

# **NGHIÊN CỨU TẬN DỤNG CÁ PHẾ LIỆU ĐỂ SẢN XUẤT DỊCH CAO ĐẠM DÙNG TRONG THỨC ĂN NUÔI TÔM, CÁ**

*Dặng Thị Mộng Quyên\*, Trần Thị Xô\*\**

**Reusing the substandard fish to produce the protein hydrolysate for shrimp and fish foods**

*(Summary)*

*In this article, we describe the result of researching the full protein product from substandard fishes of the Fishery Factory by method of hydrolysate combining with enzyme protease of *Bacillus subtilis* and acid to treat substandard fish into product with high protein with hydrolysate component by enzyme 8 hours and acid 2 hours, the product with total nitro is 39 g/litres, humidity 65% in solid solution, fine and used for materials on producing shrimp and fish foods*

## **I. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Ngành công nghiệp chế biến thủy sản sau sản xuất luôn có nguồn phế liệu không nhỏ (đầu cá, các phần phụ còn lại sau khi fillet cá) và đây là vấn đề được các nhà khoa học, các doanh nghiệp và sở môi trường rất quan tâm.

Cho đến nay, nguồn phế liệu này chỉ được dùng để chế biến một số mặt hàng như: Bột thủy sản (bột tôm, cá, ruốc, cua, ghe, sò...), hoặc nghiền để làm thức ăn gia súc. Tuy nhiên, vào giữa mùa vụ, khi lượng cá thu hoạch nhiều thì lượng phế thải cũng chưa sử dụng hết. Ứng dụng công nghệ sinh học để xử lý chất thải thủy sản thành những sản phẩm có giá trị, làm nguồn nguyên liệu để thay cho việc nhập dịch đạm, chất dẫn dụ (100% các nhà máy đều phải nhập), để sản xuất thức ăn cho vật nuôi và gia súc là công việc có lợi ích nhiều mặt. Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu protease của *B. subtilis*, chúng tôi đã xây dựng đề tài nghiên cứu sử dụng enzym protease *B. subtilis* để sản xuất sản phẩm thủy phân giàu đạm từ nguồn phế liệu dùng trong thức ăn nuôi tôm, thay thế được sản phẩm mà các nhà máy hiện đang phải nhập ngoại.

## **II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **1. Đối tượng nghiên cứu**

Cá phế liệu: Sử dụng loại cá phèn, cá ngán dạng phế liệu thu được sau công đoạn fillet của nhà máy chế biến thủy sản đông lạnh số 10 - TP Đà Nẵng. Vi khuẩn *Bacillus subtilis* C<sub>10</sub> do Đại học Bách Khoa Đà Nẵng cung cấp (chúng vi khuẩn này đã được xác định đặc tính và định tên tại Bỉ).

### **2. Phương pháp nghiên cứu**

Phương pháp lấy mẫu và chuẩn bị mẫu theo phương pháp 5 điểm (TCVN 5276-90).

Phương pháp xác định mức độ sinh trưởng của *B. subtilis* bằng máy so màu (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000). Xác định hoạt độ protease bằng phương pháp chuẩn độ focmol. Định lượng nitơ toàn phần và protein thô bằng phương pháp Kjeldahl. Định lượng nitơ amoniac bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước

## **III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **1. Nghiên cứu thu nhận chế phẩm protease *Bacillus subtilis* ở quy mô phòng thí nghiệm**

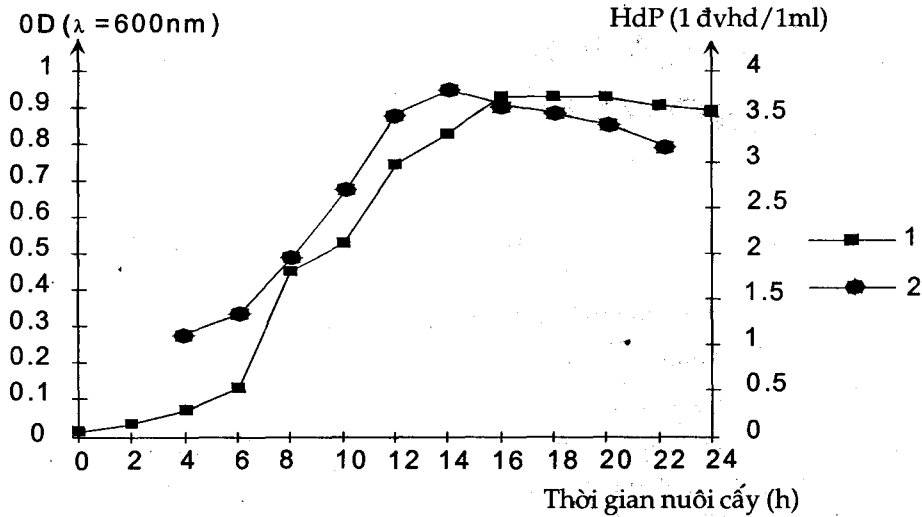
Từ chủng vi khuẩn *B. subtilis* C<sub>10</sub> được lấy từ trường Đại học Bách Khoa Đà Nẵng, chúng tôi tiến hành tuyển chọn lại giống nhằm đảm bảo yếu tố thuần khiết cũng như khả năng hoạt hoá của chủng. Sau đó tiến hành khảo sát động thái sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp protease của *B. subtilis* trên môi trường lỏng.

Với thành phần môi trường thích hợp cho *B. subtilis* phát triển, vừa tổng hợp được protease hoạt lực cao: Pepton (1%), NaCl (0,5%), cao thịt (0,3%), cao nấm (1%), casein (0,05%)

Để kiểm tra động thái sinh trưởng và phát triển của *B. subtilis*, chúng tôi sử dụng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 600nm. Hoạt độ enzym protease xác định bằng phương pháp chuẩn độ Focmol. Kết quả được biểu diễn như hình 1

Kết quả khảo sát cho thấy mật độ tế bào vi khuẩn cao nhất sau khi nuôi cấy 16 giờ và lượng enzym tìm thấy cao nhất sau 14 giờ nuôi. Để có hàm lượng protease cao, chúng

\* Trường Cao đẳng LT-TP (Đà Nẵng). \*\* TS. Trường ĐHBK - ĐH Đà Nẵng



**Hình 1. Đồ thị biểu diễn động thái sinh trưởng và sinh tổng hợp protease của *Bacillus subtilis* theo thời gian**

*Ghi chú:* Động thái sinh trưởng của vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Khả năng sinh tổng hợp protease của *Bacillus subtilis*.

tôi chọn thời gian thu dịch chiết enzym trong khoảng 14 – 16 giờ nuôi cấy.

Để thu được chế phẩm protease nhiều, hoạt lực cao phục vụ cho quá trình nghiên cứu, đồng thời chi phí sản xuất vừa phải, đảm bảo tính kinh tế, chúng tôi lựa chọn môi trường nuôi cấy *B. subtilis* của *Đỗ Thị Bích Thủy*, trong đó bao gồm: Cao thịt (0,05%), pepton (0,5%), cao nấm (0,1%), NaCl (0,5%), bột sắn thô (5,2%) và bột phế liệu tôm (1,1%). Tiến hành xác định hoạt lực chế phẩm enzym thu được và so sánh với hoạt

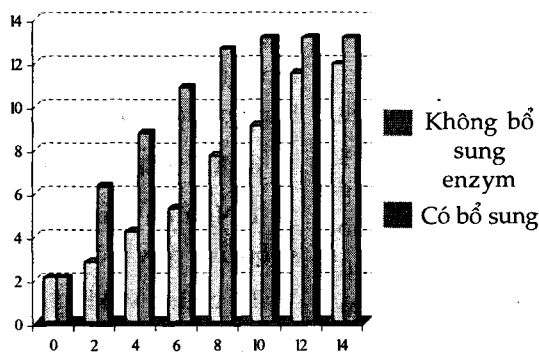
lực enzym khi nuôi cấy trên môi trường cơ bản (thịt – pepton) trong cùng điều kiện. Kết quả thu được: Hoạt lực enzym ở 2 loại môi trường chênh lệch không đáng kể (2,82

và 2,84 đvhd/ml). Vì vậy, hoàn toàn bổ sung bột sắn thô và bột phế liệu tôm trong quá trình nuôi cấy *B. subtilis*.

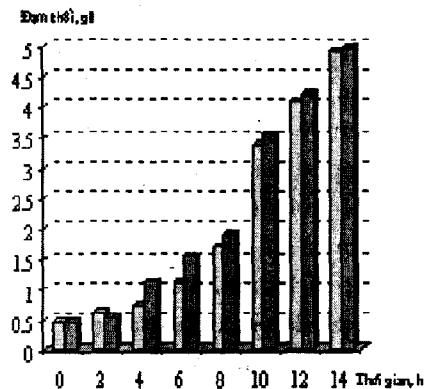
## 2. Khảo sát một số chỉ tiêu của cá phế liệu (Bảng 1)

Để có thể đánh giá chất lượng của nguồn nguyên liệu ban đầu, chúng tôi đã khảo sát một số chỉ tiêu hoá học và đã trình bày trong bảng 1. Sau khi fillet, tôi thấy hàm lượng protein thô của cá phế liệu còn 1,164%, chiếm tỉ lệ (5,8 - 5,96%) so với ban đầu. Đây là một tỉ lệ không nhỏ. Như vậy, nếu không có biện pháp xử lý một cách hợp lý nguồn cá phế liệu sẽ gây ra sự lãng phí và tổn thất chất dinh dưỡng rất lớn.

Hàm lượng nitơ amoniac chiếm tỉ lệ 1,036 g/l (0,052%). Theo tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 3251- 79), cá phế liệu đạt yêu cầu dùng để nghiên cứu.



**Hình 2. Hàm lượng đạm tan tạo thành khi thủy phân có bổ sung và không bổ sung enzym**



**Hình 3. Hàm lượng đạm thoái hành khi thủy phân có bổ sung và không bổ sung enzym**

## 3. Nghiên cứu khả năng thủy phân cá phế liệu của chế phẩm enzym

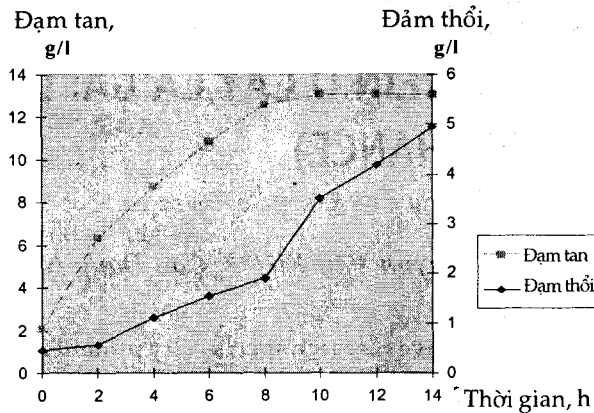
Chọn tỉ lệ dịch chiết enzym là 20% để phối trộn thủy phân cá phế liệu sau này. *Trường hợp 1:* Thủy phân cá phế liệu tự nhiên, không bổ sung chế phẩm enzym. *Trường hợp 2:* Thủy phân cá phế liệu có bổ sung enzym, với tỉ lệ dịch chiết enzym là 20% so với khối lượng nguyên liệu.

Với cả 2 trường hợp trên, đều tiến hành thủy phân trong cùng một điều kiện: pH = 6,5, nhiệt độ 50°C

Từ các kết quả của hình 2 và hình 3 chúng tôi tiến hành chọn thời gian thủy phân nguyên liệu có bổ sung enzym là 8h.

**Bảng 1. Một số chỉ tiêu hóa học của cá phế liệu**

Chỉ tiêu	Đơn vị	%	g/l
Độ ẩm		76,83	
Nitơ toàn phần(NN)		0,186	18,54
Protein thô		1,164	115,87
Nitơ amin(Naa)		0,49	4,9
Nitơ amoniac $N_{NH_3}$		0,052	1,036



**Hình 4. Hàm lượng đạm tan và đạm thối sau 14 giờ thủy phân có bổ sung enzym**

Sau 8 h thủy phân bằng enzym, chúng tôi nhận thấy dịch thủy phân vẫn còn đặc, sệt, một số cơ thịt dạng nhỏ vẫn còn, một lượng protein chưa thủy phân và gây khó khăn cho quá trình lọc tách xương vẩy sau này.

#### 4. Nghiên cứu phối hợp hai phương pháp thủy phân cá phế liệu

Phương án (E - A): Thủy phân bằng enzym trước, bằng axit sau, và phương án (A - E): Thủy phân bằng axit trước, bằng enzym sau. Thời gian thủy phân bằng enzym: 8 giờ, bằng axit: 2 giờ. Sơ đồ trình tự phối hợp hai phương pháp thủy phân được trình bày như sau:

**Phương pháp E-A:** Cá phế liệu → Phối trộn → Thủy phân bằng enzym → Thủy phân bằng axit → Trung hòa → Loại xương → Dịch thủy phân

**Phương pháp A-E:** Cá phế liệu → Phối trộn → Thủy phân bằng axit → Trung hòa → Thủy phân bằng enzym → Loại xương → Dịch thủy phân

**Bảng 2. So sánh chỉ tiêu chất lượng của hai phương pháp**

Chỉ tiêu	Phương án E-A	Phương án A-E
Hàm lượng nitơ tổng số (NN) (g/l)	21,3	21,0
Hàm lượng nitơ amin (Naa) (g/l)	12,1	10,55
Hàm lượng nitơ amoniác $N_{NH_3}$ (g/l)	1,17	3,65
pH dung dịch	6,5	6,5
Trạng thái	Dịch lỏng nhiều, dễ loại xương, bã	Dịch lỏng ít
Màu sắc	Vàng nâu nhạt	Vàng nâu nhạt
Mùi	Tanh tự nhiên Có mùi thơm nhẹ của mắm nêm	Tanh tự nhiên Không có mùi thơm

**Bảng 3. Một số chỉ tiêu chất lượng của dịch đạm**

Chỉ tiêu	Sản phẩm
Hàm lượng nitơ tổng số (g/l)	39
Hàm lượng nitơ axit amin (g/l)	21,6
Hàm lượng nitơ amoniác (g/l)	3,95
Độ ẩm (%)	65
Nồng độ chất khô ( $^{oBx}$ )	30
Màu sắc	Dịch có màu vàng xám
Mùi	Không hôi thối, có mùi mắm nêm nhẹ
Trạng thái	Dịch sệt, mịn, sánh

Sau đó chúng tôi tiến hành so sánh chỉ tiêu chất lượng của hai phương pháp thủy phân (Bảng 2).

Điều kiện thủy phân bằng enzym: Muối: 3%, dịch chiết enzym: 20% (dạng lỏng) nước: 30%, nhiệt độ: 50°C. Điều kiện thủy phân bằng axit: Nồng độ muối: 3%, nhiệt độ thủy phân: 90°C, thể tích HCl 7N: 20%, trung hòa bằng  $Na_2CO_3$  20%.

Với các kết quả trên, chúng tôi chọn phương pháp thủy phân phối hợp: Thủy phân bằng enzym trước, bằng axit sau cho kết quả tốt hơn nên chúng tôi sử dụng phương pháp này để sản xuất sản phẩm.

#### 5. Nghiên cứu giải pháp hoàn thiện sản phẩm

Dịch đạm sau khi thủy phân có nồng độ chất khô thấp, hàm lượng chất dinh dưỡng nhiều nên dễ bị hư hỏng trong thời gian ngắn. Vì vậy cần phải có biện pháp để thu được dịch đạm nồng độ cao và có thời gian bảo quản lâu.

Chúng tôi tiến hành theo các bước như sau: Sau 10 giờ thủy phân bằng enzym - axit và trung hòa bằng  $Na_2CO_3$  20% thì dung dịch được đun sôi ở 100°C trong thời gian 10 phút. Dịch thu được đem lọc qua lưới = 1mm để loại bỏ xương, tuy nhiên, vẫn lẫn một ít bã theo xương. Cô đặc dung dịch thu được ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 1-2 giờ, khuấy đảo liên tục. Khi dung dịch đạt nồng độ khoảng 30<sup>oBx</sup> thì dừng quá trình cô đặc. Để nguội dung dịch, xay nhuyễn thu được sản phẩm.

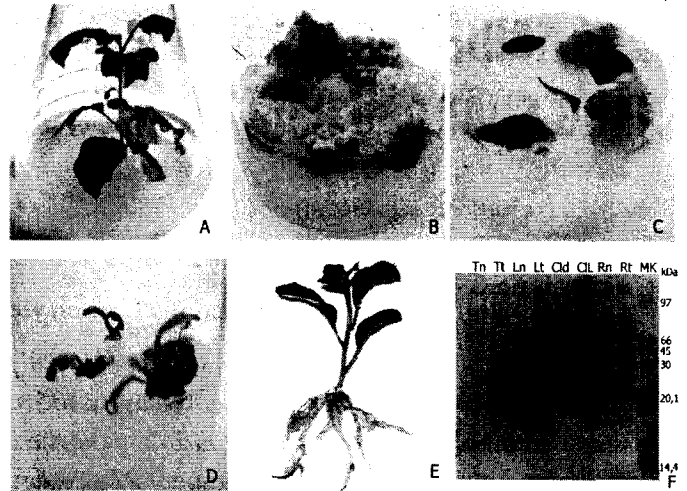
(Xem tiếp trang 47)

nhau giữa các bộ phận. Trong các loại mẫu được nghiên cứu cho thấy protein tích lũy nhiều nhất ở callus (khoảng 30 mg/g mẫu). Phổ điện di protein cho thấy, trọng lượng phân tử protein của cây cà gai leo chủ yếu ở các khoảng 18, 20, 35, 80 và 100 kDa. Mức độ đậm nhạt của các băng protein trên phổ ở các mẫu khác nhau cũng không giống nhau. Ở thân chủ yếu hai loại protein nằm khoảng 80 và 100 kDa, ở lá và callus có các protein nằm ở khoảng 20, 35, 80 và 100 kDa, ở rễ ngoài các băng protein giống như ở lá và callus thì còn có thêm băng protein 18 kDa. Rễ là bộ phận cần được sử dụng làm nghiên cứu để tạo sinh khối và tách chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học. □

**Người phản biện:** TS Huỳnh Ngọc Thạch

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Văn Hợp, Vũ Xuân Phương (2003), Các loài chứa alkaloid trong họ Cà (Solanaceae Juss), TC Sinh học, 25(4): 27-31.
2. Huỳnh Văn Kiệt, Cao Đăng Nguyên, Nguyễn Hoàng Lộc (2005). Ảnh hưởng của một số chất kích thích sinh trưởng lên khả năng tái sinh in vitro cây cà gai leo (Solanum hainanense Hance), Báo cáo Khoa học Hội nghị những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học Sự sống toàn quốc, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, 602-605.
3. Phạm Kim Mãn, Nguyễn Bích Thu, Trần Văn Hanh (1999), Thông báo tác dụng chống ung thư của cà gai leo, TC Dược liệu, 3(4): 126.
4. Vũ Hoài Sâm, Phạm Văn Hiến (2003), Nghiên cứu nhân nhanh in vitro cây ba kích, TC Dược liệu, 8(4): 99-103.
5. Nguyễn Bích Thu, Nguyễn Minh Khai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị



**Hình 1.** Cây cà gai leo *in vitro*: (A) Chồi phát triển trên môi trường có bổ sung IBA 0,5 mg/l, (B) Callus phát triển trên môi trường có bổ sung BA 2mg/l, (C) Callus phát triển trên môi trường có bổ sung 2,4-D 8 mg/l, (D) Tái sinh chồi từ callus, (E) Cây cà gai leo hoàn chỉnh, (F) Phổ điện di protein

6. Nguyễn Bích Thu, Nguyễn Thị Quý, Do Young Yoon, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu (2001) Bước đầu nghiên cứu tác dụng ức chế của cà gai leo đối với gen gây ung thư của virus, TC Dược liệu, 6(4): 118-121.
7. Viện Dược liệu (1993), Tài nguyên cây thuốc Việt Nam, Nxb KH&KT.
8. Chuenboonngarm N., S. Charoonsote and S. Bhamarapavati (2001), Effect of BA and 2iP on shoot proliferation and somaclonal variation of *Gardenia jasminoides* Ellis in vitro culture, Science Asia, 27: 137-141.

## NGHIÊN CỨU TẬN DỤNG...

(Tiếp theo trang 43)

### IV. KẾT LUẬN

*Bacillus subtilis* là loại vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp protease hoạt lực mạnh nhất khi nuôi cấy 14 giờ (3,80 đvhd/ml).

Khi nuôi cấy *B. subtilis* trên môi trường có bổ sung bột phế liệu tôm và bột sắn thô, đồng thời giảm thành phần cao thịt, cao nấm và pepton thì hoạt lực enzym thay đổi không đáng kể (2,82 đvhd/ml), nên có thể sử dụng để giảm giá thành sản phẩm.

Bằng phương pháp thủy phân kết hợp giữa enzym protease của *B. subtilis* và axit đã xử lý cá phế liệu để thu được sản phẩm có độ đậm cao với thời gian thủy phân bằng enzym 8giờ và axit 2giờ, sản phẩm có hàm lượng Nitơ tổng số là 39 g/l, độ ẩm 65%.

Sản phẩm đã được sản xuất với quy mô thử nghiệm 10 kg, kết quả nghiên cứu này cho thấy khả năng sử dụng enzym protease trong xử lý cá phế liệu. □

**Người phản biện:** TS. Đặng Minh Nhật

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Vũ Ngọc Bội (2003), "Ảnh hưởng của nồng độ muối ăn đến quá trình thủy phân cơ thịt cá mối bằng protease *Bacillus subtilis*", Tạp chí thủy sản, (4), tr. 17 - 18.
- [2] Vũ Ngọc Bội (2004), Nghiên cứu quá trình thủy phân protein cá từ bacillus subtilis, Luận án tiến sĩ sinh học, Trường Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, TP HCM.
- [3] Đỗ Văn Ninh (2003), "Một số tính chất cơ bản của enzym nội tạng cá thu", Khoa Học Công Nghệ, (3), tr. 20 - 22.
- [4] Đỗ Thị Bích Thủy - Trần Thị Xô (2004), "Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố lên khả năng sinh protease của *Bacillus subtilis*". Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn
- [4] Kunamaneni A... (2003) "Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* ppm-11" Andhra University, Viakhapatnam, India.