

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN DẦU CÁ HỒI BẰNG LIPASE TỪ MỦ ĐU ĐỦ

OPTIMISATION OF SALMON OIL HYDROLYSIS WITH PAPAYA LIPASE

Phan Thị Việt Hà¹, Huỳnh Thị Phương Thu², Đặng Minh Nhật³

¹*Trường Đại học Duy Tân; viethabk99@gmail.com*

²*Chi cục Tiêu chuẩn, Đo lường, Chất lượng Tỉnh Quảng Ngãi; phuongthu.cc@gmail.com*

³*Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng; dmnhat@dut.udn.vn*

Tóm tắt - Quá trình làm giàu DHA, EPA trong dầu cá bằng phương pháp enzyme bao gồm nhiều bước trong đó thủy phân dầu cá bởi lipase không đặc hiệu thường là bước đầu của quá trình. Trong nghiên cứu này, kết quả phân tích sắc ký khí thành phần dầu cá hồi trước và sau khi thủy phân bởi lipase từ mủ đu đủ (CPL) đã cho thấy CPL không có tính đặc hiệu với các acid béo có trong dầu cá hồi, do đó có thể ứng dụng trong bước 1 của quy trình làm giàu cá bằng enzyme. Sử dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm Box-Hunter, nghiên cứu đã xác định được điều kiện tối ưu để thủy phân dầu cá hồi bằng CPL như sau: nhiệt độ 29°C và pH = 7,6; tỉ lệ nước/cơ chất là 4,36:1 và nồng độ enzyme là 1,34%. Nghiên cứu này là tiền đề cho việc ứng dụng CPL để làm giàu DHA, EPA trong dầu cá hồi phục vụ cho ngành sản xuất thực phẩm chức năng.

Từ khóa - Dầu cá hồi; làm giàu DHA, EPA; lipase đu đủ; tối ưu hóa

Abstract - The process of DHA and EPA enrichment for fish oil by enzyme includes several steps, among which hydrolysis of fish oil with non-specific lipase is usually used as the first step. In this study, the results of fish oil composition analysis by GC before and after the hydrolysis show that lipase from *Carica papaya* latex (CPL) was non-specific lipase and can be exploited in the first step of DHA and EPA enrichment procedure. Using designed experiment of Box-Hunter model, the optimized conditions of fish oil hydrolysis with CPL are determined as follows: temperature of 29°C and pH of 7.6; water/oil ratio of 1.36:1 and enzyme level of 1.34%. This study will be used as the essential step in application of CPL in DHA and EPA enrichment of salmon oil to produce functional food.

Key words - Salmon oil; DHA and EPA enrichment; papaya lipase; optimisation

1. Đặt vấn đề

Lipase là loại enzyme có vai trò quan trọng trong các lĩnh vực khác nhau như trong công nghệ thực phẩm, sản xuất chất tẩy rửa và dược. Lipase và esterase đều có thể xúc tác thủy phân liên kết ester của lipid. Esterase chỉ thủy phân liên kết ester của lipid chứa các acid béo mạch ngắn, trong khi lipase có thể thủy phân được cả các liên kết ester của lipid chứa các acid béo mạch ngắn và mạch dài [1; 2]. Cho đến nay hầu hết các lipase thương mại được ứng dụng có nguồn gốc từ vi sinh vật. Tuy nhiên, lipase từ thực vật cũng được nghiên cứu ứng dụng trong một vài lĩnh vực như lipase từ mủ đu đủ (CPL) với ưu điểm rẻ tiền, dễ dàng được chấp nhận và có tính đặc hiệu riêng. CPL được ứng dụng trong tổng hợp các triacylglycerol chuỗi ngắn có năng lượng thấp và chuỗi dài dùng trong sữa công thức cho trẻ sơ sinh [3]. Ngoài ra, CPL cũng được dùng để xúc tác phản ứng tổng hợp bơ ca cao từ dầu cọ [4]. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào sử dụng CPL để thủy phân dầu cá.

Dầu cá là nguồn chứa nhiều acid béo bất bão hòa đa (PUFA) bao gồm eicosapentanoic acid (C20:5 n-3, EPA) và docosahexaenoic acid (C22:6 n-3, DHA). Hai acid béo này được chứng minh là có khả năng phòng chống được các loại bệnh như tim mạch, viêm nhiễm, dị ứng hay tiểu đường. Ngoài ra, chúng còn là thành phần không thể thiếu trong khẩu phần ăn của trẻ em vì giúp tăng cường thị giác và phát triển trí não [5].

Hàng năm, lượng phụ phẩm từ cá hồi thải ra từ các nhà máy chế biến thủy sản của nước ta là rất lớn. Dầu cá hồi thu nhận từ phụ phẩm có chứa hàm lượng DHA, EPA không cao. Do đó, việc tạo ra những sản phẩm dầu cá giàu DHA, EPA từ những phụ phẩm đó sẽ mang lại lợi ích về mặt kinh tế lớn. Việc tăng hàm lượng acid béo PUFA trong dầu cá bởi enzyme lipase cố định có nhiều ưu điểm hơn so với phương

pháp hóa học như phản ứng trong điều kiện êm dịu, không ô nhiễm môi trường, enzyme có thể tái sử dụng nhiều lần [6].

Quá trình làm giàu DHA, EPA trong dầu cá được thực hiện bởi nhiều phương pháp khác nhau tùy thuộc vào enzyme sử dụng có đặc hiệu hay không với DHA, EPA. Nếu lipase sử dụng là không đặc hiệu với acid béo no và không no thì quá trình làm giàu gồm hai bước là thủy phân và sau đó là ester hóa chọn lọc. Do đó, quá trình thủy phân đóng vai trò quan trọng trong việc làm giàu DHA, EPA trong dầu cá hồi.

Nghiên cứu này nhằm ứng dụng lipase thô từ mủ đu đủ (CPL) để thủy phân dầu cá hồi, xác định điều kiện tối ưu của quá trình thủy phân. Đây là bước nghiên cứu đầu tiên trong quá trình nghiên cứu làm giàu DHA, EPA từ dầu cá hồi bằng lipase thô từ mủ đu đủ.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Mủ đu đủ: được thu từ giống đu đủ (*Carica papaya* L.) trồng tại huyện Đại Lộc, tỉnh Quảng Nam, Việt Nam.

Mủ đu đủ lấy ở quả xanh còn ở trên cây. Dùng dao inox có đầu nhọn rạch dọc theo quả ở phần đường kính quả to nhất. Hứng lấy mủ chảy ra bằng lọ nhựa miệng rộng, mủ thu được đem sấy thăng hoa (-40°C, 8h) để thu mủ khô, bảo quản ở -4°C chuẩn bị cho việc nghiên cứu tiếp theo.

- Dầu cá hồi: thu được từ lườn cá hồi (*Salmon oncorhynchus* spp) mua tại Công ty TNHH chế biến thực phẩm D&N, Đà Nẵng.

- Hóa chất: Tris Base được sản xuất bởi Bio Basic, Canada; n-hexan có nguồn gốc từ Sigma-Aldrich, Singapore. Các hóa chất khác gồm gum arabic, HCl, Na₂HPO₄.12H₂O, NaH₂PO₄.7H₂O, HCl; NaOH, CH₃COOH, CH₃COONa, Na₂SO₄, KOH, diethyl etc,

phenolphthalein, BHA (Butylated hydroxyanisole), BHT (Butylated Hydroxy Toluene) có xuất xứ Trung Quốc. Tất cả các hóa chất sử dụng đều đạt chuẩn phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu nhận dầu cá hồi

Lườn cá hồi sau khi được cắt nhỏ (3cm – 5cm), đem hấp cách thủy 20 phút. Thu phần dầu tự chảy ra từ lườn cá trong quá trình hấp ở đáy nồi. Phần lườn cá sau khi hấp được đem đi ép bằng máy ép thủy lực để thu triệt để phần dầu còn lại. Sau đó, để lắng hỗn hợp và gạn lấy phần dầu ở phía trên.

Dùng Na_2SO_4 khan để loại bỏ nước trong dầu thu được, sau đó bổ sung chất chống oxy hóa BHA, BHT, bảo quản trong bình kín ở -4°C .

2.2.2. Phân tích các chỉ tiêu hóa sinh của dầu cá

Các chỉ tiêu chất lượng của dầu cá gồm chỉ số acid, chỉ số ester, chỉ số Iodine được xác định theo TCVN 6127:2010 [7]; TCVN 6126:2015 [8], TCVN 6122:2010 [9].

2.2.3. Phương pháp thu nhận enzyme lipase thô từ mù ấu đừ

Cân 25g mù khô cho vào 825 ml nước cất, khuấy 3 phút. Ly tâm lạnh mẫu 6000 vòng/phút, trong 20 phút ở 4°C . Loại bỏ dịch nổi, thu tủa. Quá trình hòa tan được lặp lại 3 lần. Sấy tủa bằng phương pháp sấy thăng hoa ở -40°C trong 16h. Nghiền mịn mẫu, thu được chế phẩm lipase dạng thô (CPL), bảo quản trong bình thủy tinh đậy kín [10], [11].

Hiệu suất thu nhận chế phẩm lipase được tính theo công thức sau:

Hiệu suất thu nhận = $\frac{(\text{Khối lượng enzyme lipase sau khi sấy})}{(\text{Khối lượng mù ấu đừ khô})} \times 100\%$

2.2.4. Phương pháp xác định hoạt độ lipase

Hoạt độ lipase được xác định theo phương pháp chuẩn độ [12]: Chuẩn bị hệ nhũ tương gồm 180 ml nước cất, 0,4g natri benzoat, 20 ml dầu cá hồi và 1g gum arabic. Đánh tan bằng máy đồng hóa siêu âm trong 5 phút, thu được hệ nhũ tương đồng nhất. Mỗi mẫu phân tích bao gồm 5ml dầu olive đã được nhũ hóa, 5ml dung dịch đệm Tris - HCl 0,1N (pH=8) và lượng enzyme phù hợp, lắc đều và ủ ở 35°C trong 30 phút. Dùng phản ứng bằng cách cho thêm 15ml hỗn hợp acetone: ethanol (1:1). Mẫu thu được đem chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1N với chỉ thị phenolphthalein 1%. Thể tích dung dịch NaOH 0,05N dùng để chuẩn độ mẫu phân tích là b, mẫu trắng là a.

Hoạt độ lipase (U/g) được tính theo công thức:

$$\text{Hoạt độ lipase} = \frac{(b-a)0,05.1000}{t.m}$$

Trong đó, t là thời gian phản ứng thủy phân xảy ra (phút); m là lượng enzyme tham gia phản ứng (g); 0,05 là nồng độ tương đương lượng gam của NaOH.

Đơn vị hoạt độ lipase (U/g) được xác định là lượng enzyme xúc tác giải phóng ra $1\mu\text{mol}$ acid béo tự do trong thời gian 1 phút ở điều kiện xác định [13].

2.2.5. Thủy phân dầu cá

Cho vào bình nón hỗn hợp gồm 5g dầu cá hồi và nước cất với tỷ lệ 5:1 (v/v), thêm 4ml đệm phosphate (pH = 7; 0,08M). Sau đó, thêm vào hỗn hợp 4% lượng CPL so với cơ chất. Không khí trong bình nón được thay bằng khí nitơ,

và dịch huyền phù tạo thành được lắc trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút, ở 30°C trong 24h. Mẫu đối chứng tiến hành tương tự như trên nhưng không có enzyme.

Kết thúc quá trình thủy phân, sản phẩm thu được sau phản ứng được lọc để loại enzyme. Sau đó hòa tan trong 50ml n-hexane và được chiết với 15 ml dung dịch KOH 1N pha trong ethanol [14]. Thu phân đoạn không phân cực (tan trong n-hexane) chứa acylglycerol không thủy phân và phân đoạn phân cực chứa acid béo tự do ở dạng muối kali. Phân đoạn không phân cực được đem đi phân tích sắc ký khí để xác định thành phần phân acid béo trong mẫu.

2.2.6. Phương pháp quy hoạch thực nghiệm

Nhằm mục đích thủy phân dầu cá để thu các acid béo với hiệu suất thủy phân cao nhất, quá trình tối ưu hóa các thông số ảnh hưởng đến quá trình thủy phân dầu cá hồi bởi CPL được thực hiện thông qua các thí nghiệm quy hoạch thực nghiệm và tối ưu hoá bằng công cụ của phần mềm Minitab 18.0.

a. Tối ưu hóa nhiệt độ và pH của quá trình thủy phân dầu cá hồi

Thí nghiệm được khảo sát theo quy hoạch thực nghiệm Box-Hunter với 2 yếu tố ảnh hưởng:

- Nhiệt độ (X_1) với miền khảo sát: $28 - 42^\circ\text{C}$;
- pH (X_2) với miền khảo sát: 6,6 – 9,4.

Hàm mục tiêu là hiệu suất thủy phân (Y).

Chuẩn bị mẫu: mỗi mẫu chứa 2g dầu cá hồi, với 4ml đệm theo từng pH khảo sát, 10ml nước, 0,32g gum Arabic, 0,08g enzyme. Bỏ mẫu vào máy lắc, lắc với tốc độ 200 v/p, ở từng nhiệt độ khảo sát. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Mẫu sau thủy phân được xác định chỉ số acid và tính hiệu suất thủy phân DH % như sau [15]:

$$DH(\%) = \frac{\text{Chỉ số acid(mẫu thủy phân)} - \text{mẫu đối chứng}}{\text{Chỉ số xà phòng hóa(dầu ban đầu)} - \text{Chỉ số acid(dầu ban đầu)}}$$

b. Tối ưu hóa tỷ lệ nước/cơ chất và nồng độ enzyme

Thí nghiệm được khảo sát theo quy hoạch thực nghiệm Box-Hunter với 2 yếu tố ảnh hưởng:

- Tỷ lệ nước/cơ chất (X_3) trong khoảng: 2,6-5,4;
- Nồng độ enzyme (X_4) trong khoảng 0,3-1,7%.

Chuẩn bị mẫu: mỗi mẫu chứa 2g dầu cá hồi, với 4ml đệm photphate có pH tối ưu tìm được ở trên, lượng nước theo khảo sát, 0,32g gum Arabic cùng với nồng độ enzyme theo từng mẫu thí nghiệm khảo sát. Bỏ mẫu vào máy lắc, lắc với tốc độ 200 vòng/phút, ở nhiệt độ tối ưu tìm được ở trên. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Mẫu sau khi thủy phân được xác định chỉ số acid để tính được hiệu suất thủy phân.

2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả phân tích được thể hiện là giá trị trung bình của 3 thí nghiệm lặp. Sai khác ý nghĩa giữa các mức được đánh giá bằng phân tích ANOVA và Fisher Test. Xử lý số liệu tối ưu hóa bằng phần mềm Minitab 18.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Xác định đặc tính của dầu cá hồi

Dầu cá hồi thu được theo quy trình ở Mục 2.2.1 có các

chỉ tiêu hóa sinh như sau: chỉ số acid: 9,78 mg KOH/g dầu; chỉ số xà phòng: 211,35 mg KOH/g dầu, chỉ số ester hóa: 201,57 mg KOH/g dầu và chỉ số iodine: 117,2 g I₂/100 g dầu. Các chỉ số này đều nằm trong giới hạn cho phép của TCVN đối với dầu mỡ động, thực vật dùng trong thực phẩm.

3.2. Xác định đặc tính của lipase từ mù đu đủ (CPL)

Từ 25g mù khô thu được 4,58 g enzyme lipase thô, hiệu suất thu hồi đạt 18,32% so với mù khô ban đầu. CPL thu được sau quá trình hòa tan và sấy thăng hoa có màu trắng, mịn, xốp nên dễ dàng tiếp xúc với cơ chất khi tham gia phản ứng xúc tác.

Kết quả cho thấy hoạt độ CPL trên cơ chất dầu cá hồi xác định theo Mục 2.2.4 là 255,57U/g.

3.3. Xác định tính đặc hiệu cơ chất của CPL

Tính đặc hiệu cơ chất của lipase liên quan đến việc lipase ưu tiên chuyển hóa lipid chứa acid béo mạch ngắn, mạch trung bình hoặc mạch dài và độ bất bão hòa của acid béo. Lipase chuyển hóa các nhóm acyl có kích thước khác nhau chịu ảnh hưởng trực tiếp bởi hình dạng trung tâm hoạt động của lipase và bản chất của các acid amin tham gia tạo nên nó [1].

Theo Slim Abdelkafi và cộng sự [13], CPL có khả năng thủy phân triacylglycerol chứa acid béo mạch dài như dầu oliu, dầu trioctanoin. Tuy nhiên, tính đặc hiệu cơ chất của CPL đối với độ bất bão hòa của acid béo vẫn chưa được công bố.

Tiến hành thủy phân dầu cá hồi với CPL ở điều kiện khảo sát, kết quả xác định thành phần các acid béo của dầu cá hồi trước khi thủy phân và phần acylglycerol còn lại không bị thủy phân bằng sắc ký khí (thực hiện tại trung tâm Quatest 2) được thể hiện trên Bảng 1.

Bảng 1. Phần trăm acid béo có trong dầu cá hồi trước và sau khi thủy phân

STT	Acid béo methyl ester		% trong mẫu ban đầu	% trong phần đoạn dầu không thủy phân
	Kí hiệu	Tên thông thường ester		
1	C14:0	Myristic acid	3,23	2,64
2	C16:0	Palmitic acid	12,17	10,59
3	C16:1	Palmitoleic acid	3,22	2,96
4	C18:0	Stearic acid	2,99	2,9
5	C18:1	Oleic acid	40,89	40,93
6	C18:2	Linoleic acid	16,78	15,96
7	C20:0	Arachidic acid	0,36	0
8	C18:3	Linolenic acid	6,08	5,83
9	C20:1	cis-11-Eicosenoic acid	0,99	2,59
10	C20:2	cis-11,14-Eicosadienoic acid	2,52	0,95
11	C20:5	cis-5,8,11,14,17-Eicosanpentaenoic acid (EPA)	5,1	4,97
12	C22:6	Cis-4,7,10,13,16,19-Docosanpentaenoic acid (DHA)	5,66	7,73
13	C20:3	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid	0	0,25
14	C20:3	cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid	0	0,83
15	C22:1	Erucic acid	0	0,32
16	C20:4	Arachidonic acid	0	0,56

Kết quả cho thấy, dầu cá hồi ban đầu có hàm lượng acid béo không no cao như acid oleic (40,89%), acid linoleic (16,78%), DHA (5,66%) và EPA (5,1%).

Sau khi thủy phân 24 giờ, có sự giảm nhẹ về tỷ lệ các acid béo no như myristic, palmitic và stearic trong phần acylglycerol còn lại không thủy phân. Bên cạnh đó, sự tăng nhẹ về phần trăm của các acid béo như eicosatrienoic, erucic và arachidonic.

Riêng với các acid béo quan trọng nhất trong nghiên cứu là DHA và EPA có sự thay đổi khác nhau. Trong khi thành phần EPA ít thay đổi, DHA có sự tăng nhẹ trong phần acylglycerol còn lại chứng tỏ DHA có mạch carbon dài nhiều nối đôi nên khó bị thủy phân hơn EPA. Tổng phần trăm của 2 acid béo này trong dầu ban đầu là 10,76% và sau khi thủy phân là 12,70%.

Có thể kết luận rằng enzyme lipase từ mù đu đủ không có tính đặc hiệu rõ rệt với các acid béo.

3.4. Tối ưu hóa quá trình thủy phân dầu cá hồi với CPL

Để tối ưu hóa quá trình thủy phân, phương pháp quy hoạch thực nghiệm bậc hai tâm xoay (Box-Hunter) cho 2 yếu tố được sử dụng. Mỗi yếu tố tiến hành tại 5 mức. Số lần thí nghiệm được xác định là: $N = 2^2 + 2 \cdot 2 + 2 = 10$.

Phương trình hồi quy có dạng:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_{12} + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2$$

Trong đó, b là hệ số phương trình hồi quy, X là các biến số hay yếu tố ảnh hưởng.

3.4.1. Xác định nhiệt độ và pH tối ưu cho hiệu suất của quá trình thủy phân dầu cá hồi bằng CPL

Hiệu suất của quá trình thủy phân dầu cá hồi với CPL thể hiện trên Bảng 2.

Bảng 2. Hiệu suất phản ứng thủy phân của các nghiệm thức

Nghiệm thức	Biến thực		Biến mã hoá		Hiệu suất (%)
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	
1	40	9	+1	+1	25,8
2	30	9	-1	+1	35,0
3	40	7	+1	-1	32,9
4	30	7	-1	-1	38,9
5	42	8	+α	0	32,2
6	28	8	-α	0	37,7
7	35	9,4	0	+α	24,8
8	35	6,6	0	-α	36,7
T ₁	35	8	0	0	36,9
T ₂	35	8	0	0	37,8

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, nhiệt độ tăng thì hiệu suất thủy phân dầu cá bởi CPL tăng, nhưng nhiệt độ tăng ở 40°C thì hiệu suất thủy phân thấp nhất (25,8%) sau 24h. Điều này có thể thấy, nhiệt độ cao trong thời gian dài có thể làm biến tính CPL nên làm giảm hiệu suất thủy phân.

Xử lý các số liệu đo được của hàm Y ở bảng trên bằng phần mềm Minitab 18.0 để kiểm tra tính có nghĩa của các hệ số trong phương trình hồi quy theo chuẩn Student, mức độ tin cậy của từng hệ số trong phương trình hồi qui được đánh giá qua giá trị p với mức độ tin cậy 95%, thu được các kết quả ở Bảng 3.

Bảng 3. Giá trị các hệ số b trong phương trình hồi quy và xác suất p

Hệ số	Giá trị	Xác suất p
b ₀	-221,0	0,000*
b ₁	3,86	0,009*
b ₂	53,7	0,005*
b ₁₂	-0,16	0,403
b ₁₁	0,045	0,233
b ₂₂	-3,225	0,016*

(*) các hệ số có ý nghĩa ($p < 0,05$)

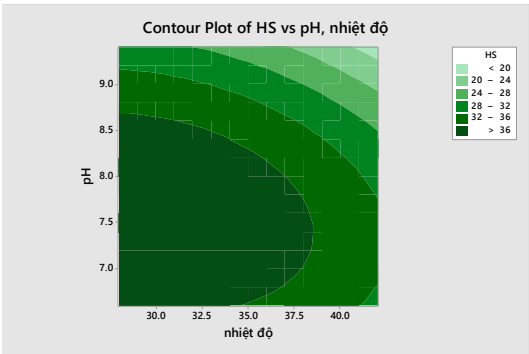
Bảng 3 cho thấy, chỉ có các hệ số b₀, b₁, b₂, b₂₂ là có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$). Các hệ số còn lại b₁₁, b₁₂ không tác động đến giá trị của hàm mục tiêu ($p > 0,05$). Loại bỏ các hệ số không có nghĩa thu được phương trình hồi quy thể hiện ảnh hưởng của các yếu tố nhiệt độ và pH đến hiệu suất thủy phân như sau:

$$Y = -221,0 + 3,86X_1 + 53,7X_2 - 3,225X_2^2$$

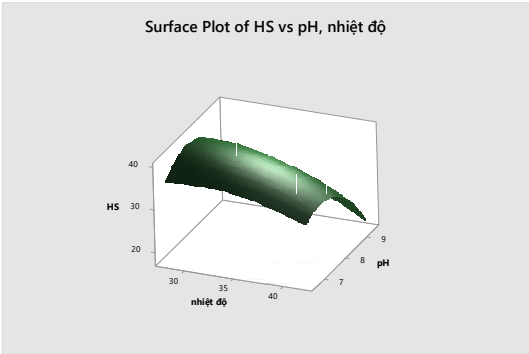
Mức độ phù hợp của phương trình hồi quy được đánh giá bằng phép kiểm định “Test of Lack of Fit”. Kết quả thu được là $p = 0,235$ lớn hơn nhiều so với mức ý nghĩa (0,05) cho thấy phương trình hồi quy tương thích với thực tế, khẳng định sự đúng đắn của mô hình với ý nghĩa thống kê cao.

Hệ số tương quan của mô hình hồi quy $R^2 = 94,67\%$ cao cũng cho thấy tính chặt chẽ của mô hình tương quan này. Do đó, phương trình hồi quy này được sử dụng để tìm điểm tối ưu.

Biểu đồ đường mức và biểu đồ bề mặt của phương trình hồi quy được thể hiện ở Hình 1 và Hình 2.



Hình 1. Biểu đồ đường mức biểu thị ảnh hưởng của nhiệt độ, pH đến hiệu suất thủy phân



Hình 2. Biểu đồ bề mặt biểu thị ảnh hưởng của nhiệt độ, pH đến hiệu suất thủy phân

Thực hiện tối ưu hóa điều kiện thủy phân dầu cá bởi CPL bằng công cụ tối ưu hoá của phần mềm Minitab 18.0 cho kết quả nhiệt độ tối ưu là 29°C và pH tối ưu là 7,6. Ở

điều kiện tối ưu này CPL thủy phân dầu cá hồi có hiệu suất thủy phân cao nhất (39,7%), cao hơn lipase từ *R. javanicus*, *P. solitum* nhưng thấp hơn so với lipase từ *Aspergillus niger* với hiệu suất thủy phân dầu cá hồi đạt 60% [15].

pH tối ưu khi thủy phân dầu cá hồi của CPL được xác định là 7,6, giá trị này cao hơn so kết quả của Emmanuelle Cambon và cộng sự (năm 2006) khi nghiên cứu lipase từ Babaco (một loại quả thuộc họ đu đủ), với pH tối ưu bằng 7 [16].

3.4.2. Xác định tỷ lệ nước/cơ chất và nồng độ enzyme tối ưu cho hiệu suất của quá trình thủy phân dầu cá hồi bằng CPL

Lượng nước sử dụng có vai trò rất quan trọng trong phản ứng thủy phân dầu. Lipase là enzyme có khả năng thủy phân tốt dầu trên bề mặt liên pha dầu – nước. Do đó, ở nhiệt độ tối ưu là 29°C và pH tối ưu là 7,6 vừa tìm được, tiến hành các thí nghiệm theo quy hoạch tâm xoay 2 yếu tố với các biến là tỷ lệ nước/cơ chất và nồng độ enzyme. Kết quả xác định hiệu suất thủy phân được thể hiện trên Bảng 4.

Bảng 4. Hiệu suất thủy phân của các nghiệm thức

Nghiệm thức	Biến thực		Biến mã hoá		Hiệu suất (%)
	X ₃	X ₄	X ₃	X ₄	
1	5	1,5	+1	+1	46,4
2	3	1,5	-1	+1	39,0
3	5	0,5	+1	-1	44,0
4	3	0,5	-1	-1	24,8
5	5,4	1	+α	0	40,0
6	2,6	1	-α	0	24,0
7	4	1,7	0	+α	48,0
8	4	0,3	0	-α	24,5
T ₁	4	1	0	0	46,7
T ₂	4	1	0	0	45,7

Xử lý kết quả ở bảng trên bằng phần mềm Minitab 18.0 thu được kết quả ở Bảng 5.

Bảng 5. Giá trị các hệ số b trong phương trình hồi quy và xác suất p

Hệ số	Giá trị	Xác suất p
b ₀	-125,9	0,000*
b ₁	60,0	0,016*
b ₂	67,0	0,016*
b ₁₂	-5,9	0,248
b ₁₁	-5,99	0,043*
b ₂₂	-15,47	0,131

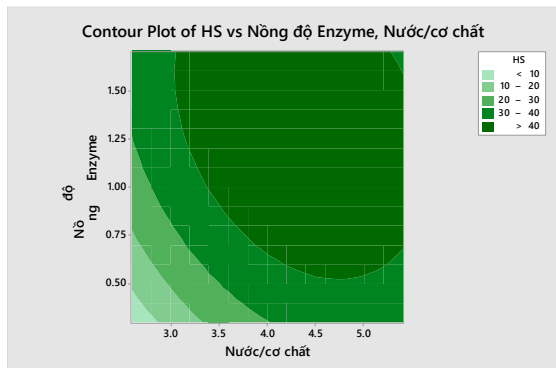
(*) các hệ số có ý nghĩa ($p < 0,05$)

Bảng 5 cho thấy, chỉ có các hệ số b₀, b₁, b₂, b₁₁ là có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$). Các hệ số còn lại b₁₂, b₂₂ không tác động đến giá trị của hàm mục tiêu ($p > 0,05$). Loại bỏ các hệ số không có nghĩa thu được phương trình hồi quy thể hiện ảnh hưởng của các yếu tố đến mục tiêu như sau:

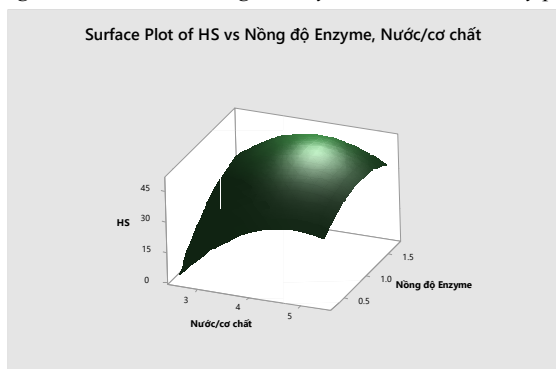
$$Y = -125,9 + 60,0X_3 + 67,0X_4 - 5,99X_3^2$$

Đánh giá tính phù hợp của phương trình hồi quy bằng phép kiểm định “Test of Lack of Fit” cho kết quả $p = 0,103$ lớn hơn nhiều so với mức ý nghĩa (0,05), cho thấy phương trình hồi quy tương thích với thực tế, khẳng định sự đúng đắn của mô hình với ý nghĩa thống kê cao.

Hệ số tương quan của mô hình hồi quy $R^2 = 91,51\%$ cao cũng cho thấy tính chặt chẽ của mô hình tương quan này. Do đó, phương trình hồi quy này được sử dụng để tìm điểm tối ưu.



Hình 3. Biểu đồ đường mức biểu thị ảnh hưởng của lượng nước/ cơ chất và nồng độ enzyme đến hiệu suất thủy phân



Hình 4. Biểu đồ bề mặt biểu thị ảnh hưởng của tỷ lệ nước/ cơ chất và nồng độ enzyme đến hiệu suất thủy phân

Kết quả tối ưu hóa bằng phần mềm 18.0 cho biết, ở điều kiện thủy phân với tỷ lệ nước/cơ chất 4,36 và nồng độ enzyme 1,34% hiệu suất thủy phân đạt cao nhất 49,4%. Tỷ lệ nước và cơ chất tương ứng là 4,36 giúp enzyme lipase phân tán tốt vào bề mặt phân pha dầu nước dẫn đến tương tác giữa enzyme và cơ chất diễn ra tốt hơn, nên enzyme hoạt động tốt, do đó hiệu suất thủy phân cao.

3.4.3. Thí nghiệm kiểm chứng

Tiến hành thủy phân dầu cá hồi bằng CPL với các điều kiện tối ưu: nhiệt độ 29°C, pH đệm 7,6, tỷ lệ nước/cơ chất 4,36% và nồng độ enzyme 1,34%. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho kết quả hiệu suất thủy phân là 48,2% ± 0,3%. Kết quả này gần với giá trị lý thuyết, nên các điều kiện tối ưu xác định được là có thể tin cậy.

4. Kết luận

Qua quá trình nghiên cứu có thể kết luận, dầu cá hồi thu được từ lườn cá hồi chứa nhiều acid béo đa bất bão hòa, đặc biệt là DHA, EPA, với hàm lượng DHA đạt 5,66% và EPA đạt 5,1%. Lipase thô thu nhận từ mù đu đu (CPL) có hiệu suất thu nhận đạt 18,32% so với mù khô ban đầu. Phân tích sắc ký khí thành phần acid béo của dầu cá trước và sau thủy phân cho thấy, CPL không có tính đặc hiệu rõ rệt đối với các loại acid béo. Bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm tâm xoay (Box-Hunter) 2 yếu tố đã xác định được điều kiện tối ưu của quá trình thủy phân dầu cá với CPL để đạt hiệu suất thủy phân cao nhất sau 24 giờ là nhiệt độ 29°C và pH=7,6, tỉ lệ nước/cơ chất là 4,36:1 và nồng độ enzyme CPL 1,34%. Kết quả này là tiền đề cho nghiên cứu làm giàu

DHA, EPA từ dầu cá với quá trình thủy phân bằng CPL là bước đầu tiên. Nghiên cứu tiếp theo được đề xuất là lựa chọn lipase có tính đặc hiệu với DHA và EPA để este hoá chọn lọc DHA và EPA, qua đó có thể thu chế phẩm giàu DHA và EPA sau khi phân đoạn.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng trong đề tài mã số B2017-ĐN02-30.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] G. Sandoval et al, Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Springer Science and Business Media New York, 2012.
- [2] Bùi Xuân Đông và cs, “Đặc tính enzyme lipase cố định trên chất mang chitosan-Fe₃O₄ bằng liên kết đồng hóa trị”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2018, Số: 16(2):2018; Tr. 377-383.
- [3] Neena N. Gandhi and Kumar D. Mukherjee, “Reactivity of medium-chain substrates in the interesterification of tripalmitin catalyzed by papaya lipase”, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2001, Vol. 78, No. 9, pp. 965-968.
- [4] P. Pinyaphong and S. Phutrakul, “Synthesis of cocoa butter equivalent from palm oil by Carica papaya lipase-catalyzed interesterification,” *Chiang Mai J. Sci.*, 2009, Vol. 36, No. 3, pp. 359-368.
- [5] Lại Thị Mai Hương, “Kết tinh phân đoạn acid béo không no nhiều nối đôi từ dầu cá trích và cá basa”, *Tạp chí Hóa học*, 2007, T. 45 (5), Tr. 559 - 564.
- [6] S. P. Chaurasia, K. Bhandari, A. Sharma, and A. K. Dalai, “A Review on Lipase Catalysed Synthesis of DHA Rich Glyceride from Fish Oils”, *Int. J. Res. Sci. Innov.*, 2016, Vol. 3, No. 1A, pp. 9-19.
- [7] TCVN 6127: 2010 (ISO 660:2009), Dầu mỡ động vật và thực vật - Xác định chỉ số axit và độ axit, Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị. Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành, 2010.
- [8] TCVN 6126:2015 (ISO 3657:2013), Dầu mỡ động vật và thực vật - xác định chỉ số xà phòng hóa, Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F2 Dầu mỡ động vật và thực vật biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố, 2015.
- [9] TCVN 6122:2010 (ISO 3961:2009), Dầu mỡ động vật và thực vật - xác định trị số iot, Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F2 Dầu mỡ động vật và thực vật biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố, 2010.
- [10] Carla Tecelao, et al, “Carica papaya latex: A low-cost biocatalyst for human milk fat substitutes production”, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2012, Vol. 114, No. 3, pp. 266-276.
- [11] Rivera I, Mateos-Diaz JC, Sandoval G, “Plant lipases: partial purification of Carica papaya lipase”, *Methods Mol Bio*, 2012, Vol. 861, pp. 115-122.
- [12] Đặng Thị Thu, *Nghiên cứu công nghệ sản xuất một số loại dầu béo bằng lipase*, Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật, Bộ Khoa học và Công nghệ Viện Công nghệ thực phẩm Hà Nội, 2004.
- [13] Abdelkafi S., et al, “Carica papaya lipase: A naturally immobilized enzyme with interesting biochemical properties”, *Plant foods human nutrition*, 2011, Vol. 66, No. 1, pp. 34-40.
- [14] Sugihara et al, “Purification of docosahexaenoic acid from tuna oil by a two-step enzymatic method: Hydrolysis and selective esterification”, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1997, Vol. 74, No. 11, pp. 1441-1446.
- [15] Patricia de O. Carvalho et al, “Enzymatic Hydrolysis of Salmon Oil by Native Lipases: Optimization of process Parameters”, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2009, Vol. 20, No. 1, pp. 117-124.
- [16] E. Cambon et al., “Comparison of the lipase activity in hydrolysis and acyl transfer reactions of two latex plant extracts from babaco (Vasconcellea x Heilbornii Cv.) and Plumeria rubra: Effect of the aqueous microenvironment”, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, Vol. 54, No. 7, pp. 2726-2731.