

TỐI ƯU HÓA CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN PHẢN ỨNG THỦY PHÂN KHUYỂN CHÂN GÀ VỚI XÚC TÁC FLAVOURZYME NHẪM THU DỊCH AXIT AMIN

OPTIMIZATION OF HYDROLYSIS REACTION OF CHICKEN CARTILAGE BY FLAVOURZYME AS A CATALYST TO PRODUCE AMINO ACID SOLUTION

Nguyễn Thị Minh Nguyệt¹, Nguyễn Văn Quang², Bùi Viết Cường^{1*}

¹Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng, Việt Nam

²Trung tâm Chất lượng Nông lâm Thủy sản vùng 2 (NAFIQUAD – BRANCH 2), Việt Nam

*Tác giả liên hệ / Corresponding author: bvcuong@dut.udn.vn

(Nhận bài / Received: 28/4/2023; Sửa bài / Revised: 16/6/2023; Chấp nhận đăng / Accepted: 03/7/2023)

Tóm tắt - Xử lý thích hợp phụ phẩm giết mổ và chế biến gà sẽ góp phần nâng cao giá trị kinh tế và giảm lượng chất thải rắn ra môi trường. Dựa trên kết quả nghiên cứu đã tiến hành, phương pháp bề mặt đáp ứng được sử dụng trong nghiên cứu này để tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân khuỷu chân gà với xúc tác Flavourzyme, gồm nhiệt độ thủy phân (X_1 , °C), pH (X_2), nồng độ enzyme (X_3 , %), thời gian thủy phân (X_4 , phút), và thể tích phản ứng (X_5 , mL). Điều kiện thủy phân tối ưu: $X_1 = 73,78^\circ\text{C}$; $X_2 = 7,37$; $X_3 = 0,95\%$; $X_4 = 12,43$ (phút); và $X_5 = 113,78$ (mL) với hiệu suất thu nhận nitơ axit amin đạt giá trị cực đại $H_{\max} = 88,3786\%$ và kỉ rộng $d = 0,883786$. Hiệu suất thủy phân được xác định bằng thực nghiệm ở điều kiện tối ưu $H_{\max} = 80,46 \pm 0,533\%$. Nghiên cứu này đã từng bước nâng cao khả năng ứng dụng của các nghiên cứu đã được tiến hành.

Từ khóa - Flavourzyme; hiệu suất thu nhận nitơ axit amin; khuỷu chân gà; phản ứng thủy phân; tối ưu hóa

1. Giới thiệu

Sử dụng và tiêu thụ các sản phẩm từ gia cầm đang tăng dần ở qui mô toàn cầu [1]. Theo dự báo của Trung tâm Dữ liệu Thực phẩm (USDA), sản lượng thịt gà toàn cầu năm 2023 sẽ tăng trưởng hơn 2% và đạt mức cao nhất trong các thập niên qua với 102,7 triệu tấn [2]. Lượng phụ phẩm hữu cơ của công nghiệp giết mổ và chế biến gà: Nội tạng, đầu, chân, ... chiếm 37% tổng khối lượng của gà bị giết mổ [3-5]. Các phụ phẩm này được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi, phân bón, hoặc thải ra môi trường [1]. Buôn bán và chế biến phụ phẩm giết mổ gà thành thức ăn chăn nuôi và phân bón đã bị hạn chế sau khi sự bùng nổ của dịch bệnh não bò ở Anh, Mỹ, và Liên minh Châu Âu [1]. Các phương pháp xử lý chất thải rắn được đề nghị cho phụ phẩm của công nghiệp giết mổ và chế biến gà là chôn lấp hoặc đốt được áp dụng nhiều nơi trên thế giới [6]. Tuy nhiên, xử lý không đúng cách các phụ phẩm hữu cơ này sẽ gây ô nhiễm môi trường, lây truyền bệnh tật, và lãng phí các chất có giá trị sinh học cao [1]. Thành phần protein có trong khuỷu chân gà khá cao (12%) [3, 4, 7]. Khuỷu chân gà có nhiều chất có giá trị sinh học cao đối với sức khỏe xương khớp của con người: Proteoglycans, glycosaminoglycans, và chondroitin sulfate, ... [3, 4]. Ngoài ra, thành phần chính của khuỷu chân gà là collagen có thể khai thác để sản xuất các sản phẩm có giá trị kinh tế cao [3, 7, 8]. Các hoạt chất này có

Abstract - Alternative treatment for by-products of chicken slaughter and processing will increase economic value and reduce solid waste released to the environment. Based on the previous reports, the response surface method is used in this study to optimize the factors affecting the hydrolysis reaction of chicken cartilage with Flavorzyme as a catalyst, including hydrolysis temperature (X_1 , °C), pH (X_2), enzyme concentration (X_3 , %), hydrolysis time (X_4 , min), and reaction volume (X_5 , mL). The optimum hydrolysis conditions were $X_1 = 73.78^\circ\text{C}$, $X_2 = 7.37$, $X_3 = 0.95\%$, $X_4 = 12.43$ (min), and $X_5 = 113.78$ (mL) which gave the maximum value of obtained amino acid yield $H_{\max} = 88.3786\%$ and $d = 0.883786$. The yield of obtained amino acid was experimentally determined at the optimal conditions $H_{\max} = 80.46 \pm 0.533\%$. This work has gradually enhanced the applicability of previous research.

Key words - Flavourzyme; yield of obtained amino acid; chicken cartilage; hydrolysis reaction; optimization

thể thu nhận và chế biến thành các sản phẩm có giá trị cao đối với vi sinh vật học, y học, dược phẩm, và dinh dưỡng cho con người hoặc mỹ phẩm [9]. Do đó, xử lý và chế biến phụ phẩm hữu cơ của công nghiệp giết mổ và chế biến gà sẽ nâng cao hiệu quả kinh tế và giảm lượng chất thải rắn hữu cơ ra môi trường [10, 11].

Thu nhận dịch axit amin (hoặc peptide) bằng phương pháp thủy phân khuỷu chân gà với xúc tác enzyme [3, 4, 12], axit hữu cơ [13-16] hoặc hơi nước quá bão hòa [5] là một biện pháp hữu hiệu và đã thu hút sự quan tâm nghiên cứu của cộng đồng khoa học. Tại Việt Nam, thủy phân khuỷu chân gà với xúc tác papain [17], Flavourzyme [3], và Protamex [4] nhằm thu dịch axit amin đã được tiến hành bởi nhóm nghiên cứu của Bùi Viết Cường và cộng sự. Tuy nhiên, các nghiên cứu này chỉ dừng ở mức độ khảo sát đơn biến các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân với các xúc tác nêu trên. Do đó, để xác định được điều kiện tối ưu cho các yếu tố ảnh hưởng, giá trị cực đại của hiệu suất thu nhận nitơ axit amin, các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân cần được tối ưu hóa nhằm thu được lượng nitơ axit amin tối đa và tiến tới qui mô sản xuất pilot. Trong nghiên cứu này, phản ứng thủy phân khuỷu chân gà với xúc tác Flavourzyme được tối ưu hóa, các yếu tố ảnh hưởng được lựa chọn để tối ưu dựa trên kết quả nghiên cứu của Bùi Viết Cường và cộng sự [3].

¹ The University of Danang - University of Science and Technology, Vietnam (Minh Nguyen Thi Nguyen, Cuong Viet Bui)

² National Agro-Forestry-Fisheries Quality Assurance Department Branch 2 (NAFIQUAD 2), Vietnam (Quang Van Nguyen)

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Khuỷu chân gà

Khuỷu chân gà được nhập khẩu từ Châu Âu bởi công ty TNHH Thương mại và Dịch vụ Hoàng Phát - Đà Nẵng, được đóng gói trong túi nhựa (1 kg/1 túi), bảo quản lạnh đông -20°C tại kho lạnh của công ty. Sau khi nhập khẩu về công ty khoảng thời gian 3 tháng, khuỷu chân gà được vận chuyển trong thùng xốp giữ nhiệt và bảo quản tại phòng thí nghiệm ở -20°C . Quá trình chuẩn bị khuỷu chân gà cho thí nghiệm được tiến hành dựa trên phương pháp được đề xuất bởi nhóm nghiên cứu của Bùi Viết Cường và cộng sự [3, 4, 17]. Sụn khớp chân gà được rửa bằng không khí ở nhiệt độ phòng, rửa sạch, và xay nhỏ bằng máy xay (ATS TS-102AL, Đà Loan), phân loại bằng sàng với kích thước lỗ lưới sàng 6 mm. Nguyên liệu qua lưới sàng được chia nhỏ thành từng khối đựng trong các túi nilon kín có khối lượng 100 g/túi, được bảo quản ở -20°C . Thành phần hóa học ban đầu (độ ẩm, protein thô, và tro) của khuỷu chân gà sử dụng trong nghiên cứu này đã được công bố trong nghiên cứu của Bùi Viết Cường và cộng sự [3].

2.2. Enzyme và hóa chất

Flavourzyme được cung cấp bởi Merk, sinh tổng hợp bởi *Aspergillus oryzae*. Flavourzyme có hoạt độ 2285,7 UI/g, nhiệt độ tối thích $t_{\text{opt}} = 50 - 60^{\circ}\text{C}$, pH tối thích $\text{pH}_{\text{opt}} = 5 - 7$, nhiệt độ bảo quản $= 0 - 5^{\circ}\text{C}$ [3, 18, 19]. Các hóa chất dùng cho nghiên cứu có độ tinh khiết cao theo tiêu chuẩn hóa sinh và thực phẩm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phản ứng thủy phân khuỷu chân gà

Phản ứng thủy phân khuỷu chân gà được tiến hành dựa trên báo cáo của Bùi Viết Cường và cộng sự [3, 4, 17]. Các yếu tố đơn biến ảnh hưởng chính đến phản ứng thủy phân khuỷu chân gà với xúc tác enzyme Protamex được khảo sát và phân tích phương sai ANOVA One-Way cho sự khác biệt có ý nghĩa gồm: Nhiệt độ thủy phân tại 50°C có hiệu suất thu nhận nitơ axit amin lớn nhất $H_{\text{max}} = 3,51 \pm 0,61\%$; pH tại 5 có hiệu suất thu nhận nitơ axit amin lớn nhất $H_{\text{max}} = 18,17 \pm 1,67\%$; nồng độ enzyme tại 0,72% có hiệu suất thu nhận nitơ axit amin lớn nhất $H_{\text{max}} = 22,97 \pm 1,04\%$; thời gian thủy phân tại 20 phút có hiệu suất thu nhận nitơ axit amin lớn nhất $H_{\text{max}} = 22,97 \pm 1,04\%$; và thể tích phản ứng 90 mL có hiệu suất thu nhận nitơ axit amin lớn nhất $H_{\text{max}} = 40,90\%$. Khuỷu chân gà (1 g) được trộn đều với dung dịch enzyme Flavourzyme ở nồng độ xác định, phản ứng thủy phân được thực hiện trong bình phản ứng Erlenmeyer kín. Nhiệt độ của phản ứng thủy phân được kiểm soát bằng tủ sấy Ketong (Trung Quốc). Sau khi kết thúc phản ứng thủy phân, enzyme Flavourzyme bị vô hoạt bằng cách đun cách thủy ở nhiệt độ 90°C trong 10 phút. Chất rắn còn sót lại sau phản ứng được tách bởi lọc hút chân không Buchner với giấy lọc Whatman (No.1). Dịch lỏng qua giấy lọc được bảo quản ở 4°C dùng cho các phân tích tiếp theo.

2.3.2. Xây dựng phương trình hồi qui và ma trận thực nghiệm

Phản ứng thủy phân khuỷu chân gà với xúc tác Flavourzyme chịu ảnh hưởng chính của các yếu tố: Nhiệt độ thủy phân ($^{\circ}\text{C}$), pH, nồng độ enzyme (%), thời gian thủy phân (phút), và thể tích phản ứng (mL) [3]. Do đó, các yếu tố trên được lựa chọn để tối ưu hóa. Mỗi quan hệ giữa hiệu

suất thu nhận nitơ axit amin và các yếu tố ảnh hưởng là phi tuyến nên phương trình hồi qui cấp hai được lựa chọn để mô tả ảnh hưởng của các yếu tố đơn biến đến hiệu suất thu nhận nitơ axit amin. Mức, khoảng biến thiên của các yếu tố ảnh hưởng được trình bày ở Bảng 1.

Phương trình hồi qui cấp 2 có dạng [20, 21]:

$$H = b_0 + b_1 \times X_1 + b_2 \times X_2 + b_3 \times X_3 + b_4 \times X_4 + b_5 \times X_5 + b_{11} \times X_1^2 + b_{22} \times X_2^2 + b_{33} \times X_3^2 + b_{44} \times X_4^2 + b_{55} \times X_5^2 + b_{12} \times X_1 \times X_2 + b_{13} \times X_1 \times X_3 + b_{14} \times X_1 \times X_4 + b_{15} \times X_1 \times X_5 + b_{23} \times X_2 \times X_3 + b_{24} \times X_2 \times X_4 + b_{25} \times X_2 \times X_5 + b_{34} \times X_3 \times X_4 + b_{35} \times X_3 \times X_5 + b_{45} \times X_4 \times X_5$$

Trong đó, H: Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin (%); X_1 : Nhiệt độ thủy phân ($^{\circ}\text{C}$); X_2 : pH, X_3 : Nồng độ enzyme (%); X_4 : Thời gian thủy phân (phút); X_5 : Thể tích phản ứng (mL); b_i ($i=1, 2, 3, 4, 5$): Hệ số trong phương trình hồi qui tương ứng với ảnh hưởng bậc 1 của các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất thu nhận nitơ axit amin; b_{ij} ($i=1, 2, 3, 4, 5$; $j=1, 2, 3, 4, 5$): Hệ số trong phương trình hồi qui tương ứng với ảnh hưởng của sự tương tác của các cặp yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất thu nhận nitơ axit amin, và b_{ij} ($j=1, 2, 3, 4, 5$): Hệ số trong phương trình hồi qui tương ứng với ảnh hưởng của tương tác bậc 2 của các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất thu nhận nitơ axit amin.

Bảng 1. Mức, khoảng biến thiên của các yếu tố ảnh hưởng

Các yếu tố ảnh hưởng	Khoảng biến thiên		
	Mức dưới	Mức cơ sở	Mức trên
Nhiệt độ thủy phân ($^{\circ}\text{C}$, X_1)	40	50	60
pH (X_2)	4	5	6
Nồng độ enzyme (%), X_3)	0,62	0,72	0,82
Thời gian thủy phân (phút), X_4)	15	20	25
Thể tích phản ứng (mL, X_5)	80	90	100

Phần mềm Minitab (Version 18, Minitab Inc., Pennsylvania State, USA) được sử dụng để xây dựng ma trận thí nghiệm với phương pháp bề mặt đáp ứng theo phương án cấu trúc có tâm với cánh tay đòn $\alpha = 2,378$ và phương trình hồi qui cấp hai. Ma trận thí nghiệm được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Ma trận thí nghiệm

STT	X_1 ($^{\circ}\text{C}$)	X_2	X_3 (%)	X_4 (phút)	X_5 (mL)
1	40	4	0,62	15	80
2	60	4	0,62	15	80
3	40	6	0,62	15	80
4	60	6	0,62	15	80
5	40	4	0,82	15	80
6	60	4	0,82	15	80
7	40	6	0,82	15	80
8	60	6	0,82	15	80
9	40	4	0,62	25	80
10	60	4	0,62	25	80
11	40	6	0,62	25	80
12	60	6	0,62	25	80
13	40	4	0,82	25	80
14	60	4	0,82	25	80
15	40	6	0,82	25	80
16	60	6	0,82	25	80

17	40	4	0,62	15	100
18	60	4	0,62	15	100
19	40	6	0,62	15	100
20	60	6	0,62	15	100
21	40	4	0,82	15	100
22	60	4	0,82	15	100
23	40	6	0,82	15	100
24	60	6	0,82	15	100
25	40	4	0,62	25	100
26	60	4	0,62	25	100
27	40	6	0,62	25	100
28	60	6	0,62	25	100
29	40	4	0,82	25	100
30	60	4	0,82	25	100
31	40	6	0,82	25	100
32	60	6	0,82	25	100
33	26,21586	5	0,72	20	90
34	73,78414	5	0,72	20	90
35	50	2,621585	0,72	20	90
36	50	7,378414	0,72	20	90
37	50	5	0,48216	20	90
38	50	5	0,95784	20	90
39	50	5	0,72	8,107929	90
40	50	5	0,72	31,89207	90
41	50	5	0,72	20	66,21586
42	50	5	0,72	20	113,7841
43	50	5	0,72	20	90
44	50	5	0,72	20	90
45	50	5	0,72	20	90
46	50	5	0,72	20	90
47	50	5	0,72	20	90
48	50	5	0,72	20	90
49	50	5	0,72	20	90
50	50	5	0,72	20	90
51	50	5	0,72	20	90
52	50	5	0,72	20	90

2.3.3. Phương pháp phân tích

- Xác định hiệu suất thu nhận nitơ axit amin

Phương pháp đồng đề xuất bởi Pope và Stevens [22] được sử dụng để xác định hàm lượng nitơ axit amin trong sản phẩm thô (M_{N-aa}). Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin được tính theo công thức,

$$H_{N-aa} = \frac{M_{N-aa}}{M_{pm}} \times 100\% \quad (1)$$

Trong đó, M_{N-aa} : Nitơ axit amin có trong sản phẩm thô thu được sau phản ứng thủy phân (g); M_{pm} : Nitơ protein có trong sụn khớp chân gà (g); H_{N-aa} : Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin (%). M_{pm} được tính theo công thức (2) [23] và hàm lượng protein của sụn khớp chân gà được gửi mẫu phân tích tại Trung tâm Chất lượng Nông lâm Thủy sản vùng 2 (Nafiquad – Branch 2, Đà Nẵng) và được phân tích dựa trên phương pháp chuẩn của cộng đồng phân tích (AOAC),

$$M_{pm} = \frac{Protein}{6,25} \quad (2)$$

- Phân tích, đánh giá phương trình hồi qui, và tối ưu hóa theo phương án cấu trúc có tâm

Sự tương thích của phương trình hồi qui đối với thực nghiệm, mức độ ảnh hưởng của từng yếu tố, và sự tương tác giữa các yếu tố đến hiệu suất thu nhận nitơ axit amin được đánh giá qua hệ số R^2 và P, sử dụng phần mềm Minitab (Version 18, Minitab Inc., Pennsylvania State, USA) [20, 24, 25].

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Các thí nghiệm được tiến hành theo ma trận thực nghiệm ở Bảng 2, mỗi thí nghiệm cho từng điều kiện phản ứng thủy phân được lặp lại 2 lần tương ứng với 2 hiệu suất thu nhận nitơ axit amin (H_1 và H_2). Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3. Quan sát Bảng 3 cho thấy, hiệu suất thu nhận nitơ axit amin đạt giá trị cao hơn 50% tương ứng với thí nghiệm 18 ($X_1 = 60^\circ\text{C}$; $X_2 = 4$; $X_3 = 0,62\%$; $X_4 = 15$ phút; và $X_5 = 100$ mL), thí nghiệm 20 ($X_1 = 60^\circ\text{C}$; $X_2 = 6$; $X_3 = 0,62\%$; $X_4 = 15$ phút; và $X_5 = 100$ mL), thí nghiệm 30 ($X_1 = 60^\circ\text{C}$; $X_2 = 4$; $X_3 = 0,82\%$; $X_4 = 25$ phút; và $X_5 = 100$ mL), thí nghiệm 32 ($X_1 = 60^\circ\text{C}$; $X_2 = 6$; $X_3 = 0,82\%$; $X_4 = 25$ phút; và $X_5 = 100$ mL), và thí nghiệm 38 ($X_1 = 50^\circ\text{C}$; $X_2 = 5$; $X_3 = 0,95784\%$; $X_4 = 20$ phút; và $X_5 = 90$ mL).

Bảng 3. Kết quả thí nghiệm

STT	H_1 (%)	H_2 (%)	STT	H_1 (%)	H_2 (%)
1	31,904	28,660	27	47,893	39,880
2	30,346	32,097	28	48,567	41,979
3	44,978	41,979	29	39,880	35,754
4	35,262	31,777	30	56,334	50,679
5	28,489	30,045	31	39,564	40,121
6	24,938	31,840	32	56,334	54,682
7	31,840	28,489	33	39,512	35,820
8	28,660	35,475	34	43,275	43,448
9	48,214	41,563	35	39,434	41,476
10	28,834	32,161	36	35,964	35,749
11	32,161	35,404	37	39,512	35,964
12	35,619	31,904	38	59,033	50,700
13	38,621	38,544	39	28,167	32,050
14	31,777	31,840	40	39,512	36,036
15	31,588	30,225	41	30,761	26,460
16	34,913	31,968	42	45,377	40,682
17	37,933	40,040	43	39,591	39,670
18	52,685	48,276	44	43,623	43,448
19	56,559	54,902	45	35,820	35,820
20	56,446	52,369	46	39,670	35,749
21	35,682	40,040	47	43,448	35,892
22	43,642	48,665	48	39,750	39,750
23	47,988	44,166	49	39,829	43,623
24	46,362	44,166	50	41,476	41,394
25	47,798	48,276	51	36,109	39,750
26	39,642	35,611	52	43,275	39,829

Có 67,82% kết quả thí nghiệm được mô tả bởi phương trình hồi qui cấp hai tương ứng với giá trị $R^2 = 0,6782$ (Hình 1). Kết quả này có thể chấp nhận được khi số lượng các yếu tố ảnh hưởng được dùng để tối ưu hóa khá lớn (5 yếu tố).

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
4.83364	67.82%	59.58%	43.80%

Hình 1. Giá trị R² được tính bởi phần mềm Minitab 18

Ý nghĩa của hệ số b trong phương trình hồi qui cho phép đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố, tương tác giữa các yếu tố (bậc 1 và bậc 2) đến hiệu suất thu nhận nitơ axit amin ở mức độ tin cậy 95% (Bảng 4, Hình 2). Đối với các yếu tố bậc 1, nhiệt độ thủy phân, pH, nồng độ enzyme, và thời gian thủy phân không có ảnh hưởng đến hiệu suất thu nhận nitơ axit amin tương ứng với giá trị P của các yếu tố > 0,05. Thể tích phản ứng có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thu nhận nitơ axit amin khi P = 0,000 < 0,05. Sự tương tác cặp giữa nhiệt độ thủy phân và pH, nhiệt độ thủy phân và thời gian thủy phân, pH và nồng độ enzyme, pH và thể tích phản ứng, nồng độ enzyme và thể tích phản ứng, thời gian thủy phân và thể tích phản ứng (P > 0,05, Bảng 4, Hình 2) không có ảnh hưởng đến hiệu suất thu nhận nitơ axit amin. Ảnh hưởng lớn nhất là cặp yếu tố nhiệt độ thủy phân và thể tích phản ứng (P = 0,001 < 0,05), tiếp theo là tương tác giữa nhiệt độ thủy phân và nồng độ enzyme (P = 0,004 < 0,05), pH và thời gian thủy phân (P = 0,006 < 0,05), và cuối cùng là nồng độ enzyme và thời gian thủy phân (P = 0,018 < 0,05). Đối với các yếu tố bậc 2, nồng độ enzyme có ảnh hưởng nhiều nhất đến hiệu suất thu nhận axit amin tương ứng với P = 0,008 < 0,05; tiếp theo là thời gian thủy phân (P = 0,034 < 0,05). Ba yếu tố còn lại là nhiệt độ thủy phân, pH, và thể tích phản ứng (P = > 0,05) không ảnh hưởng đến hiệu suất thu nhận nitơ axit amin.

Phương trình hồi qui được xây dựng bởi phần mềm Minitab 18:

$$\begin{aligned}
 H = & 154,743 - 3,325 \times \text{Nhiệt độ thủy phân} + 5,520 \times \text{pH} \\
 & - 330,674 \times \text{Nồng độ enzyme} + 3,286 \times \text{Thời gian thủy phân} + 0,261 \times \text{Thể tích phản ứng} + 0,002 \times \text{Nhiệt độ thủy phân} \times \text{Nhiệt độ thủy phân} \\
 & - 0,217 \times \text{pH} \times \text{pH} + 122,327 \times \text{Nồng độ enzyme} \times \text{Nồng độ enzyme} \\
 & - 0,038 \times \text{Thời gian thủy phân} \times \text{Thời gian thủy phân} - 0,006 \times \text{Thể tích phản ứng} \times \text{Thể tích phản ứng} \\
 & + 0,017 \times \text{Nhiệt độ thủy phân} \times \text{pH} + 1,810 \times \text{Nhiệt độ thủy phân} \times \text{Nồng độ enzyme} - 0,004 \times \text{Nhiệt độ thủy phân} \times \text{Thời gian thủy phân} \\
 & + 0,021 \times \text{Nhiệt độ thủy phân} \times \text{Thể tích phản ứng} - 6,854 \times \text{pH} \times \text{Nồng độ enzyme} \\
 & - 0,340 \times \text{pH} \times \text{Thời gian thủy phân} + 0,092 \times \text{pH} \times \text{Thể tích phản ứng} + 2,907 \times \text{Nồng độ enzyme} \times \text{Thời gian thủy phân} \\
 & + 0,450 \times \text{Nồng độ enzyme} \times \text{Thể tích phản ứng} - 0,020 \times \text{Thời gian thủy phân} \times \text{Thể tích phản ứng}.
 \end{aligned}$$

Nghiệm tối ưu của phương trình hồi qui: X₁ = 73,78 °C; X₂ = 7,37; X₃ = 0,95%; X₄ = 12,43 (phút); và X₅ = 113,78 (mL) với hiệu suất thu nhận axit amin đạt giá trị cực đại H_{max} = 88,3786% và kì vọng d = 0,883786. Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin thực nghiệm tại điều kiện tối ưu H_{max} = 80,46 ± 0,533%. Có sự khác nhau giữa hiệu suất cực đại được xác định bằng phương trình hồi qui và thực nghiệm là do sai số khách quan (dụng cụ thí nghiệm) trong quá trình tiến hành thí nghiệm.

Bảng 4. Hệ số trong phương trình hồi qui và giá trị P

Hệ số b	Giá trị P	Hệ số b	Giá trị P
b ₀	0,000	b ₁₂	0,780
b ₁	0,236	b ₁₃	0,004
b ₂	0,175	b ₁₄	0,758
b ₃	0,946	b ₁₅	0,001
b ₄	0,288	b ₂₃	0,260
b ₅	0,000	b ₂₄	0,006
b ₁₁	0,656	b ₂₅	0,133
b ₂₂	0,629	b ₃₄	0,018
b ₃₃	0,008	b ₃₅	0,458
b ₄₄	0,034	b ₄₅	0,094
b ₅₅	0,162		

Coded Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	39.95	1.07	37.19	0.000
Blocks				
1	0.651	0.474	1.37	0.173
Nhiệt độ thủy phân	0.621	0.519	1.20	0.236
pH	0.710	0.519	1.37	0.175
Nồng độ enzyme	0.035	0.519	0.07	0.946
Thời gian thủy phân	0.555	0.519	1.07	0.288
Thể tích phản ứng	5.418	0.519	10.43	0.000
Nhiệt độ thủy phân*Nhiệt độ thủy phân	0.200	0.447	0.45	0.656
pH*pH	-0.217	0.447	-0.49	0.629
Nồng độ enzyme*Nồng độ enzyme	1.223	0.447	2.74	0.008
Thời gian thủy phân*Thời gian thủy phân	-0.962	0.447	-2.15	0.034
Thể tích phản ứng*Thể tích phản ứng	-0.630	0.447	-1.41	0.162
Nhiệt độ thủy phân*pH	0.169	0.604	0.28	0.780
Nhiệt độ thủy phân*Nồng độ enzyme	1.810	0.604	2.99	0.004
Nhiệt độ thủy phân*Thời gian thủy phân	-0.187	0.604	-0.31	0.758
Nhiệt độ thủy phân*Thể tích phản ứng	2.082	0.604	3.45	0.001
pH*Nồng độ enzyme	-0.685	0.604	-1.13	0.260
pH*Thời gian thủy phân	-1.701	0.604	-2.82	0.006
pH*Thể tích phản ứng	0.917	0.604	1.52	0.133
Nồng độ enzyme*Thời gian thủy phân	1.454	0.604	2.41	0.018
Nồng độ enzyme*Thể tích phản ứng	0.450	0.604	0.75	0.458
Thời gian thủy phân*Thể tích phản ứng	-1.023	0.604	-1.69	0.094

Hình 2. Giá trị P được tính bởi phần mềm Minitab 18

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng với phương án cấu trúc có tâm để tối ưu hóa các yếu tố đơn biến ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân khuỷu chân gà với xúc tác enzyme Flavourzyme nhằm thu dịch axit amin: Nhiệt độ thủy phân (°C), pH, nồng độ enzyme (%), thời gian thủy phân (phút), và thể tích phản ứng (mL). Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin đạt giá trị cực đại H_{max} = 80,46 ± 0,533% khi nhiệt độ thủy phân 73,78°C; pH 7,37; nồng độ enzyme 0,95%; thời gian thủy phân 12,43 phút; và thể tích phản ứng 113,78 (mL). Nghiên cứu đã từng bước nâng cao khả năng ứng dụng của phản ứng thủy phân khuỷu chân gà với xúc tác enzyme Flavourzyme nhằm thu dịch axit amin đã được tiến hành ở các nghiên cứu trước khi miền tối ưu đã được xác định. Dựa trên kết quả nghiên cứu, qui mô pilot sẽ được tiến hành nhằm kiểm tra lại tính ứng dụng của phương trình hồi qui ở qui mô sản xuất lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A. Lasekan, F. A. Bakar, and D. Hashim, "Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources", *Waste management*, vol. 33, no. 3, pp. 552-565, 2013.

[2] T Son and T. Duc, "Global chicken meat production and trade in 2023", *nguoichamuoi*, 2023, [Online] Available:

- <https://nguoiichannuoi.vn/san-xuat-va-thuong-mai-thit-ga-toan-cau-nam-2023-nd10268.html>, [Accessed 20/04/2023].
- [3] C.V. Bui, M.N.T Nguyen, Q.V. Nguyen, D.X. Bui, and M.T. Pham, "Study on hydrolysis reaction of chicken cartilage using Flavourzyme", *UED Journal of Social Sciences, Humanities, Education*, vol. 9, no. 4, pp. 1-6, 2019.
- [4] C. V. Bui, C. T. K. Nguyen, and D. X. Bui, "Screening of factors influencing the hydrolysis reaction of chicken leg cartilage with Protamex enzyme as a catalyst", *The Journal of Agriculture Development*, vol. 19, no. 4, pp. 73-79, 2020.
- [5] GY Zhu *et al.*, "Hydrolysis technology and kinetics of poultry waste to produce amino acids in subcritical water", *Journal of Analytical Applied Pyrolysis*, vol. 88, no. 2, pp. 187-191, 2010.
- [6] E Salminen and J Rintala, "Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste: A review", *Bioresource Technology*, vol. 83, no. 1, pp. 13-26, 2002.
- [7] Í.B.D.S. Araújo *et al.*, "Optimal conditions for obtaining collagen from chicken feet and its characterization", *Food Science and Technology*, vol. 38, pp. 167-173, 2018.
- [8] J. M. Seyer, D. M. Brickley, and M. J. Glimcher, "The identification of two types of collagen in the articular cartilage of postnatal chickens", *Calcified Tissue Research*, vol. 17, no. 1, pp. 43-55, 1974.
- [9] C. Bueno-Solano *et al.*, "Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products", *Food Chemistry*, vol. 112, no. 3, pp. 671-675, 2009.
- [10] D.L. Meeker, *Essential Rendering - All about the Animal By-products Industry*, National Renderers Association (Virginia), 2006.
- [11] K. Jayathilakan, K. Sultana, K. Radhakrishna, and A. S. Bawa, "Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry, and fish processing industries: A review", *Journal of Food Science and Technology*, vol. 49, no. 3, pp. 278-293, 2012.
- [12] T.K.A. Bezerra *et al.*, "Identification of angiotensin I-converting enzyme-inhibitory and anticoagulant peptides from enzymatic hydrolysates of chicken combs and wattles", *Journal of Medicinal Food*, vol. 22, no. 12, pp. 1294-1300, 2019.
- [13] A.R.R.d.A. Cordeiro *et al.*, "Collagen production from chicken keel bone using acid and enzymatic treatment at a temperature of 30°C", *Food Science Technology*, vol. 40, no. 2, pp. 491-497, 2019.
- [14] S. R Schwartz *et al.*, "Novel hydrolyzed chicken sternal cartilage extract improves facial epidermis and connective tissue in healthy adult females: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial", *Alternative Therapies in Health Medicine*, vol. 25, no. 5, pp. 12-29, 2019.
- [15] W. Ponkham, K. Limroongreungrat, A. Sangnark, "Extraction of collagen from hen eggshell membrane by using organic acids", *Thai Journal of Agricultural Science*, vol. 44, no. 5, pp. 354-360, 2011.
- [16] R.B. Potti and M. O. Fahad, "Extraction and characterization of collagen from broiler chicken feet (*Gallus gallus domesticus*) - Biomolecules from poultry waste", *Journal of Pure and Applied Microbiology*, vol. 11, no. 1, pp. 315-322, 2017.
- [17] V.C. Bui, X.D. Bui, and M.N. Dang, "Study on hydrolysis reaction of chicken cartilage using enzyme papain", *Vietnam Trade and Industry Review*, vol. 41, pp. 29-32, 2020.
- [18] N. T.Q. Hoa, T. T. X. Huong, N. P. Minh, and D. T.A. Dao, "Investigation of enzymatic optimization by Flavourzyme and Celluclast for soy protein hydrolysate powder", *International Journal of Advance Pharmaceutical and Biological Sciences*, vol. 3, no. 3, pp. 563-574, 2014.
- [19] M. Merz *et al.*, "Flavourzyme, an enzyme preparation with industrial relevance: Automated nine-step purification and partial characterization of eight enzymes", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, vol. 63, no. 23, pp. 5682-5693, 2015.
- [20] D.C. Montgomery and G.C. Runger, *Applied statistics and probability for engineers*. John Wiley & Sons (Hoboken), 2010.
- [21] X.D. Bui *et al.*, "Optimization of production parameters of fish protein hydrolysate from *Sarda Orientalis* black muscle (by-product) using protease enzyme", *Clean Technologies Environmental Policy*, vol. 23, no. 1, pp. 31-40, 2021.
- [22] C. G. Pope and M. F. Stevens, "The determination of amino-nitrogen using a copper method", *Biochemical Journal*, vol. 33, no. 7, p. 1070, 1939.
- [23] W. Horwitz, *Official methods of analysis of AOAC International. Volume I, agricultural chemicals, contaminants, drugs*, AOAC International (Maryland), 2010.
- [24] J. Chen, D. Liu, B. Shi, H. Wang, Y. Cheng, and W. Zhang, "Optimization of hydrolysis conditions for the production of glucomanno-oligosaccharides from konjac using β -mannanase by response surface methodology", *Carbohydrate Polymers*, vol. 93, no. 1, pp. 81-88, 2013.
- [25] M. Kumar, A. K. Jain, M. Ghosh, and A. Ganguli, "Statistical optimization of physical parameters for enhanced bacteriocin production by *L. casei*", *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 17, no. 3, pp. 606-616, 2012.