉₅ nm dung dịch trong các ống nghiệm bằng máy đo quang phổ UV-Vis. Giá trị ΔOD là hiệu của OD trừ đi mẫu trắng. Từ giá trị ΔOD trên, vẽ đường chuẩn $y = ax + b$, với $y = \Delta\text{OD}_{595\text{nm}}$; $x = [\text{Nồng độ Protein}]$ ($\mu\text{g/ ml}$) và hệ số tương quan R^2 nhờ phần mềm Excel.

Chuẩn bị mẫu: Lấy V₁ ml mẫu trích, pha loãng thành V₂ ml (sao cho nồng độ nằm trong khoảng 5-100 $\mu\text{g/ ml}$) từ V₂ lấy 1 ml + 5 ml thuốc thử Bradford, đo mật độ quang OD₅₉₅ nm. Từ giá trị ΔOD thay vào phương trình đường chuẩn trên ta tính được hàm lượng protein trong V₂ (a $\mu\text{g/ ml}$).

Phụ lục 29. Phân tích độ thủy phân protein dùng phương pháp kết tủa với TCA

Cách tiến hành: Cân 10 g TCA hòa tan trong 40 ml nước cất ta được dung dịch TCA 20%. Dùng pipet hút 1 ml mẫu cho vào ống ly tâm, tiếp theo cho 1 ml TCA 20% (Mẫu: TCA 20 % = 1: 1). Hỗn hợp được để yên 30 phút, sau đó ly tâm 5000 (vòng/ phút) trong 15 phút. Lấy dịch trên xác định hàm lượng protein và tính toán theo phương pháp Bradford.

Độ thủy phân được xác định theo công thức:

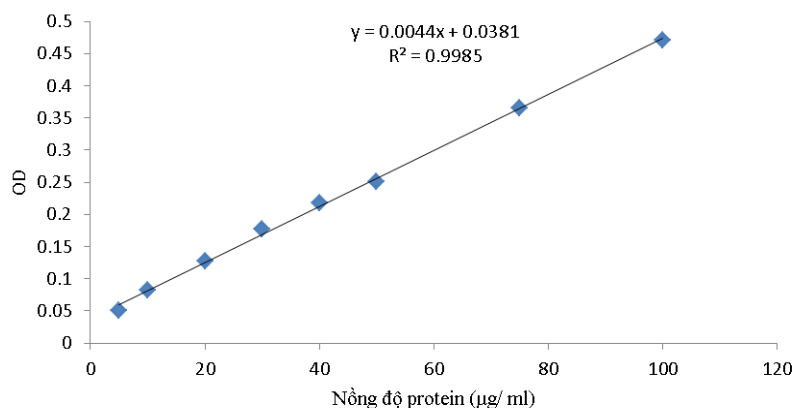
$$\text{DH (\%)} = \frac{\text{Hàm lượng N trong dịch thủy phân hòa tan trong dung dịch TCA 10\%}}{\text{Tổng hàm lượng N trong dịch thủy phân}} \times 100 \% \quad a^*100/b$$

Trong đó:

a: hàm lượng protein mẫu dịch hòa tan trong dung dịch TCA 10 %.

b: tổng hàm lượng protein trong dịch mẫu

Phụ lục 30. Đường chuẩn protein theo nồng độ, đo ở 595 nm



Phụ lục 31. Cách tiến hành xác định DPPH

Pha hóa chất, mẫu và cách tiến hành: Cân 0,0099 g DPPH định mức 50 ml bằng ethanol 95 % được dung dịch V, mỗi lần đo lấy 10 ml dung dịch V định mức 50 ml bằng ethanol 95 % ta được dung dịch DPPH 0,1 mM (dung dịch làm việc). Các dung dịch được bọc giấy nhôm bên ngoài và bảo quản trong tủ lạnh.

Mẫu kiểm soát ADEW: 1,5 ml nước cất + 1,5 ml DPPH 0,1 mM.

Mẫu kiểm soát trắng AEW: 1,5 ml ethanol 95 % + 1,5 ml nước cất.

Mẫu thử ADEP : 1,5 ml dung dịch mẫu + 1,5 ml DPPH 0,1 mM.

Mẫu trắng AEP: 1,5 ml ethanol + 1,5 ml mẫu thử.

Chuẩn bị xong các mẫu và mẫu kiểm soát, tất cả các mẫu được ủ 1 giờ trong bóng tối ở 25 °C và độ hấp thụ ở 517 nm. Chuẩn bị mẫu Ascorbic acid (vitamin C) để so sánh: Cách chuẩn bị tương tự như trên nhưng thay mẫu thử bằng dung dịch Ascorbic acid 0,5 mg/ ml.

Xác định khả năng bắt gốc tự do của mẫu bằng phương pháp đo độ hấp thụ của mẫu tại bước sóng $\lambda = 517$ nm. Ascorbic acid được sử dụng làm chất so sánh.

Khả năng bắt gốc tự do được tính như sau:

$$\% \text{ DPPH bắt gốc} = 100 * \left[1 - \left(\frac{ADE - AEP}{ADEW - AEW} \right) \right]$$

Trong đó: ADEW = Độ hấp thụ của DPPH 0,1 mM và nước (control)

AEW = Độ hấp thụ của ethanol và nước (control blank)

ADEP = Độ hấp thụ của DPPH 0,1 mM và mẫu thử (sample)

AEP = Độ hấp thụ của ethanol và mẫu thử (blank sample)

Chú ý: Lấy ethanol chỉnh về 0 trước khi tiến hành đo độ hấp thụ

Phụ lục 32. Cách tiến hành phá mẫu trong phương pháp Kjeldahl

Vô cơ hóa mẫu: (quá trình tiến hành trong tủ hotte).

Trong điều kiện H_2SO_4 ở nhiệt độ cao và có chất xúc tác, thì các hợp chất có chứa nitơ bị phân hủy thành CO_2 và H_2O . Còn nitơ được giải phóng dưới dạng NH_3 kết hợp với H_2SO_4 tạo thành $(NH_4)_2SO_4$. Phương trình phản ứng như sau: $2NH_3 + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4$.

Chưng cất đạm: (quá trình xảy ra trong bộ chưng)

Đuổi NH_3 ra khỏi dung dịch bằng $NaOH$.

Phương trình phản ứng: $NaOH + (NH_4)_2SO_4 + 2 NaOH = Na_2SO_4 + H_2O + 2NH_3 \uparrow$

$-NH_3$ bay ra được làm lạnh biến đổi thành NH_4OH rơi vào bình hứng, bình hứng chứa một lượng thừa boric acid 4 %.

Phương trình: $NH_4OH + H_3BO_3 = H_2BO_3NH_4 + H_2O$

Chuẩn độ bằng HCl 0,25N từ màu xanh lơ sang màu hồng, qua đó tính toán được lượng nitơ có trong mẫu.

Phương trình: $H_2BO_3NH_4 + HCl \rightarrow H_3BO_3 + Cl(NH_4)$

Thông thường nitơ chiếm 16% protein nên hệ số chuyển đổi thường được sử dụng là $100/16 = 6,25$.

Nitơ tổng số = Nitơ protein + Nitơ phi protein

Đạm tổng số = Nitơ tổng số x hệ số chuyển đổi

Tính kết quả hàm lượng % protein trong mẫu được tính theo công thức

$$\text{Protein (\%)} = (1,4 * (V - V_0) * N * F) / P$$

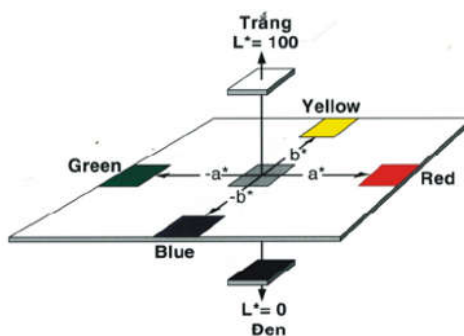
V = thể tích dung dịch HCl chuẩn độ mẫu V_0 = thể tích dung dịch HCl chuẩn độ mẫu trắng

N = nồng độ của dung dịch HCl (trường hợp này là 0,25) F = hệ số chuyển đổi sang protein: 6,25

P = lượng mẫu: gram thì hàm lượng protein là % (w/w); ml thì % (w/v)

Phụ lục 33. Phân tích màu

Theo CIE 1976 các thang màu tương phản là: L^* , a^* , b^* . Trong hệ thống CIELAB, sự khác nhau giữa các điểm được biểu thị trong không gian màu tương ứng với khác biệt có thể nhìn thấy được giữa các màu. Không gian màu CIELAB được thiết lập ở dạng lập phương. Các tông màu và độ bão hòa màu được vẽ trên các trục a^* và b^* . Trục a chạy từ $-a^*$ (xanh lục) đến $+a^*$ (đỏ) và trục b chạy từ $-b^*$ (xanh lam) đến $+b^*$ (vàng). Trục độ sáng L^* có giá trị từ 0 (đen ở đáy) đến 100 (trắng ở đỉnh). Giá trị ΔL^* , Δa^* , Δb^* cho biết mẫu chuẩn và mẫu thử khác nhau như thế nào về các giá trị L^* , a^* , b^* .



Không gian màu CIELAB

Phụ lục 34. Phân tích hàm lượng ẩm bằng phương pháp sấy ở 105°C

Cách tiến hành: Cân khoảng 5g mẫu chính xác đến 0,0001g, cho vào chén sấy đã biết trước khối lượng (chén đã sấy 102 - 105°C có khối lượng không đổi). Sau đó cho vào lò và sấy ở nhiệt độ 102 - 105°C trong 1 giờ. Lấy ra để nguội trong bình hút ẩm 30 phút rồi cân. Lặp lại quá trình sấy như trên cho đến khi khối lượng không đổi (khi chênh lệch giữa hai lần cân kế tiếp nhỏ hơn 0,0005g). Thời gian sấy mỗi lần tiếp theo là 30 phút.

$$\text{Công thức tính độ ẩm theo phần trăm (X): } X \% = \frac{(A-B) \times 100}{A}$$

A: Khối lượng của mẫu thử trước khi sấy (g). B: Khối lượng của mẫu thử sau khi sấy (g)

Phụ lục 35. Hàm lượng tro toàn phần bằng phương pháp nung ở 600°C

Cách tiến hành: Cân khoảng 3g mẫu chính xác đến 0,0001g, cho vào chén nung đã biết trước khối lượng (chén nung đã nung 550 - 600°C có khối lượng không đổi). Sau đó cho vào lò nung và nung ở nhiệt độ 550 - 600°C trong 2 giờ. Lấy ra để nguội trong bình hút ẩm 30 phút rồi cân. Tiếp tục như trên cho đến khi khối lượng không đổi (khối lượng mẫu được xem là không đổi khi chênh lệch giữa hai lần cân kế tiếp nhỏ hơn 0,0005g).

Hàm lượng tro toàn phần theo phần trăm (X1) tính theo công thức:

$$X1 \% = \frac{(G2-G) \times 100}{G1}$$

G: Khối lượng chén (g) G1: Khối lượng mẫu (g) G2: Khối lượng của chén và tro toàn phần (g)

Phụ lục 36. Xác định hoạt tính kháng oxy hóa bằng gốc tự do ABTS

Hút thể tích dung dịch 7,4 mM ABTS và dung dịch 2,6 mM kali persulfate theo tỷ lệ 1:1 lắc đều và để trong tối 12 giờ để hình thành gốc tự do ABTS^{•+}, thu được dung dịch gốc ABTS^{•+}. Lấy 1 ml dung dịch gốc cho vào 60 ml dung dịch methanol sẽ thu được dung dịch thí nghiệm (dung dịch thí nghiệm khi so màu ở bước sóng 724 nm sẽ có độ hấp thụ là 0,7 ± 0,02). Dung dịch gốc ABTS^{•+} và dung dịch thí nghiệm khi chưa sử dụng được bao bọc kín tránh ánh sáng và được bảo quản ở -20°C.

Cân khối lượng từng mẫu bột sấy phun sao cho các mẫu có cùng hàm lượng protein tổng. Hòa tan các mẫu bột trong 100 ml dung dịch methanol để thu được dung dịch mẫu thử gốc. Dung dịch mẫu thử gốc sau đó được pha loãng 10 lần để thu được dung dịch mẫu thí nghiệm.

Lấy 150 μ l dung dịch mẫu thí nghiệm cho vào 2850 μ l dung dịch ABTS^{•+} thí nghiệm, lắc nhẹ hỗn hợp sau đó để yên trong bóng tối 60 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó dung dịch sẽ được đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 517 nm.

Hoạt tính kháng oxy hóa được tính toán và báo cáo dựa trên phần trăm khả năng bắt giữ gốc tự do (Zhu và ctv, 2002)

$$AA (\%) = \frac{A_{GT} - A_{SP}}{A_{GT}} \times 100$$

ACT: độ hấp thụ quang học của mẫu trắng

ASP: độ hấp thụ quang học của mẫu thí nghiệm.

Mẫu trắng: dùng nước cất thay cho dung dịch mẫu thí nghiệm

Phụ lục 37. Phân tích hàm lượng collagen/xương (TCVN 8142 : 2009)

Công thức qui đổi khối lượng từ Hdroxyprolin sang collagen.

$$m_{\text{collagen}} = \frac{m(\text{hydroxyprolin})}{13\%} (\mu\text{g/ml}), \text{ hydroxyprolin chiếm } 13\% \text{ khối lượng collagen.}$$

$$\text{Công thức tính \% collagen theo khối lượng: collagen/ xương} = \frac{m_{\text{collagen}} \cdot 100 \cdot V}{10^6 \cdot k} \%$$

Trong đó: V là thể tích dịch collagen trích được (ml), k là khối lượng xương đem đi trích (g), 10⁶ qui đổi đơn vị từ (μ g) thành (g).

Phụ lục 38 Kết quả phân tích thống kê TN 1.1

Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err	Lower 95%	Upper 95%
				Mean		
100 độ C	3	4.21667	0.120554	0.06960	3.9172	4.5161
90 độ C	3	1.00000	0.010000	0.00577	0.9752	1.0248
80 độ C	3	0.22000	0.000000	0.00000	0.2200	0.2200

Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

Level	Mean
100 độ C A	4.2166667
90 độ C B	1.0000000
80 độ C C	0.2200000

Levels not connected by same letter are significantly different.

Phụ lục 39. Số liệu phân tích TN 1.1

Nhiệt độ °C	80	90	100
% collagen/ xương	0,22	1	4,217
Giá trị L*	28,967	29,331	29,58
Mức độ thủy phân %	27,781	36,3	37,22

Phụ lục 40. Kết quả phân tích thống kê TN 1.2**Means and Std Deviations**

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err		
				Mean	Lower 95%	Upper 95%
10 phút	3	4.34333	0.030551	0.01764	4.2674	4.4192
20 phút	3	4.53000	0.017321	0.01000	4.4870	4.5730
30 phút	3	5.03333	0.025166	0.01453	4.9708	5.0958
60 phút	3	2.89000	0.020000	0.01155	2.8403	2.9397
90 phút	3	2.15333	0.011547	0.00667	2.1246	2.1820

Means Comparisons**Comparisons for each pair using Student's t**

Level	Mean
30 phút A	5.0333333
20 phút B	4.5300000
10 phút C	4.3433333
60 phút D	2.8900000
90 phút E	2.1533333

Levels not connected by same letter are significantly different.

Phụ lục 41. Số liệu phân tích TN 1.2

Thời gian siêu âm (phút)	10	20	30	60	90
% collagen/ xương	4,343	4,53	5,033	2,89	2,153
Giá trị L*	29,422	28,501	28,172	28,073	27,539
Mức độ thủy phân %	6,559	11,86	15,894	30,75	35,367

Phụ lục 42. Kết quả phân tích thống kê TN 1.3**Means and Std Deviations**

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err		
				Mean	Lower 95%	Upper 95%
900W	3	6.00000	0.000000	0.00000	6.0000	6.0000
630W	3	6.06333	0.005774	0.00333	6.0490	6.0777
450W	3	4.28000	0.026458	0.01528	4.2143	4.3457

Means Comparisons**Comparisons for each pair using Student's t**

Level	Mean
630W A	6.0633333
900W B	6.0000000
450W C	4.2800000

Levels not connected by same letter are significantly different.

Phụ lục 43. Số liệu phân tích TN 1.3

Công suất vi sóng (W)	450	630	900
% collagen/ xương	4,28	6,063	6
Giá trị L*	28,903	27,55	26,081
Mức độ thủy phân %	34,643	35,406	40,649

Phụ lục 44. Kết quả phân tích thống kê TN 1.4**Means and Std Deviations**

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err		
				Mean	Lower 95%	Upper 95%
100 độ C	3	0.28000	0.020000	0.01155	0.2303	0.3297
110 độ C	3	1.85000	0.010000	0.00577	1.8252	1.8748
121 độ C	3	9.48333	0.065064	0.03756	9.3217	9.6450

Means Comparisons**Comparisons for each pair using Student's t**

Level	Mean
121 độ C A	9.4833333
110 độ C B	1.8500000
100 độ C C	0.2800000

Levels not connected by same letter are significantly different.

Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err		
				Mean	Lower 95%	Upper 95%
100 độ C	3	0.6167	0.011547	0.00667	0.588	0.645
110 độ C	3	3.7667	0.041633	0.02404	3.663	3.870
121 độ C	3	10.8333	0.023094	0.01333	10.776	10.891

Means Comparisons**Comparisons for each pair using Student's t**

Level	Mean
121 độ C A	10.833333
110 độ C B	3.766667
100 độ C C	0.616667

Levels not connected by same letter are significantly different.

Phụ lục 45. Số liệu phân tích TN 1.4

Nhiệt độ °C		100	110	121
	Nấu 1h	0,28	1,85	9,483
% collagen/ xương	Nấu 2h	0,617	3,767	10,833
	Nấu 1h	28,059	28,673	29,077
Giá trị L*	Nấu 2h	28,108	28,264	29,069
	Nấu 1h	3,314	4,101	4,64
Mức độ thủy phân %	Nấu 2h	4,81	5,131	6,578

Phụ lục 46. Kết quả phân tích thống kê TN 2

Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err		
				Mean	Lower 95%	Upper 95%
không	3	0.610000	0.000000	0.00000	0.61000	0.61000
siêu âm	3	0.646667	0.025166	0.01453	0.58415	0.70918
vi sóng	3	0.743333	0.005774	0.00333	0.72899	0.75768

Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

Level	Mean
vi sóng A	0.74333333
siêu âm B	0.64666667
không C	0.61000000

Levels not connected by same letter are significantly different.

Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err		
				Mean	Lower 95%	Upper 95%
không	3	3.96000	0.020000	0.01155	3.9103	4.0097
siêu âm	3	4.23333	0.032146	0.01856	4.1535	4.3132
vi sóng	3	4.36000	0.010000	0.00577	4.3352	4.3848

Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

Level	Mean
vi sóng A	4.3600000
siêu âm B	4.2333333
không C	3.9600000

Levels not connected by same letter are significantly different.

Phụ lục 47. Số liệu phân tích TN 2

Phương pháp xử lý	Không	Siêu âm	Vi sóng	
Nấu 2h	0,61	0,647	0,743	
% collagen/ xương	Nấu 8h	3,96	4,233	4,36
Giá trị L*	Nấu 2h	34,629	34,26	34,134
	Nấu 8h	34,738	34,507	34,189
Mức độ thủy phân %	Nấu 2h	5,611	6,806	7,758
	Nấu 8h	14,972	25,434	26,096
% DPPH	Nấu 2h	51,565	52,206	55,897
	Nấu 8h	39,049	40,293	40,614

Phụ lục 48. Kết quả phân tích thống kê TN 3

Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err		
				Mean	Lower 95%	Upper 95%
không	3	9.49000	0.055678	0.03215	9.3517	9.6283
siêu âm	3	9.66333	0.064291	0.03712	9.5036	9.8230
vi sóng	3	9.73667	0.015275	0.00882	9.6987	9.7746

Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

Level	Mean
vi sóng A	9.7366667
siêu âm A	9.6633333
không B	9.4900000

Levels not connected by same letter are significantly different.

Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err		
				Mean	Lower 95%	Upper 95%
không	3	10.8667	0.028868	0.01667	10.795	10.938
siêu âm	3	10.9633	0.020817	0.01202	10.912	11.015
vi sóng	3	11.0867	0.015275	0.00882	11.049	11.125

Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

Level	Mean
vi sóng A	11.086667
siêu âm B	10.963333
không C	10.866667

Levels not connected by same letter are significantly different.

Phụ lục 49. Số liệu phân tích TN 3

Phương pháp xử lý		Không	Siêu âm	Vi sóng
% collagen/ xương	Nấu 1h	9,49	9,663	9,737
	Nấu 2h	10,867	10,963	11,087
Giá trị L*	Nấu 1h	32,301	32,271	31,693
	Nấu 2h	31,646	31,393	31,369
Mức độ thủy phân %	Nấu 1h	4,883	7,203	7,958
	Nấu 2h	5,628	8,062	8,22
% DPPH	Nấu 1h	50,08	50,421	52,347
	Nấu 2h	45,788	46,43	47,453

Phụ lục 50. Kết quả phân tích thống kê TN 4

Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err		
				Mean	Lower 95%	Upper 95%
L1	3	4.05333	0.040415	0.02333	3.9529	4.1537
L2	3	2.17667	0.089629	0.05175	1.9540	2.3993
L3	3	1.28333	0.005774	0.00333	1.2690	1.2977
L4	3	0.69667	0.005774	0.00333	0.6823	0.7110
L5	3	0.20000	3.4e-17	2e-17	0.2000	0.2000
L6	3	0.10000	1.7e-17	9.8e-18	0.1000	0.1000

Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

Level	Mean
L1 A	4.0533333
L2 B	2.1766667
L3 C	1.2833333
L4 D	0.6966667
L5 E	0.2000000
L6 F	0.1000000

Levels not connected by same letter are significantly different.

Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err		
				Mean	Lower 95%	Upper 95%
L1	3	10.7933	0.047258	0.02728	10.676	10.911
L2	3	1.1567	0.005774	0.00333	1.142	1.171
L3	3	0.1233	0.005774	0.00333	0.109	0.138

Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

Level	Mean
L1 A	10.793333
L2 B	1.156667
L3 C	0.123333

Levels not connected by same letter are significantly different.

Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err		
				Mean	Lower 95%	Upper 95%
L1	3	3.67667	0.005774	0.00333	3.6623	3.6910
L2	3	3.00667	0.070238	0.04055	2.8322	3.1811
L3	3	1.49000	0.010000	0.00577	1.4652	1.5148
L4	3	0.53333	0.005774	0.00333	0.5190	0.5477

Means Comparisons**Comparisons for each pair using Student's t**

Level	Mean
L1 A	3.6766667
L2 B	3.0066667
L3 C	1.4900000
L4 D	0.5333333

Levels not connected by same letter are significantly different.

Phụ lục 51. Số liệu phân tích % hàm lượng collagen TN 4

Số lần trích (100 °C/ 8h)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	Tổng
Không vi sóng	3,953	1,84	1,477	0,887	0,247	0,213	8,617
Có vi sóng	4,053	2,177	1,283	0,697	0,2	0,1	8,51

Chi xử lý vi sóng L1 và L2

Số lần trích (121 °C/ 2h)	L1	L2	L3	Tổng
Không vi sóng	10,793	1,157	0,123	12,073
Có vi sóng	10,913	1,19	0,117	12,22

Chi xử lý vi sóng L1 và L2

Số lần trích (110 °C/ 2h)	L1	L2	L3	L4	Tổng
Không vi sóng	3,677	3,007	1,49	0,533	8,707

Phụ lục 52. Số liệu phân tích TN 5

Áp suất cô đặc (kg/cm ²)	0	- 0,4	- 0,8
Thời gian cô đặc (phút)	135	310	108
Giá trị L*	31,369	32,374	32,84
% DPPH	58,424	56,999	56,157

Phụ lục 53. Kết quả tối ưu hóa quá trình thủy phân bằng enzyme neutral**Đáp ứng độ thủy phân****Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	9	81.507502	9.05639	21.3273
Error	5	2.123192	0.42464	Prob > F
C. Total	14	83.630693		0.0018 ^{ns}

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	3	1.7607250	0.586908	3.2384
Pure Error	2	0.3624667	0.181233	Prob > F
Total Error	5	2.1231917		0.2448

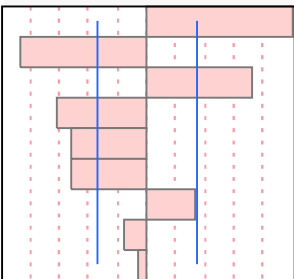
Max RSq
0.9957

Parameter Estimates

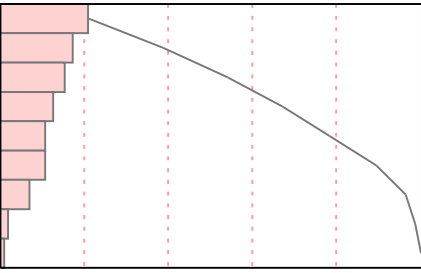
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	41.183333	0.376226	109.46	<.0001 ⁵³
Nhiet do(55,65)	-1.0775	0.230391	-4.68	0.0054 ⁵³
pH(6.5,7.5)	1.28625	0.230391	5.58	0.0025 ⁵³
Ty le enzyme(2.5,3.5)	0.59875	0.230391	2.60	0.0483 ⁵³
Nhiet do*pH	2.4975	0.325821	7.67	0.0006 ⁵³
Nhiet do*Ty le enzyme	-1.3025	0.325821	-4.00	0.0103 ⁵³
pH*Ty le enzyme	-0.135	0.325821	-0.41	0.6958
Nhiet do*Nhiet do	-2.269167	0.339126	-6.69	0.0011 ⁵³
pH*pH	-0.386667	0.339126	-1.14	0.3059
Ty le enzyme*Ty le enzyme	-1.361667	0.339126	-4.02	0.0102 ⁵³

Sorted Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Nhiet do*pH	2.4975	0.325821	7.67	0.0006 ⁵³
Nhiet do*Nhiet do	-2.269167	0.339126	-6.69	0.0011 ⁵³
pH(6.5,7.5)	1.28625	0.230391	5.58	0.0025 ⁵³
Nhiet do(55,65)	-1.0775	0.230391	-4.68	0.0054 ⁵³
Ty le enzyme*Ty le enzyme	-1.361667	0.339126	-4.02	0.0102 ⁵³
Nhiet do*Ty le enzyme	-1.3025	0.325821	-4.00	0.0103 ⁵³
Ty le enzyme(2.5,3.5)	0.59875	0.230391	2.60	0.0483 ⁵³
pH*pH	-0.386667	0.339126	-1.14	0.3059
pH*Ty le enzyme	-0.135	0.325821	-0.41	0.6958


Pareto Plot of Transformed Estimates

Term	Orthog Estimate
Nhiet do*pH	1.289703
Nhiet do*Nhiet do	-1.069758
pH(6.5,7.5)	0.939344
Nhiet do(55,65)	-0.786895
Ty le enzyme*Ty le enzyme	-0.675576
Nhiet do*Ty le enzyme	-0.672608
Ty le enzyme(2.5,3.5)	0.437265
pH*pH	-0.140289
pH*Ty le enzyme	-0.069714



Đáp ứng hoạt tính bắt giữ gốc DPPH

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	9	155.19697	17.2441	19.5655
Error	5	4.40677	0.8814	Prob > F
C. Total	14	159.60373		0.0022 ²⁵

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	3	3.6825000	1.22750	3.3896
Pure Error	2	0.7242667	0.36213	Prob > F
Total Error	5	4.4067667		0.2361

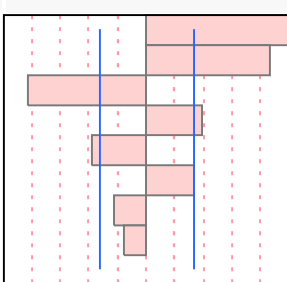
Max RSq
0.9955

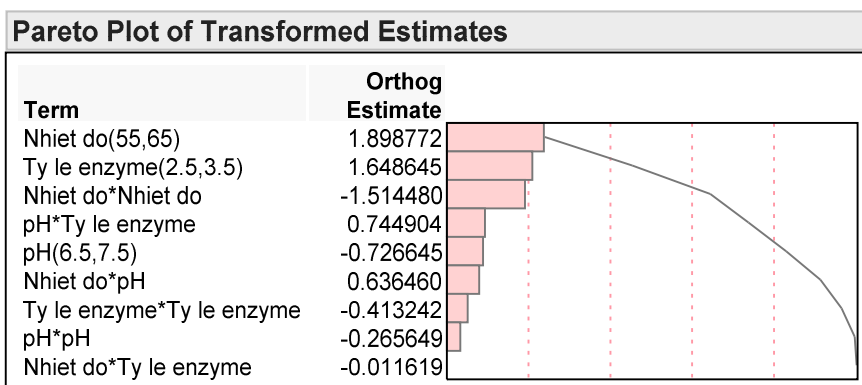
Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	81.713333	0.542019	150.76	<.0001 ²⁵
Nhiet do(55,65)	2.6	0.331917	7.83	0.0005 ²⁵
pH(6.5,7.5)	-0.995	0.331917	-3.00	0.0302 ²⁵
Ty le enzyme(2.5,3.5)	2.2575	0.331917	6.80	0.0010 ²⁵
Nhiet do*pH	1.2325	0.469402	2.63	0.0468 ²⁵
Nhiet do*Ty le enzyme	-0.0225	0.469402	-0.05	0.9636
pH*Ty le enzyme	1.4425	0.469402	3.07	0.0277 ²⁵
Nhiet do*Nhiet do	-3.137917	0.488569	-6.42	0.0014 ²⁵
pH*pH	-0.597917	0.488569	-1.22	0.2755
Ty le enzyme*Ty le enzyme	-0.832917	0.488569	-1.70	0.1490

Sorted Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Nhiet do(55,65)	2.6	0.331917	7.83	0.0005*
Ty le enzyme(2.5,3.5)	2.2575	0.331917	6.80	0.0010*
Nhiet do*Nhiet do	-3.137917	0.488569	-6.42	0.0014*
pH*Ty le enzyme	1.4425	0.469402	3.07	0.0277*
pH(6.5,7.5)	-0.995	0.331917	-3.00	0.0302*
Nhiet do*pH	1.2325	0.469402	2.63	0.0468*
Ty le enzyme*Ty le enzyme	-0.832917	0.488569	-1.70	0.1490
pH*pH	-0.597917	0.488569	-1.22	0.2755
Nhiet do*Ty le enzyme	-0.0225	0.469402	-0.05	0.9636





Phụ lục 54. Dịch protein thịt cá sấu trước và sau thủy phân



Phụ lục 55. Mẫu thủy phân bằng 3 loại enzyme theo thời gian 1h, 3h, 5h, 7h, 9h



a) Flavourzyme

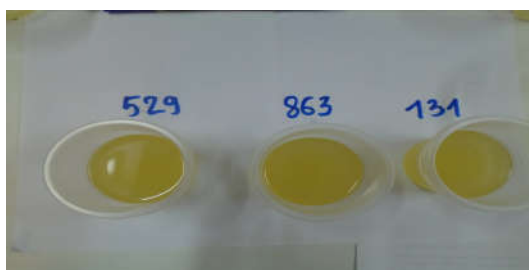
b) Alcalase

c) Neutral

Phụ lục 56. Hàm lượng nitơ của thịt cá ban đầu và trong dịch thủy phân

Hàm lượng nitơ (%)		Khối lượng dịch thủy phân thu được từ 50 g thịt cá sấu thủy phân trong 100 ml nước (g)
Thịt cá sấu	Dịch thủy phân	
2,4976	0,9588	108

Phụ lục 57. Các mẫu sau pha dùng để đánh giá cảm quan. Mẫu 131 từ bột chứa 38% đường, mẫu 863 ~ 40% đường, và mẫu 529 ~ 42% đường



Phụ lục 58. Hỗn hợp gừng trước khi đưa vào cánh khuấy



Phụ lục 59. Quy trình chế biến bột gừng sấy phun

Gừng tươi được phân tích có hàm lượng thành phần các chất như sau:

Giá trị dinh dưỡng cho mỗi 100gram gừng tươi	
Tinh dầu (%)	2,30 ± 0,001
6-gingerol (%)	1,10 ± 0,005
Đường (gram)	1,59 ± 0,004
Cacbohydrat (gram)	17,71 ± 0,030
Chất xơ (gram)	2,01 ± 0,004
Chất béo (gram)	0,74 ± 0,002
Chất đạm (gram)	1,80 ± 0,011
Vitamin C (mg)	5,50 ± 0,022
Canxi (mg)	14,00 ± 0,071
Sắt (mg)	0,50 ± 0,001
Magiê (mg)	40,00 ± 0,511
Photpho (mg)	30,00 ± 0,710
Kali (mg)	413 ± 2,030
Kẽm (mg)	0,32 ± 0,001

Gừng khi mua về đem gọt vỏ để loại bỏ hết phần vỏ có chứa đất cát, vi sinh vật và loại bỏ các phần bị hư, giúp ổn định nguyên liệu đầu ra.

Sau khi gọt vỏ, đem rửa sạch, cắt lát, xay nhỏ bằng máy xay sinh tố trong khoảng thời gian 3 – 5 phút với nước cất được làm ấm ở nhiệt độ 50°C, tỉ lệ gừng: nước là 1: 3. Xay với nước ấm giúp cho việc trích ly gừng diễn ra dễ dàng và đạt hiệu suất trích ly cao hơn.

Hỗn hợp gừng sau khi xay được đưa vào cánh khuấy, đánh với tốc độ 350rpm, hoặc khi xác gừng không bị lắng xuống đáy, lọc bằng vải lọc nhằm loại bỏ xác gừng, thu lấy nước cốt làm nguyên liệu cho quá trình phối trộn và sấy phun.

Nước gừng thu được phối trộn với 20% maltodextrin/ tổng khối lượng dịch.

Dem hỗn hợp đồng hóa bằng máy đồng hóa 2 lần, mỗi lần 10.000 vòng trong 3 phút, đem siêu âm, bật chế độ degas khoảng 15 – 20 phút để loại bỏ hết bọt khí.

Tiến hành sấy phun bằng máy sấy phun Lab Plant, thu được bột gừng sấy

Phụ lục 60. Sản phẩm sau khi được đóng gói (a) và khi hòa tan trong nước (b)



(a)



(b)

Phụ lục 61. Ước tính chi phí sản xuất và giá thành sản phẩm

Việc ước tính trong mục này chỉ nhằm sơ lược đưa ra chi phí cho mỗi đơn vị sản phẩm để có con số bước đầu nhằm đánh giá khả năng áp dụng vào thực tế (ước tính theo sai số dư về chi phí). Việc ước tính chắc chắn có sai số do nhiều mục chi còn thiếu dữ liệu, các chi phí được tính toán như sau:

Tính toán chi phí chế biến bột protein thịt thủy phân

Các bước tính toán	Giá trị	Ghi chú
Thịt (kg)	100	
Hàm lượng protein (%)	15,7	
Khối lượng protein (kg)	15,7	
Sau thủy phân (kg)	13,7	Tỷ lệ thu hồi 87.2%
Sau sấy phun (kg)	9,6	Tỷ lệ thu hồi 70%
Khối lượng bột (kg)	29,9	Protein chiếm 32%

Ước tính chi phí

Nguyên liệu (đ)	4.000.000	Giá ước tính 40.000 đ/kg (ở Miền Tây có thời điểm có thể mua < 20.000 đ/kg)
Chi phí thủy phân (đ)	4.000.000	Ước tính, bao gồm enzyme
Chi phí sấy phun (đ)	4.000.000	Ước tính
Tổng (đ)	12.000.000	
Chi phí/ kg thành phẩm (đ)	401.017	

Tính toán chi phí chế biến bột protein thịt thủy phân

Các bước tính toán	Giá trị	Ghi chú
Xương (kg)	100	
Collagen trích được (kg)	12	
Sau thủy phân (kg)	12	
Sau sấy phun (kg)	8	Tỷ lệ thu hồi 70% (ước tính)
Khối lượng bột (kg)	22	Có chất trợ sấy

Ước tính chi phí

Nguyên liệu xương (đ)	200.000	Ước tính 2000 đ/kg cho phí vận chuyển xương
Chi phí nấu cao (đ)	3.000.000	Ước tính
Chi phí thủy phân (đ)	3.000.000	Ước tính
Chi phí sấy phun (đ)	3.500.000	Ước tính
Tổng (đ)	9.700.000	
Chi phí/ kg thành phẩm (đ)	438.810	

Chi phí các nguyên liệu bổ sung

Nguyên liệu	Giá (đ/kg)	
Bột gừng hòa tan (đ/kg)	500.000	Ước tính
Ascorbic acid (đ/kg)	1.250.000	
Đường phèn (đ/kg)	35.000	

Ước tính chi phí cho một gói sản phẩm

Chi phí cho một gói 5g	
Bột protein thịt thủy phân (đ)	353
Bột collagen thủy phân (đ)	510
Bột gừng (đ)	300
Đường phèn (đ)	70
Acid ascorbic (đ)	94
Bao bì + đóng gói (đ)	1.000
Tổng	2.327

Phụ lục 62: Phiếu đánh giá cảm quan**ĐÁNH GIÁ CẢM QUAN**

Phép thử cho điểm thị hiếu

Tên sản phẩm: Bột dinh dưỡng từ protein và collagen cá sấu thủy phân

Họ và tên CẢM QUAN VIÊN:

Ngày thử:

Anh/chị hãy quan sát và nếm thử 3 mẫu theo thứ tự trình bày từ trái sang phải và đánh giá từng thuộc tính của sản phẩm theo thang điểm 5

Cực kì không thích

Không thích

Không thích không ghét

Thích

Cực kì thích

Mẫu	Màu	Mùi	Vị

Nhận xét:

Phụ lục 63. Phiếu kiểm nghiệm mẫu cao nấu thử nghiệm



Sac Ky Hai Dang



VILAS 238

Số/ No.:16012274/KQ

Mã số/ Code: 16011071/16010383

Trang/ Page: 1/ 1

**KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM
TEST REPORT**

Tên khách hàng / Customer : **TRẦN ĐẠI NHỰT**
 Địa chỉ / Address : 38/6 G Trung Lân, xã bà Điểm, huyện Hóc Môn, Tp. HCM
 Ngày nhận mẫu/ Date of receiving : 09/01/2016 Ngày trả kết quả/ Date of issue : 18/01/2016
 Ngày thực hiện/ Testing date : 09/01/2016
 Tên mẫu/ Name of sample : **Cao xương cá sấu**
 Tình trạng mẫu/ State of sample : Dạng sệt đựng trong hộp nhựa
 Ghi chú/ Note :

STT/ No.	CHỈ TIÊU THỬ NGHIỆM PARAMETER	ĐƠN VỊ UNIT	PHƯƠNG PHÁP THỬ TEST METHOD	KẾT QUẢ RESULT
01	Tổng số vi khuẩn hiếu khí (*)	CFU/g	TCVN 4884 (ISO 4833-1)	4.0x10 ¹
02	<i>Escherichia coli</i> (*)	CFU/g	ISO 16649-2 (TCVN 7924-2)	Không phát hiện (LOD =10)
03	<i>Coliforms</i> (*)	CFU/g	ISO 4832 (TCVN 6848)	Không phát hiện (LOD =10)
04	<i>Salmonella spp.</i> (*)	CFU/25g	ISO 6579 (TCVN 4829)	Không phát hiện
05	<i>Staphylococcus aureus</i> (*)	CFU/g	ISO 6888-1 (TCVN 4830-1)	Không phát hiện (LOD =10)
06	Tổng số nấm men (*)	CFU/g	ISO 21527-2 (TCVN 8275-2)	Không phát hiện (LOD =10)
07	Tổng số nấm mốc (*)	CFU/g	ISO 21527-2 (TCVN 8275-2)	Không phát hiện (LOD =10)
08	Béo (*)	%	FAO, 14/7, 1986, Page 214	0.14

Ghi chú: (*) Chỉ tiêu được VILAS công nhận. (ISO/IEC 17025:2005), (a) Chỉ tiêu gửi nhà thầu phụ, LOD: Giới hạn phát hiện/ (*): Items are accredited by VILAS (ISO/IEC 17025:2005), (a) Items are tested by subcontractor, LOD: Limit of detection

Phụ trách kỹ thuật
Technical Manager

Dr. Phạm Thị Ánh



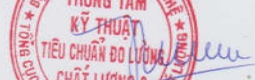
TỔNG GIÁM ĐỐC
GENERAL DIRECTOR



Lý Hoàng Hải

Kết quả chỉ có giá trị trên mẫu thử, ký hiệu mẫu theo khách hàng gửi. Thời gian lưu mẫu: 5 ngày kể từ ngày trả kết quả/ Test results are valid only for test sample, name of samples as the client's requirement. Time- limit of storage: 5 days from reporting date

Phụ lục 64. Kết quả phân tích vi sinh sản phẩm cuối cùng

 TỔNG CỤC TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG TRUNG TÂM KỸ THUẬT TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG 3 QUALITY ASSURANCE & TESTING CENTER 3																				
KT3 – 10423VS6	PHIẾU KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM TEST REPORT	21/12/2016 Page 01/01																		
1. Tên mẫu <i>Name of sample</i>	: BỘT DINH DƯỠNG TỪ CÁ SÁU																			
2. Mô tả mẫu <i>Sample description</i>	: Mẫu đựng trong bao giấy nguyên./ <i>As received sample is intact paper bag</i> Mẫu thử nghiệm do khách hàng lấy mẫu, tên mẫu và thông tin về mẫu do khách hàng cung cấp./ <i>Testing sample was sampled by customer, sample name and sample information were supplied by customer.</i>																			
3. Số lượng mẫu <i>Quantity</i>	: 01 (500 g)																			
4. Ngày nhận mẫu <i>Date of receiving</i>	: 13/12/2016																			
5. Thời gian thử nghiệm <i>Testing duration</i>	: 14/12/2016 – 21/12/2016																			
6. Nơi gửi mẫu <i>Customer</i>	: TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH KP6, Phường Linh Trung, Thủ Đức, Thành phố Hồ Chí Minh																			
7. Kết quả thử nghiệm <i>Test results</i>																				
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tên chỉ tiêu <i>Characteristic</i></th> <th>Phương pháp thử <i>Test method</i></th> <th>Kết quả thử nghiệm <i>Test result</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>7.1. Tổng số vi sinh vật hiếu khí, <i>Total aerobic plate count</i></td> <td>CFU/g ISO 4833 - 1 : 2013</td> <td>3,6 x 10³</td> </tr> <tr> <td>7.2. Tổng số nấm men, nấm mốc, <i>Total yeast, mould</i></td> <td>CFU/g ISO 21527 - 2 : 2008</td> <td>< 10^(*)</td> </tr> <tr> <td>7.3. Coliforms, <i>Escherichia coli/g</i></td> <td>CFU/g ISO 4832 : 2006 ISO 7251 : 2005</td> <td>< 10^(*)</td> </tr> <tr> <td>7.4. <i>Escherichia coli/g</i></td> <td>ISO 7251 : 2005</td> <td>Âm tính/Negative</td> </tr> <tr> <td>7.5. Staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase/g (<i>Staphylococcus aureus</i> và các loài khác)</td> <td>ISO 6888 - 3 : 2003</td> <td>Âm tính/Negative</td> </tr> </tbody> </table>	Tên chỉ tiêu <i>Characteristic</i>	Phương pháp thử <i>Test method</i>	Kết quả thử nghiệm <i>Test result</i>	7.1. Tổng số vi sinh vật hiếu khí, <i>Total aerobic plate count</i>	CFU/g ISO 4833 - 1 : 2013	3,6 x 10 ³	7.2. Tổng số nấm men, nấm mốc, <i>Total yeast, mould</i>	CFU/g ISO 21527 - 2 : 2008	< 10 ^(*)	7.3. Coliforms, <i>Escherichia coli/g</i>	CFU/g ISO 4832 : 2006 ISO 7251 : 2005	< 10 ^(*)	7.4. <i>Escherichia coli/g</i>	ISO 7251 : 2005	Âm tính/Negative	7.5. Staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase/g (<i>Staphylococcus aureus</i> và các loài khác)	ISO 6888 - 3 : 2003	Âm tính/Negative	
Tên chỉ tiêu <i>Characteristic</i>	Phương pháp thử <i>Test method</i>	Kết quả thử nghiệm <i>Test result</i>																		
7.1. Tổng số vi sinh vật hiếu khí, <i>Total aerobic plate count</i>	CFU/g ISO 4833 - 1 : 2013	3,6 x 10 ³																		
7.2. Tổng số nấm men, nấm mốc, <i>Total yeast, mould</i>	CFU/g ISO 21527 - 2 : 2008	< 10 ^(*)																		
7.3. Coliforms, <i>Escherichia coli/g</i>	CFU/g ISO 4832 : 2006 ISO 7251 : 2005	< 10 ^(*)																		
7.4. <i>Escherichia coli/g</i>	ISO 7251 : 2005	Âm tính/Negative																		
7.5. Staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase/g (<i>Staphylococcus aureus</i> và các loài khác)	ISO 6888 - 3 : 2003	Âm tính/Negative																		
Ghi chú/Notice: (*) Theo phương pháp thử, kết quả được biểu thị nhỏ hơn 10 CFU/g khi không có khuẩn lạc mọc trên đĩa. <i>According to the test method, the result is expressed as less than 10 CFU/g when the dish contains no colony</i>																				
PHỤ TRÁCH PTN VI SINH - GMO HEAD OF MICROBIOLOGY - GMO TESTING LAB.		PHÓ GIÁM ĐỐC VICE DIRECTOR																		
 Trần Thị Ánh Nguyệt		 Lương Thanh Uyên																		
1. Các kết quả thử nghiệm ghi trong phiếu này chỉ có giá trị đối với mẫu do khách hàng gửi đến./ <i>Test results are valid for the namely submitted sample(s) only.</i> 2. Không được trích sao một phần phiếu kết quả thử nghiệm này nếu không có sự đồng ý bằng văn bản của Trung tâm Kỹ thuật 3. N/A: không áp dụng. <i>Not applicable</i> <i>This Test Report shall not be reproduced, except in full, without the written approval of Quatest 3.</i> 3. Tên mẫu, tên khách hàng được ghi theo yêu cầu của nơi gửi mẫu./ <i>Name of sample and customer are written as customer's request.</i> 4. Độ không đảm bảo đo mở rộng ước lượng được tính với k = 2, mức tin cậy 95%. Khách hàng có thể liên hệ theo địa chỉ dưới để biết thêm thông tin. <i>Estimated expanded uncertainty of measurement with k = 2, at 95 % confidence level. Please contact Quatest 3 at the below address for further information.</i>																				
Head Office: 49 Pasteur, Q1, Hồ Chí Minh City, VIỆT NAM Tel: (84-8) 3829 4274 Fax: (84-8) 3829 3012 Website: www.quatest3.com.vn Testing: 7 Road 1, Biên Hòa 1 Industrial Zone, Đồng Nai Tel: (84-61) 383 6212 Fax: (84-61) 383 6298 E-mail: qt-dichvutn@quatest3.com.vn																				
Lần sửa đổi: 4		M03/1 - TTTN09																		

Phụ lục 65. Kết quả phân tích thống kê một số thành phần (% chất khô), pH của xương trước và sau loại tủy

		Paired Samples Statistics			
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Độ ẩm XLT	8.2033	3	.03786	.02186
	Độ ẩm XCLT	30.2800	3	4.38219	2.53006
Pair 2	pH XLT	6.1267	3	.04509	.02603
	pH XCLT	5.9800	3	.07937	.04583
Pair 3	Tro tổng XLT	67.2300	3	.13115	.07572
	Tro tổng XCLT	63.1833	3	1.56302	.90241
Pair 4	Tro không tan trong acid XLT	1.3633	3	.43558	.25148
	Tro không tan trong acid XCLT	1.2700	3	.18028	.10408
Pair 5	Nitơ XLT	4.1700	3	.03464	.02000
	Nitơ XCLT	4.8967	3	.24007	.13860
Pair 6	Protein thô XLT	26.0533	3	.22811	.13170
	Protein thô XCLT	30.6000	3	1.49292	.86194
Pair 7	Béo tổng XLT	.0500	3	.01000	.00577
	Béo tổng XCLT	2.5500	3	.51449	.29704

		Paired Samples Test							
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Độ ẩm XLT - Độ ẩm XCLT	-22.07667	4.41296	2.54782	-33.03907	-11.11426	-8.665	2	.013
Pair 2	pH XLT - pH XCLT	.14667	.05132	.02963	.01919	.274144	4.950	2	.038
Pair 3	Tro tổng XLT - Tro tổng XCLT	4.04667	1.43514	.82858	.48158	7.611764	4.884	2	.039
Pair 4	Tro không tan trong acid XLT - Tro không tan trong acid XCLT	.09333	.29195	.16856	-.63190	.81857	.554	2	.635
Pair 5	Nitơ XLT - Nitơ XCLT	-.72667	.25736	.14859	-1.36598	-.08735	4.891	2	.039

Pair Protein thô XLT - 6 Protein thô XCLT	-4.54667	1.60238	.92514	-8.52721	-.56613	-	2	.039
					4.915			
Pair Béo tổng XLT - Béo 7 tổng XCLT	-2.50000	.52144	.30105	-3.79533	-1.20467	-	2	.014
					8.304			

Phụ lục 66. Kết quả phân tích thống kê hàm lượng amino acid (% chất khô)

		Paired Samples Statistics							
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean				
Pair 1	Amino acid (%) mẫu XLT	15.2233	3	2.89148	1.66939				
	Amino acid (%) mẫu XCLT	15.4500	3	1.39603	.80600				
Pair 2	Amino acid (%) mẫu CCLT	31.2733	3	.40919	.23624				
	Amino acid (%) mẫu CLT	66.7700	3	9.98215	5.76320				
Pair 3	Amino acid (%) mẫu BTP	20.8267	3	1.66236	.95976				
	Amino acid (%) mẫu BDD	22.6800	3	1.22870	.70939				

		Paired Samples Test							
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Amino acid (%) mẫu XLT								
	- Amino acid (%) mẫu XCLT	-.22667	3.11407	1.79791	-7.96245	7.50911	-.126	2	.911
Pair 2	Amino acid (%) mẫu CCLT								
	- Amino acid (%) mẫu CLT	-35.496	9.65842	5.57629	-59.48951	-11.50383	-6.36	2	.024
Pair 3	Amino acid (%) mẫu CSP								
	- Amino acid (%) mẫu CSPBS	-1.853	2.57405	1.48613	-8.24763	4.54096	-1.24	2	.339

Phụ lục 67. Kết quả phân tích thống kê hàm lượng Hydroxylprolin và Collagen (% chất khô) trong các mẫu nghiên cứu

		Paired Samples Statistics			
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Hyp mẫu XCLT	2.2833	3	.48336	.27907
	Hyp mẫu XLT	3.0067	3	.11150	.06438

Pair 2	Colagen mẫu XCLT	17.5533	3	3.74018	2.15939
	Collagen mẫu XLT	23.1233	3	.87888	.50742
Pair 3	Hyp mẫu CLT	8.5800	3	.67506	.38974
	Hyp mẫu CCLT	5.5667	3	.39526	.22821
Pair 4	Colagen mẫu CCLT	42.8033	3	3.05105	1.76153
	Colagen mẫu CLT	65.9800	3	5.20137	3.00302

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Hyp mẫu XCLT - Hyp mẫu XLT	-.72333	.59433	.34314	-2.19974	.75308	-2.108	2	.170
	Colagen mẫu XCLT - Collagen mẫu XLT	-5.57000	4.61293	2.66327	-17.02915	5.88915	-2.091	2	.172
Pair 3	Hyp mẫu CLT - Hyp mẫu CCLT	3.01333	.41259	.23821	1.98839	4.03827	12.650	2	.006
	Colagen mẫu CCLT - Colagen mẫu CLT	-23.17667	3.17557	1.83342	-31.06522	-15.28812	-12.641	2	.006

Phụ lục 68. Kết quả phân tích thống kê hàm lượng kim loại mẫu xương trước và sau loại tủy

		Paired Samples Statistics			
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	K XCLT (g/kg)	.1933	3	.02517	.01453
	K XLT (g/kg)	.2067	3	.00577	.00333
Pair 2	Na XCLT (g/kg)	4.1700	3	.98853	.57073
	Na XLT (g/kg)	4.2967	3	.07234	.04177
Pair 3	P XCLT (g/kg)	109.0833	3	15.17116	8.75908
	P XLT (g/kg)	114.7533	3	2.16200	1.24823

Pair 4	Ca XCLT (g/kg)	218.4333	3	9.86102	5.69326
	Ca XLT (g/kg)	254.9900	3	5.65448	3.26462
Pair 5	Ba XCLT (mg/kg)	10.2700	3	2.24729	1.29747
	Ba XLT (mg/kg)	11.3533	3	.25106	.14495
Pair 6	Cr XCLT (mg/kg)	4.6533	3	4.53315	2.61721
	Cr XLT (mg/kg)	4.7400	3	2.95303	1.70493
Pair 7	Cu XCLT (mg/kg)	2.9033	3	.34298	.19802
	Cu XLT (mg/kg)	3.3100	3	1.66424	.96085
Pair 8	Fe XCLT (mg/kg)	1.6567	3	1.22851	.70928
	Fe XLT (mg/kg)	.9800	3	.88538	.51118
Pair 9	Mg XCLT (mg/kg)	2571.0933	3	89.08085	51.43085
	Mg XLT (mg/kg)	2527.7033	3	35.05343	20.23811
Pair 10	Mn XCLT (mg/kg)	9.5867	3	.43558	.25148
	Mn XLT (mg/kg)	8.0533	3	.62067	.35834
Pair 11	Ni XCLT (mg/kg)	3.4033	3	2.24767	1.29769
	Ni XLT (mg/kg)	3.2600	3	3.69809	2.13510
Pair 12	Sb XCLT (mg/kg)	.1500	3	.10536	.06083
	Sb XLT (mg/kg)	.1433	3	.12423	.07172
Pair 13	Se XCLT (mg/kg)	.9733	3	.41356	.23877
	Se XLT (mg/kg)	1.0200	3	.48570	.28042
Pair 14	Sn XCLT (mg/kg)	.0233	3	.04041	.02333
	Sn XLT (mg/kg)	.0067	3	.01155	.00667
Pair 15	Zn XCLT (mg/kg)	49.7400	3	5.57680	3.21977
	Zn XLT (mg/kg)	51.2367	3	15.68819	9.05758
Pair 16	Al XCLT (mg/kg)	60.9400	3	16.06584	9.27561
	Al XLT (mg/kg)	65.5600	3	26.51103	15.30615

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	K XCLT - K XLT	-.01333	.02082	.01202	-.06504	.03838	-1.109	2	.383
Pair 2	Na XCLT - Na XLT	-.12667	.98216	.56705	-2.56648	2.31315	-.223	2	.844

Pair 3	P XCLT - P XLT	-5.67000	13.51603	7.80349	-39.24569	27.90569	-.727	2	.543	
Pair 4	Ca XCLT - Ca XLT	-36.55667	7.09558	4.09663	-54.18306	-18.93027	-	8.924	2	.012
Pair 5	Ba XCLT - Ba XLT	-1.08333	2.26478	1.30757	-6.70936	4.54269	-.829	2	.495	
Pair 6	Cr XCLT - Cr XLT	-.08667	3.09591	1.78742	-7.77732	7.60399	-.048	2	.966	
Pair 7	Cu XCLT - Cu XLT	-.40667	2.00642	1.15841	-5.39090	4.57756	-.351	2	.759	
Pair 8	Fe XCLT - Fe XLT	.67667	2.08788	1.20544	-4.50991	5.86324	.561	2	.631	
Pair 9	Mg XCLT - Mg XLT	43.39000	72.39088	41.79489	-136.43891	223.21891	1.038	2	.408	
Pair 10	Mn XCLT - Mn XLT	1.53333	.71431	.41240	-.24110	3.30777	3.718	2	.065	
Pair 11	Ni XCLT - Ni XLT	.14333	5.59845	3.23227	-13.76399	14.05065	.044	2	.969	
Pair 12	Sb XCLT - Sb XLT	.00667	.22301	.12875	-.54732	.56065	.052	2	.963	
Pair 13	Se XCLT - Se XLT	-.04667	.09452	.05457	-.28146	.18812	-.855	2	.483	
Pair 14	Sn XCLT - Sn XLT	.01667	.04726	.02728	-.10073	.13406	.611	2	.603	
Pair 15	Zn XCLT - Zn XLT	-1.49667	11.67746	6.74198	-30.50508	27.51175	-.222	2	.845	
Pair 16	Al XCLT - Al XLT	-4.62000	30.45569	17.58360	-80.27614	71.03614	-.263	2	.817	

Phụ lục 69. Kết quả phân tích thống kê một số thành phần (% chất khô) , pH của sản phẩm dinh dưỡng bổ sung cao cá sấu

Paired Samples Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Độ ẩm BTP	4.8800	3	.10536	.06083
	Độ ẩm BDD	4.5800	3	.13528	.07810

Pair	pH BTP	6.3400	3	.18193	.10504
2	pH BDD	6.2967	3	.15275	.08819
Pair	Tro tổng BTP	.4967	3	.04933	.02848
3	Tro tổng BDD	.5300	3	.09539	.05508
Pair	Tro không tan trong acid BTP	.0400	3	.01000	.00577
4	Tro không tan trong acid BDD	.0433	3	.01155	.00667
Pair	Nitơ BTP	6.0867	3	.15308	.08838
5	Nitơ BDD	6.6033	3	.65187	.37636
Pair	Protein thô BTP	38.0233	3	.93853	.54186
6	Protei thô BDD	41.2467	3	4.07885	2.35493
Pair	Béo tổng BTP	.2167	3	.11240	.06489
7	Béo tổng BDD	.2800	3	.07810	.04509

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
Pair		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Độ ẩm BTP - Độ ẩm BDD	.30000	.21703	.12530	-.23912	.83912	2.394	2	.139
Pair 2	pH BTP - pH BDD	.04333	.11590	.06692	-.24458	.33125	.648	2	.584
Pair 3	Tro tổng BTP - Tro tổng BDD	-.03333	.09866	.05696	-.27841	.21175	-.585	2	.618
Pair 4	Tro không tan trong acid BTP - Tro không tan trong acid BDD	-.00333	.01528	.00882	-.04128	.03461	-.378	2	.742
Pair 5	Nitơ BTP - Nitơ BDD	-.51667	.54994	.31751	-1.88279	.84946	-1.627	2	.245
Pair 6	Protein thô BTP - Protei thô BDD	-3.22333	3.45486	1.99466	-	5.35901	-1.616	2	.247
Pair 7	Béo tổng BTP - Béo tổng BDD	-.06333	.12741	.07356	-.37984	.25317	-.861	2	.480

Phụ lục 70. Kết quả phân tích thống kê hàm lượng kim loại mẫu BTP và BDD

		Paired Samples Statistics			
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	K BTP (g/kg)	.2733	3	.00577	.00333
	K BDD (g/kg)	.2200	3	.02000	.01155
Pair 2	Na BTP (g/kg)	1.5700	3	.01000	.00577
	Na BDD (g/kg)	1.3267	3	.19009	.10975
Pair 3	P BTP (g/kg)	.0867	3	.00577	.00333
	P BDD (g/kg)	.1033	3	.01528	.00882
Pair 4	Ca BTP (g/kg)	.1333	3	.06807	.03930
	Ca BDD (g/kg)	.1233	3	.05033	.02906
Pair 5	Ba BTP (mg/kg)	.5400	3	.58643	.33858
	Ba CSPBS (mg/kg)	.5233	3	.28729	.16586
Pair 6	Cr BTP (mg/kg)	.0000a	3	.00000	.00000
	Cr BDD (mg/kg)	.0000a	3	.00000	.00000
Pair 7	Cu BTP (mg/kg)	.4433	3	.09504	.05487
	Cu BDD (mg/kg)	.4867	3	.16623	.09597
Pair 8	Fe BTP (mg/kg)	11.9400	3	2.16377	1.24925
	Fe BDD (mg/kg)	13.3267	3	5.92627	3.42153
Pair 9	Mg BTP (mg/kg)	13.1133	3	1.64543	.94999
	Mg BDD (mg/kg)	10.1267	3	1.25508	.72462
Pair 10	Mn BTP (mg/kg)	.3667	3	.41041	.23695
	Mn BDD (mg/kg)	.3100	3	.20000	.11547
Pair 11	Ni BTP (mg/kg)	.2600	3	.12767	.07371
	Ni BDD (mg/kg)	.2100	3	.10000	.05774
Pair 12	Sb BTP (mg/kg)	.0000a	3	.00000	.00000
	Sb BDD (mg/kg)	.0000a	3	.00000	.00000
Pair 13	Se BTP (mg/kg)	.7600	3	.26153	.15100
	Se BDD (mg/kg)	.6600	3	.04359	.02517
Pair 14	Sn BTP (mg/kg)	.2633	3	.03055	.01764
	Sn BDD (mg/kg)	.1600	3	.05000	.02887
Pair 15	Zn BTP (mg/kg)	28.9600	3	33.23644	19.18907
	Zn BDD (mg/kg)	23.7700	3	5.83298	3.36767
Pair 16	Al BTP (mg/kg)	14.1200	3	5.95097	3.43580
	Al BDD (mg/kg)	14.4333	3	3.32936	1.92221

a. The correlation and t cannot be computed because the standard error of the difference is 0.

Paired Samples Test									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	K BTP - K BDD	.05333	.02517	.01453	-.00918	.11585	3.671	2	.067
Pair 2	Na BTP - Na BDD	.24333	.19502	.11260	-.24113	.72779	2.161	2	.163
Pair 3	P BTP - P BDD	-.01667	.02082	.01202	-.06838	.03504	-1.387	2	.300
Pair 4	Ca BTP - Ca BDD	.01000	.08888	.05132	-.21079	.23079	.195	2	.863
Pair 5	Ba BTP - Ba BDD	.01667	.70316	.40597	-1.73008	1.76341	.041	2	.971
Pair 7	Cu BTP - Cu BDD	-.04333	.13577	.07839	-.38060	.29394	-.553	2	.636
Pair 8	Fe BTP - Fe BDD	-1.38667	7.62794	4.40399	-20.33551	17.56218	-.315	2	.783
Pair 9	Mg BTP - Mg BDD	2.98667	1.44777	.83587	-.60979	6.58312	3.573	2	.070
Pair 10	Mn BTP - Mn BDD	.05667	.32316	.18658	-.74611	.85944	.304	2	.790
Pair 11	Ni BTP - Ni BDD	.05000	.03606	.02082	-.03957	.13957	2.402	2	.138
Pair 13	Se BTP - Se BDD	.10000	.23388	.13503	-.48099	.68099	.741	2	.536
Pair 14	Sn BTP - Sn BDD	.10333	.06658	.03844	-.06207	.26874	2.688	2	.115
Pair 15	Zn BTP - Zn BDD	5.19000	28.6134	16.52000	-65.88982	76.26982	.314	2	.783
Pair 16	Al BTP - Al BDD	-.31333	7.34420	4.24017	-18.55733	17.93066	-.074	2	.948

Phụ lục 71. Biến đổi khối lượng các nhóm chuột trong quá trình uống cao và thực phẩm bổ sung cao cá sấu

Mẫu nghiên cứu	Lô Liều (g/kg)	Khối lượng cơ thể chuột (g)*									
		Ban đầu	1 tuần	2 tuần	3 tuần	4 tuần	5 tuần	6 tuần	7 tuần	8 tuần	
Cao	1	1,85	20,92 ± 0,40	23,62 ± 0,46 ^a	27,21 ± 0,59 ^a	29,55 ± 1,78 ^a	33,07 ± 1,05 ^a	36,02 ± 1,03 ^a	36,82 ± 1,57 ^a	38,46 ± 0,27 ^a	39,03 ± 1,41 ^a
loại tùy	2	3,70	19,78 ± 1,04	23,84 ± 0,12 ^a	27,64 ± 0,97 ^a	29,85 ± 1,58 ^a	32,48 ± 1,05 ^a	36,70 ± 0,85 ^a	37,36 ± 1,72 ^a	38,50 ± 0,83 ^a	39,69 ± 0,22 ^a
Bột thủy phân	3	1,84	20,37 ± 1,11	23,00 ± 1,06 ^a	27,18 ± 2,23 ^a	30,33 ± 2,77 ^a	33,10 ± 3,16 ^a	36,33 ± 2,78 ^a	37,78 ± 1,25 ^a	38,77 ± 0,82 ^a	38,85 ± 0,89 ^a
	4	3,68	20,33 ± 0,90	23,51 ± 0,90 ^a	27,03 ± 1,31 ^a	30,22 ± 2,11 ^a	33,26 ± 0,44 ^a	36,25 ± 0,63 ^a	37,74 ± 0,71 ^a	38,99 ± 0,51 ^a	38,79 ± 0,30 ^a
Bột dinh dưỡng	5	1,84	20,34 ± 0,64	23,55 ± 1,12 ^a	26,60 ± 0,94 ^a	30,35 ± 0,83 ^a	33,66 ± 1,15 ^a	36,47 ± 0,45 ^a	38,10 ± 0,39 ^a	38,82 ± 0,79 ^a	38,49 ± 0,70 ^a
	6	3,68	20,11 ± 0,78	23,55 ± 0,91 ^a	26,59 ± 1,67 ^a	30,38 ± 1,68 ^a	33,84 ± 1,22 ^a	36,65 ± 1,15 ^a	38,32 ± 0,72 ^a	38,79 ± 0,68 ^a	38,89 ± 0,58 ^a
Đối chứng	7	Nước cất	20,23 ± 0,36	23,13 ± 0,70 ^a	26,60 ± 0,39 ^a	29,00 ± 0,76 ^a	32,73 ± 0,25 ^a	35,34 ± 0,68 ^a	36,15 ± 0,61 ^a	37,93 ± 0,50 ^a	38,23 ± 0,83 ^a

* Khối lượng cơ thể chuột được tính trung bình của 3 lần lặp lại (TB ± SD)

^a Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kỳ tự theo sau không giống nhau có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$)

Phụ lục 72. Thời gian bơi của chuột tại các thời điểm ở các lô thử nghiệm

Mẫu nghiên cứu	Lô nghiên cứu	Liều (g/kg)	Thời gian bơi (phút)			
			T ₀	T ₁ giờ	T ₇ ngày	T ₁₄ ngày
Cao loại tủy	1	1,85	39,56 ± 0,86	20,89 ± 0,25	61,00 ± 0,59	72,28 ± 3,20
	2	3,70	36,78 ± 1,95	20,67 ± 2,29	70,50 ± 3,37	82,94 ± 1,84
Bột thủy phân	3	1,84	41,94 ± 0,86	21,39 ± 1,84	61,89 ± 1,29	71,78 ± 2,61
	4	3,68	39,06 ± 0,95	20,89 ± 1,51	69,94 ± 2,94	74,50 ± 4,04
Bột dinh dưỡng	5	1,84	39,72 ± 1,36	20,67 ± 0,76	59,22 ± 2,43	71,67 ± 1,26
	6	3,68	39,22 ± 1,18	21,22 ± 2,37	70,61 ± 1,08	85,00 ± 3,09
Đối chứng	7	NC	41,28 ± 2,22	20,89 ± 0,69	44,00 ± 2,60	44,06 ± 2,50

Phụ lục 73. Tiêu chuẩn cơ sở đề xuất cho sản phẩm dinh dưỡng từ thịt và cao xương cá sấu thủy phân**1. Trạng thái sản phẩm**

- Trạng thái: Bột mịn
- Màu sắc: trắng ngà
- Mùi vị: Hơi ngọt, cay nhẹ và thơm nồng của gừng
- Khối lượng: 5 gram

2. Thành phần cấu tạo

- Bột collagen thủy phân: 23,25%
- Bột protein thủy phân: 23,25%
- Phụ liệu: Đường, acid ascorbic, gừng vừa đủ

3. Chỉ tiêu an toàn**a. Giới hạn về vi sinh vật**

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức tối đa
1.	<i>E.Coli</i>	CFU/g	10
2.	<i>Coliforms</i>	CFU/g	10
3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	CFU/g	kph
4.	<i>Samonella spp</i>	CFU/g	kph
5.	<i>Clostridium perfringens</i>	CFU/g	10
6.	Tổng số nấm men nấm mốc	CFU/g	100
7.	Tổng số nấm mốc	CFU/g	100

b. Giới hạn về kim loại nặng

STT	Tên kim loại	Đơn vị tính	Mức tối đa
1.	Chì (Pb)	ppm	0,1
2.	Cadimi (Cd)	ppm	0,3
3.	Thủy ngân (Hg)	ppm	0,05
4.	Asen (As)	ppm	1

4. Hướng dẫn sử dụng

Công dụng: Giúp bổ sung collagen cho xương khớp, hỗ trợ giúp mạnh gân xương, giảm đau xương khớp, thoái hóa khớp

Đối tượng sử dụng: Dùng cho người bị đau nhức xương khớp.

Liều dùng: Ngày dùng 2 lần, mỗi lần dùng 2 -4 gói.

Chú ý: Thực phẩm này không phải là thuốc, không có tác dụng thay thế thuốc chữa bệnh. Không sử dụng cho người mẫn cảm với bất kỳ thành phần nào của sản phẩm.

Phụ lục 74. Giấy chứng nhận tham gia và đạt yêu cầu về tập huấn thí nghiệm trên động vật của NCS

