

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM**

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

**Chuyên ngành: Công nghệ sinh học
Mã số: 9.42.02.01**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TP. HCM – Năm 2022

Công trình được hoàn thành tại:
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM

Người hướng dẫn khoa học:

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Trường
họp tại: Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

Vào hồigiờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

MỞ ĐẦU

TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Tình hình chăn nuôi cá sấu vì mục đích thương mại ở Tp. Hồ Chí Minh phát triển nhanh trong những năm gần đây. Hiện nay, lợi nhuận chủ yếu của người sản xuất cá sấu đến từ bộ da của cá. 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.

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. Cao động vật là phương thuốc truyền thống phòng trị các bệnh về xương, đặc biệt là loãng xương. Hiện nay tại Việt Nam chỉ có 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, nhưng được nấu bằng phương pháp truyền thống nên mất nhiều thời gian và sản phẩm thu được có màu sẫm đen, hiệu suất trích ly thấp.

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 (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 cho việc thủy phân 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).

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

Nghiên cứu được thực hiện để cải tiến được 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.

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).

TÍNH MỚI CỦA ĐỀ TÀI

- ✓ Nghiên cứu đã làm rõ được ảnh hưởng của các điều kiện trích collagen từ xương cá sấu, hiểu được 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 tính an toàn của sản phẩm phát triển tạo cơ sở cho việc ứng dụng thực tiễn trong tương lai.
- ✓ Luận án đã đưa ra được quy trình cải tiến trong chiết cao cá sấu từ xương 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 có bổ sung các hoạt chất tốt cho sức khỏe con người, không độc qua thử nghiệm in vivo.

Bố cục của luận án Luận án chính thức gồm 150 trang (không bao gồm phụ lục), có 3 chương, 59 bảng số liệu và 42 hình. Luận án đã tham khảo tổng cộng 102 tài liệu trong đó 24 tài liệu tiếng Việt và 78 tài liệu tiếng Anh.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

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 *Crocodylia* (Lê Thị Biên và ctv, 2006).

1.2 Sản phẩm từ cá sấu

Chủ yếu cung cấp nguyên liệu cho sản xuất da, thịt, dầu và móng vuốt.

1.3 Thành phần dinh dưỡng chính trong thịt cá sấu

Kết quả nghiên cứu từ thịt đuôi, cổ, thân và chân cá sấu (*Crocodylus niloticus*) từ 33 - 36 tháng tuổi cho thấy không có sự khác biệt về hàm lượng protein và chất béo giữa các bộ phận cơ thể đã được nghiên cứu.

1.4 Tổng quan về 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.

1.5 Tổng quan về collagen

Collagen là thành phần protein chủ yếu của các mô liên kết, chiếm khoảng 25% - 35% protein tổng số của cơ thể động vật và là thành phần chủ yếu của khung mạng ngoại bào. Collagen tồn tại ở nhiều bộ phận trong cơ thể. Đã có 28 loại collagen được tìm thấy và thông báo trong các tài liệu khoa học. Trên 90% collagen trong cơ thể là dạng I, II, III và IV (Shoulders và ctv, 2009).

1.6 Tổng quan về thủy phân

Thủy phân là quá trình phân cắt một hợp chất cao phân tử thành các phân tử đơn giản hơn dưới tác dụng của các chất xúc tác và có sự tham gia của nước.

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...

1.8 Tổng quan về 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 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 Ứng dụng kết quả nghiên cứu tác dụng dược lý 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 sử dụng trên người. 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.

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

2.1 Nguyên vật liệu, thiết bị và dụng cụ

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

2.2 Nội dung nghiên cứu

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

Nội dung 2. Thủy phân protein thịt cá sấu với enzyme thích hợp có thể phá vỡ cấu trúc và tạo các peptit mạch ngắn hơn.

Nội dung 3. Sấy phun dịch thủy phân để tạo ra sản phẩm dễ dàng sử dụng và bảo quản.

Nội dung 4. Nghiên cứu công thức sản phẩm dinh dưỡng từ bột protein và bột collagen để tìm được công thức phối chế phù hợp.

Nội dung 5. Tính an toàn và tác dụng hỗ trợ sức khỏe của sản phẩm cao xương cá sấu.

2.3 Các phương pháp phân tích

Sử dụng các phương pháp phân tích hóa lý, hóa sinh bằng kỹ thuật sắc ký, điện di, quang phổ hấp thụ nguyên tử, phương pháp Kjeldahl, Bradford, v.v.

2.4 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 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. Trong đó hàm lượng chất béo khá cao trong xương chưa loại tủy $2,55\% \pm 0,51$ sau quy trình xử lý tủy hàm lượng chất béo chỉ còn lại $0,05\% \pm 0,01$ trong xương loại tủy.

3.1.2 Thành phần acid amin và collagen của xương nguyên liệu

Kết quả cho thấy tổng lượng acid amin trong mẫu xương trước loại tủy (15,45 %) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mẫu xương sau khi loại tủy (15,22%). Dữ liệu phân tích cho thấy thành phần các acid amin trong xương chứa nhiều Glutamic acid, Glycine + Histidine, Arginine, Alanine+Prolin, là thành phần trong cấu tạo collagen.

Kết quả phân tích hàm lượng Hydroxylprolin, collagen trong mẫu xương cá sấu trước (2,28%; 17,55%) và sau loại tủy (3,01%; 23,12%) không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê.

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

Kết quả phân tích các khoáng chất, kim loại trong mẫu xương trước và sau loại tủy cho thấy hàm lượng rất cao của P (109,08 – 114,76 g/kg) và

Ca (218,43 - 254,99 g/kg) so với các nguyên tố còn lại, đây cũng là nhóm chất vô cơ chính tạo ra cấu trúc bioapatite trong xương. Một số kim loại độc hại như As, Cd, Pb, Hg không phát hiện. Hàm lượng Ca sau loại tủy (254,99 g/kg) tăng so với mẫu trước loại tủy (218,43 g/kg).

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 collagen

Kết quả thí nghiệm khi nấu ở 80°C thì hàm lượng collagen là $0,22\% \pm 0,000$ và độ thủy phân là $27,781\% \pm 0,000$. Ở 90°C thì hàm lượng collagen là $1\% \pm 0,005$ và độ thủy phân là $36,3\% \pm 0,001$ và ở 100°C thì hàm lượng collagen là $4,217\% \pm 0,069$ và độ thủy phân là $37,22\% \pm 0,012$.

Khi nấu ở 100°C là nhiệt độ phù hợp cho quá trình trích collagen ở áp suất khí quyển. Nhiệt độ cao trao đổi chất mạnh hàm lượng trích nhiều hơn. Do đó trích ở 100°C là điều kiện tối ưu được chọn cho thí nghiệm tiếp theo.

3.2.1.2 Ảnh hưởng của siêu âm đến quá trình trích collagen

Theo kết quả phân tích cho thấy hàm lượng collagen tăng dần từ 10 phút đến 30 phút, sau đó giảm từ phút 60 trở đi. Thời gian xử lý siêu âm 30 phút là tốt nhất.

Mẫu dịch trích đậm nhất ở mẫu 90 phút, mẫu nhạt nhất 10 phút. Mẫu 90 phút có mức thủy phân cao so với các mẫu còn lại.

3.2.1.3 Ảnh hưởng của vi sóng đến quá trình trích collagen

Khi hỗ trợ vi sóng vào quá trình trích có khả quan, tăng hàm lượng collagen. Ở 900W hàm lượng collagen (6%) trích ra nhiều hơn ở 450W là 4,28%. 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). Qua thí nghiệm chọn xử lý vi sóng 10 phút công suất 630W là tốt nhất.

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

Kết quả cho thấy hàm lượng collagen nấu ở 1 giờ và 2 giờ ở 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. Như thế nhiệt càng cao trích ra càng nhiều.

So sánh hàm lượng collagen giữa nấu bình thường 100°C và 121 độ cùng trong 1 giờ thì hàm lượng collagen chênh nhau gần 10 lần.

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

Kết quả so sánh hàm collagen ở 8 giờ thì cao gấp 4 lần khi nấu 2 giờ. Như vậy 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. Sử dụng siêu âm và vi sóng giúp tăng thêm hàm lượng collagen nhưng cũng tăng độ thủy phân. Điều này phù hợp, 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.

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

Kết quả cho thấy mẫu không xử lý có hàm lượng thấp nhất và có xử lý vi sóng cao nhất. Giá trị kháng oxi hóa thì như nhau khoảng 50% thấp hơn nhiều so với đối chứng Vitamin.

Nhìn chung các kết phân tích theo chiều hướng biến thiên tương tự nấu cách thủy, và nấu áp suất cho ta thấy rằng hỗ trợ vi sóng cho hàm lượng collagen cao nhất so với siêu âm và không xử lý

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

- Từ kết quả các thí nghiệm trên ta chọn chế độ vi sóng là tốt nhất để hỗ trợ cho quá trình nấu này. Kết quả của hàm lượng collagen nấu lần sau luôn thấp hơn lần trước, giảm không phải theo đường tuyến tính.

- Theo số liệu thì trích 6 lần tổng hàm lượng của hai phương pháp trích có hỗ trợ và không hỗ trợ bằng nhau. Kết quả nấu áp suất khi có hỗ trợ vi sóng cũng có hiệu quả, tuy nhiên sau lần thứ 2 thì không còn hiệu quả.

- Đối với nấu áp suất khí quyển, 100 độ C thì nên dừng lại ở lần trích thứ 4. Trích ở 121°C thì dừng lại ở lần thứ 2. Khi trích ở 110°C, hàm lượng collagen đạt 1,49% nên dừng lại khi trích lần thứ 3.

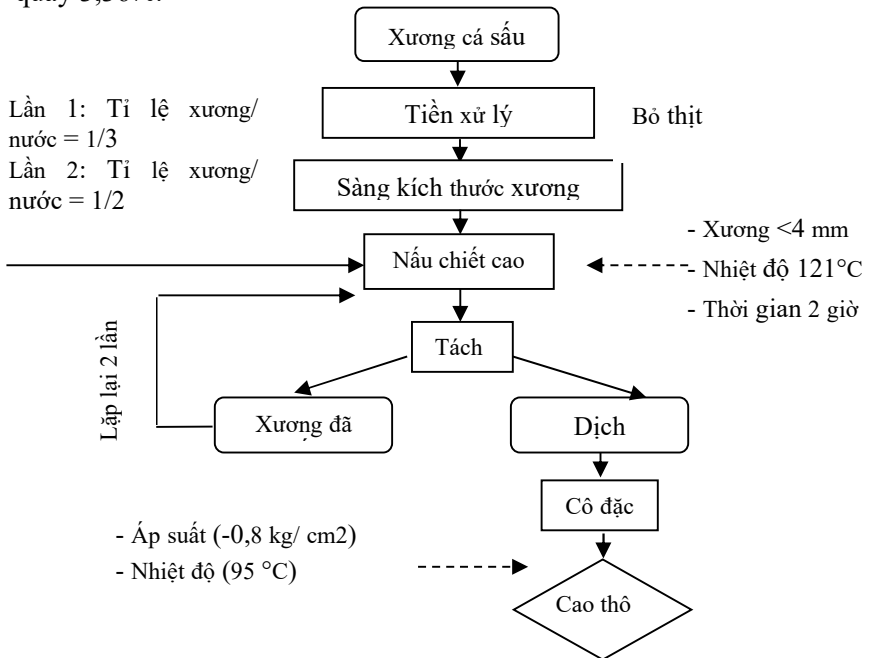
3.2.5 Ảnh hưởng của áp suất chân không đến quá trình cô đặc dịch collagen

Kết quả cho thấy áp dụng cô đặc chân không cải thiện về màu. Mẫu sản phẩm được cô đặc đến độ ẩm từ 28 – 30% 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. Khi cô đặc trên bếp thì nhanh hơn cô đặc ở - 0,4 kg/cm², 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 kg.cm⁻² và ở 95°C.

3.2.6 Quy trình nấu lựa chọn (đề xuất)

Quy trình đề xuất như

Hình 3.1: 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 quy trình nấu thử nghiệm của chúng tôi không hỗ trợ siêu âm hoặc vi sóng. Sau khi trích hàm lượng chất khô của dịch trước cô quay 3,36%.



Hình 3.1. Sơ đồ qui trình đề xuất nấu cao thử nghiệm

3.2.7 Thành phần hóa lý mẫu cao khi áp dụng qui trình nấu

Kết quả phân tích mẫu cao đạt được mục tiêu của đề tài, các chỉ tiêu tốt hơn so với sản phẩm hiện tại của công ty bán trên thị trường. Chỉ tiêu tro toàn phần cao hơn, vì công ty sử dụng xương nguyên trạng nấu nên hàm lượng khoáng xương trong dịch lọc ít. Đặc biệt hiệu suất thu hồi của công ty thấp (7,28%) trong khi đó đối với qui trình nấu thử nghiệm hiệu suất thu hồi đạt tới 13,86%. Điều này cho thấy xay xương có hiệu quả hơn rất nhiều so với không xay xương.

Các mẫu xương đã loại tủy được dùng để nấu cao được các sản phẩm cao thô. Sản phẩm cao có dạng lỏng có màu nâu hổ phách, mùi đặc trưng, hơi tanh.

Tổng hàm lượng các acid amin trong cao cá sấu (66,77%) tương đương với hàm lượng acid amin 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 cho thấy hàm lượng hydroxylprolin mẫu cao đạt 8,58%, và hàm lượng collagen đạt 65.98%.

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

Kết quả phân tích 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) của cao cá sấu cao hơn 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%) (Theo Đỗ Tất Lợi, 2006).

3.3 Nghiên cứu thủy phân protein thịt cá sấu

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

3.3.1.1 Thủy phân bằng Neutral

a) Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme

Kết quả 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 độ thủy phân sau 9 giờ của các mẫu bổ sung enzyme theo tỉ lệ 1%, 2%, 3% và 4% lần lượt là $17,54\% \pm 1,15$, $23,89\% \pm 0,52$,

33,07% \pm 0,74 và 32,75% \pm 1,05. Mức độ thủy phân càng cao khi tăng hàm lượng enzyme và đạt cao nhất ở hàm lượng enzyme 3%.

b) Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Khi thủy phân ở 40°C, 50°C và 60°C, độ thủy phân sau 9 giờ tương ứng là 26,80% \pm 1,13, 31,07% \pm 1,57 và 35,29% \pm 1,36. Ở nhiệt độ 60°C 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

Khi thủy phân ở các pH khác nhau, với nhiệt độ cố định 60°C và tỷ lệ enzyme Neutral 3% thì độ thủy phân đạt được ở các mẫu pH 5, 6, 7, 8 lần lượt là 27,79% \pm 1,95, 36,00% \pm 1,28, 39,02% \pm 1,0 và 35,45% \pm 1,66. 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.

Từ đó 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

Kết quả ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme Alcalase (thực hiện ở pH 7,5 và nhiệt độ 52,5°C) đối với mức độ thủy phân cho thấy 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% \pm 0,26, 18,66% \pm 0,93 và 22,48% \pm 0,73. Độ thủy phân cao nhất khi tỉ lệ enzyme Alcalase bổ sung là 0,1%.

b) Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Từ kết quả phân tích thống kê sau 9 giờ thủy phân cho thấy khi tăng nhiệt độ thủy phân từ 45°C đến 55°C, độ thủy phân tăng từ 20,14% \pm 1,49 lên 24,26% \pm 1,50. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng nhiệt độ lên 65°C mức độ thủy phân lại giảm xuống còn 19,72% \pm 1,75. 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.

c) Khảo sát ảnh hưởng của pH

Độ thủy phân đạt được cao nhất ở pH 8 ($25,52\% \pm 1,40$). Giá trị độ thủy phân này cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với ở pH 7 ($22,20\% \pm 1,67$) sau cùng thời gian. Do đó, pH 8 là phù hợp cho hoạt động enzyme Alcalase với cơ chất là thịt cá sấu.

Dựa vào kết quả trên, đề xuất điều kiện thủy phân thích hợp bằng enzyme Alcalase 2,4L như sau: thủy phân ở 55°C, pH 8 và tỷ lệ enzyme 0,1%.

3.3.1.3 Thủy phân bằng enzyme Flavourzyme

a) Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme Flavourzyme

Thủy phân bằng enzyme Flavourzyme thực hiện ở pH 6 và nhiệt độ 52,5°C. Kết quả cho thấy mức độ thủy phân 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 $9,5\% \pm 0,78$; $12,28\% \pm 0,71$ và $15,12\% \pm 0,58$. 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

Kết quả phân tích sau 9 giờ thủy phân cho thấy khi tăng nhiệt độ từ 50°C đến 55°C, độ thủy phân giảm từ $16,86\% \pm 1,25$ xuống $15,59\% \pm 0,76$. Độ thủy phân sau 9 giờ của mẫu ở 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, 50°C là thích hợp cho enzyme Flavourzyme hoạt động với độ thủy phân là 16,86% khi cơ chất là thịt cá sấu.

c) Khảo sát ảnh hưởng của pH

Độ thủy phân đạt được sau 9 giờ ở pH 6,5 và pH 5,5 lần lượt là $16,64\% \pm 1,45$ và $14,95\% \pm 1,45$. 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 enzyme Flavourzyme.

Từ kết quả trên 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

Khi so sánh ba mẫu thủy phân bằng ba enzyme ở điều kiện thủy phân tối ưu đã thăm dò Flavourzyme (pH 6,5, 50°C); Alcalase (pH 8, 55°C); Neutral (pH 7, 60°C), cho thấy sau 9 giờ thủy phân thì độ thủy phân giữa ba enzyme khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%. Độ thủy phân đạt được của từng enzyme bổ sung 0,2% flavourzyme, 0,1% alcalase và 3% neutral lần lượt là $16,64\% \pm 1,45$; $25,52\% \pm 1,40$ và $39,02\% \pm 1,00$. Như vậy enzyme neutral có khả năng thủy phân thịt cá sấu cao hơn alcalase và flavourzyme.

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

Độ thủy phân giá trị p của mô hình nhỏ hơn 0,05, 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 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 cao.

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. Với $R^2 = 0,97$ và $R^2_{\text{hiệu chỉnh}} = 0,92$ cho thấy có sự tương quan giữa lý thuyết và thực nghiệm.

Mô hình các đáp ứng độ thủy phân và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH được xác định bằng các phương trình mã hóa như sau:

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

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

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. Mức độ thủy phân và hoạt tính bắt giữ gốc DPPH cao thu được tại các giá trị pH lớn hơn 7.

Phân tích 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

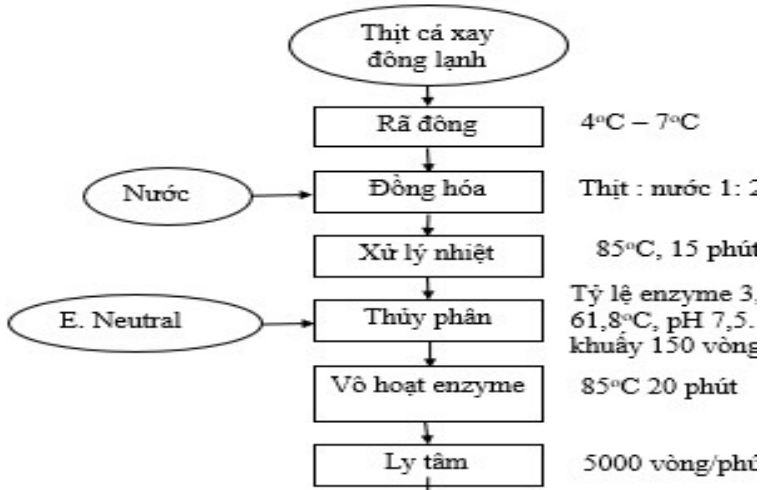
tính bắt giữ gốc DPPH cao hơn. Khi nồng độ enzyme cao, có nhiều enzyme kết hợp với cơ chất nên phân cắt các liên kết peptide nhiều hơn, và do đó sự hòa tan của các protein lớn hơn.

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 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 độ thủy phân đạt 41,80%, hoạt tính bắt giữ gốc DPPH đạt 83,03%.

Về kết quả giữa giá trị dự đoán và giá trị thực nghiệm. 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 (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. Tỷ lệ thu hồi nitơ của sản phẩm dịch thủy phân thu được đạt 82,92%.

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.

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



Hình 3.2. Sơ đồ quy trình thủy phân 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

Bảng 3-1 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 MD (% w/w)	HSTH chất khô (%)	Độ ẩm (%w/w)	Tổng protein (% w/w)	HSTH 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

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

Bảng 3-2. 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

T (°C)	HSTH của chất khô (%)	Độ ẩm (%) w/w	Protein tổng (%)	HSTH 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^e
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

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

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

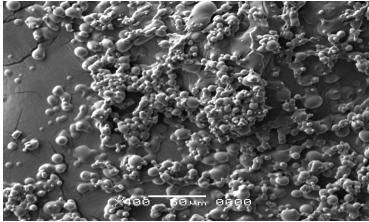
Tốc độ bơm (mL.min ⁻¹)	HSTH chất khô (%)	Âm độ (% w/w)	Protein tổng (% w/w)	HSTH protein (%)
5	68,92±0,76 ^b	4,82±0,04 ^a	29,31±0,43 ^b	78,4±1,54 ^b
10	67,91±0,27^b	4,93±0,03^a	29,34±0,64^b	77,35±1,83^b
15	67,15±0,80 ^b	5,20±0,09 ^b	29,32±0,34 ^b	76,68±1,68 ^b
20	50,44±0,76 ^a	5,98±0,03 ^c	21,22±0,32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

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

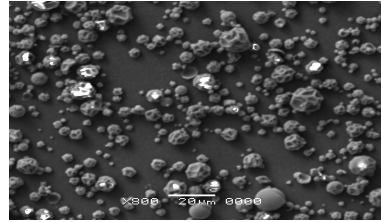
Bảng 3-4. Giá trị thực tế và giá trị dự đoán tối ưu của các đáp ứng

Đáp ứng	Giá trị thực tế	Giá trị dự đoán	Sai số tương đối
Hiệu suất thu hồi chất khô (%)	70,54 ^a	69,33 ^a	1,15
Hiệu suất thu hồi protein (%)	77,82 ^a	77,18 ^a	0,83

Âm độ (%)	5,38 ^a	5,31 ^a	1,34
IC ₅₀ (mg/ml)	1,79 ^a	1,87 ^a	0,08



(a) Hiện tượng đông vón của mẫu bột bổ sung 0% MD



(b) Mẫu bột bổ sung 19,6% MD

Hình 3.3. Mẫu sau khi sấy được chụp bằng kính hiển vi điện tử SEM
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, mẫu được hòa tan trong nước và đánh giá cảm quan nồng độ đường là 38, 40, 42%. Kết quả đánh giá cảm quan của 20 CQV theo thang điểm 5. Hàm lượng ẩm của mẫu bột collagen thủy phân là 6,0%, bột protein thủy phân từ thịt là 5,4%.

Về màu: Không có sự khác biệt lớn giữa 3 mẫu: có màu vàng tương đối đẹp, dung dịch trong suốt, không bị lắng cặn. Về vị, mẫu 40% hàm lượng đường là mẫu nhận được nhiều sự ưa thích nhất về độ ngọt. CQV 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 cao 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 CQV bằng phép thử thị hiếu theo thang điểm 5 được thể hiện ở mẫu 563 (1% acid ascorbic) có điểm cảm quan là $3,33^a \pm 0,00$, mẫu 294 (0,5% acid ascorbic) là $2,96^a \pm 0,01$ và mẫu 961 (1,5% acid ascorbic) là $4,00^b \pm 0,01$.

Các mẫu 563 và 961 được nhận xét khá tốt về vị lần lượt, tuy nhiên mẫu 961 có kết quả tốt hơn so với 2 mẫu còn lại, vị chua ngọt hài hòa. 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 về ảnh hưởng của nồng độ bột gừng lên chất lượng cảm quan của sản phẩm theo thang điểm 5, mẫu 367: 12%, mẫu 121: 14% và mẫu 564: 16%.

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%. 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, CQV 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

Sản phẩm được đóng gói 5g ước tính như sau bột gừng hòa tan (12%); đường (40%); Ascorbic acid (1,5%); Bột collagen (23,25%); Bột protein (23,25%). Các chỉ tiêu phân tích đều nằm dưới giá trị tối đa cho phép với sữa bột uống liền (TCVN 5538:2002).

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

3.5.2.1 Đánh giá cảm quan sản phẩm bột dinh dưỡng

Kết quả 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.

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

Phân tích sơ bộ thành phần sản phẩm sấy phun từ bột thủy phân và bột thủy phân bổ sung đường phèn, gừng (Bảng 3-5) 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 3-5. Kết quả phân tích một số thành phần hóa lý của bột thủy phân đối chứng và bột dinh dưỡng

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

3.5.2.3 Hàm lượng acid amin và collagen của sản phẩm bổ sung cao xương cá sấu

Kết quả phân tích tổng hàm lượng các acid amin trong bột thủy phân đối chứng là 20,83% ± 0,16 nhỏ hơn không đáng kể trong bột dinh dưỡng (bột collagen thủy phân và bột protein thủy phân bổ sung đường phèn, gừng) là 22,68% ± 0,12. Kết quả phân tích cho thấy trong các sản phẩm sấy phun có hàm lượng lớn các acid amin Glu, Gly+His, Ala+Pro. Điều này chứng tỏ khi bổ sung gừng và đường phèn các acid amin không bị tác động làm giảm hàm lượng của chúng.

Kết quả cho thấy không có sự khác biệt về hàm lượng Hydroxyprolin trong mẫu bột thủy phân (3,74% ± 0,20) và bột dinh dưỡng (3,68% ± 0,18); tương tự cho collagen trong mẫu bột thủy phân (28,32% ± 0,18) và bột dinh dưỡng (28,74% ± 0,20).

3.5.2.4 Thành phần khoáng chất và kim loại trong sản phẩm 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 cho thấy hàm lượng các 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.

3.5.2.5 Hàm lượng vi sinh các sản phẩm bột dinh dưỡng

Kết quả phân tích các chỉ tiêu vi sinh: *E.Coli*; *Coliforms*; *Staphylococcus aureus*; *Samonella* spp.; *Clostridium perfringens*;

Tổng số nấm men; Tổng số nấm mốc đều không phát hiện (theo đơn vị tính CFU/g); Ngoại trừ Tổng số vi khuẩn hiếu khí trong mẫu bột thủy phân và bột dinh dưỡng đều có 10^1 (CFU/g) nhưng tất cả đều đạt tiêu chuẩn theo QCVN 8-3:2012/BYT.

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 phèn. 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, acid amin, collagen, khoáng chất, kim loại.

3.6 Nghiên cứu độc tính của cao collagen trích từ xương cá sấu trên cơ thể chuột

3.6.1 Nghiên cứu độc tính cấp của cao collagen trích từ xương cá sấu trên cơ thể chuột

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

3.6.1.1 Biến động về khối lượng

Kết quả 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. 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.

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, 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.

Tiếp tục theo dõi 7 ngày sau khi cho uống cao cá sấu, chuột 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. 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.

3.6.2 Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao collagen từ xương cá sấu trên cơ thể chuột

3.6.2.1 Thông số huyết học trong máu chuột sau khi sử dụng cao collagen

Kết quả theo dõi các chỉ số hồng cầu, Hemolobin, Hematocrit, Bạch cầu, tiểu cầu cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các lô nghiên cứu tại cùng một thời điểm.

Như vậy khi sử dụng cao và sản phẩm 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

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.

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 cho thấy hàm lượng creatinin và urea sau một tháng, hai tháng không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê.

Chỉ số creatinine, urea thấp nhất thuộc 2 lô 5 và 6, đạt giá trị 0,56 mg/dl; 50,93mg/dl ở liều 1,84 g/kg và 0,58 mg/dl; 50,38 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.

3.6.2.4 Chỉ tiêu cholesterol và triglycerid trong máu chuột thí nghiệm

Hàm lượng cholesterol cao nhất trong lô cho chuột uống CLT liều 3,70 g/kg (151,55 mg/dl), thấp nhất trong nhóm chuột cho uống BDD 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.

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.

3.6.2.5 Trọng lượng tim, gan, thận và khảo sát vi thể

Kết quả quan sát tiêu bản vi thể gan, tim, thận 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.

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 dược lý của sản phẩm cao xương cá sấu lên sức khỏe chuột

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 từ cao cá sấu không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê. 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.

Thời điểm T_7/T_0 : Tỉ lệ % thời gian bơi ở các lô uống cao và sản phẩm từ cao cá sấu tăng cao so với lô chứng và đạt ý nghĩa thống kê. Tỉ lệ % thời gian bơi sau 7 ngày cao nhất ở lô chuột thí nghiệm sử dụng cao loại tùy 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. Như vậy, cao và các sản phẩm có tác dụng tăng lực sau 7 ngày sử dụng.

Thời điểm T_{14}/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 tăng cao nhất vẫn ở lô chuột thí nghiệm sử dụng CLT liều 3,70 g/kg (225,85%), và không có sự khác biệt với tỉ lệ % thời gian bơi ở lô chuột sử dụng BDD 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 trọng 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.

Caο cá sấu liều 1,85 g/kg, 3,70 g/kg và sản phẩm sấy phun bổ sung cao cá sấu 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 chắc của xương chuột

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. Như vậy, cao cá sấu và các sản phẩm từ cao cá sấu thể hiện được tính tốt trên xương đối tượng thí nghiệm.

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. 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 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 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 trong co 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 oxy 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 vốn 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 dùng chuột. 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 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 Nhật, 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, Đông 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.