



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.059

## NGHIÊN CỨU TRÍCH LY LIPASE (EC 3.1.1.3) TỪ NỘI TẠNG CÁ LÓC NUÔI

Trần Thanh Trúc\* và Nguyễn Văn Mười

Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Thanh Trúc (email: tttruc@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 18/01/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

### Title:

Extraction of lipase (EC 3.1.1.3) from visceral organs of cultured snakehead fish

### Từ khóa:

Cá lóc nuôi, lipase, nội tạng, trích ly

### Keywords:

Cultured snakehead fish, extraction, lipase, visceral organs

### ABSTRACT

The objective of this research was to determine factor affecting the extraction of lipase from visceral organs of cultured snakehead fish (*Channa striata*). Influence lipase in individual organs of the snakehead fish and the stability of the enzyme during frozen storage has been identified. After that, extraction conditions of lipase from the appropriate visceral organs of snakehead fish were also investigated. The individual factors (ratio of raw materials and solvent, changed from 1:1 to 1:6, w/v, solvent pH with 8 levels, from pH 3 to pH 10) which influenced to lipase extraction were initially determined. The response surface methodology (RSM) based on two-variable central composite design (CCD) was used to model the correlation of extraction temperature and time to lipase activity. The results showed that, the lipase activity extracted from pancreas and intestine of snakehead fish was higher than that from the stomach. Quick-freezing followed by frozen storage under the temperature of  $-18\pm 2^{\circ}\text{C}$  to maintain the lipase stability of visceral organs from snakehead fish for 8 weeks. The highest activity of lipase extracted from visceral organs (without stomach) was 78.42 U/g dry materials when using phosphate buffer pH 6.0 and the 1:4 (w/v) ratio of sample and solvent; optimal extraction temperature was  $40.3^{\circ}\text{C}$  for 211.2 minutes.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu xác định các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả trích ly lipase từ nội tạng của cá lóc nuôi. Tiến hành khảo sát sự hiện diện của lipase ở các bộ phận nội tạng riêng lẻ và sự ổn định hoạt tính của lipase có trong nội tạng cá lóc theo thời gian trữ đông. Từ bộ phận nội tạng cá lóc thích hợp đã được xác định, khảo sát các yếu tố có tác động đến hiệu quả trích ly lipase, bao gồm: (i) ảnh hưởng của các yếu tố riêng lẻ (tỷ lệ nguyên liệu và dung môi, thay đổi từ 1:1 đến 1:6, w/v, pH của dung môi với 8 mức khảo sát, từ pH 3 đến pH 10); (ii) tương quan giữa nhiệt độ và thời gian trích ly đến hoạt tính lipase được xác định bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) dựa trên thiết kế thí nghiệm trung tâm (CCD). Kết quả khảo sát cho thấy, trong nội tạng cá lóc, lipase được trích ly từ gan tụy và ruột cá lóc có hoạt tính cao hơn so với dạ dày. Cấp đông và trữ đông nguyên liệu ở nhiệt độ  $-18\pm 2^{\circ}\text{C}$  giúp duy trì hoạt tính lipase có trong nội tạng cá lóc đến 8 tuần. Dịch chiết lipase thu được từ hỗn hợp nội tạng cá lóc (loại bỏ dạ dày) có hoạt tính cao nhất là 78,42 U/g chất khô nguyên liệu (CKNL) khi sử dụng đệm phosphate pH 6 với tỷ lệ nội tạng và dung môi là 1:4 (w/v); nhiệt độ trích ly tối ưu là  $40,3^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 211,2 phút.

Trích dẫn: Trần Thanh Trúc và Nguyễn Văn Mười, 2019. Nghiên cứu trích ly lipase (EC 3.1.1.3) từ nội tạng cá lóc nuôi. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 174-184.

## 1 GIỚI THIỆU

Enzyme lipase (triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) được ứng dụng trong nhiều ngành như công nghiệp thực phẩm, công nghiệp hóa học, mỹ phẩm, da, y dược... Có hơn 100 loại lipase khác nhau được dùng để chuyển đổi lipid thành các chất khác (Ramesh *et al.*, 2014). Việc nghiên cứu sản xuất ra các chế phẩm enzyme nói chung và lipase nói riêng đang là một đòi hỏi cấp thiết đối với nhiều quốc gia trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Lipase có nguồn gốc khác nhau (vi sinh vật, động vật, thực vật) cũng có tính đặc hiệu và khả năng hoạt động riêng biệt. Trong khi lipase từ vi khuẩn được ứng dụng nhiều trong công nghiệp tẩy rửa, lipase từ nội tạng động vật và thủy sản – đặc biệt là nội tạng của các loài cá họ cá lóc (Kanjanaworakul *et al.*, 2005; Odedeyi, 2007 ; War *et al.*, 2011) lại được quan tâm ở lĩnh vực dược lý và thực phẩm chức năng (Gan *et al.*, 1994) hay sử dụng để di chuyển chất béo bằng con đường sinh học, giúp hình thành mùi vị đặc trưng cho các sản phẩm thịt và cá (Sharma *et al.*, 2001). Chính vì vậy, cùng với lipase từ vi sinh vật hay thực vật (Ramesh *et al.*, 2014), việc thu nhận và ứng dụng lipase từ nội tạng động vật và thủy sản cũng được quan tâm từ rất sớm (Bagi *et al.*, 1997). Tuy nhiên, phần lớn các nghiên cứu trích ly, ứng dụng protease và lipase từ phụ phẩm thủy sản chỉ tập trung ở hải sản (Klomkloa, 2008), trong đó protease cũng được chú trọng nhiều hơn. Một số lipase từ nội tạng cá đã được nghiên cứu như: cá mập, cá tuyết, cá tráp, cá đuối, cá rô (Vương Bảo Thy, 2015), hay nội tạng của cá *Channa striatus* (Kanjanaworakul *et al.*, 2005), ruột cá *Parachanna obscura* Channidae ở sông Ose thuộc vùng Đông Nam Nigeria (Odedeyi, 2007). Ở Việt Nam đã có các nghiên cứu bước đầu thu nhận enzyme từ nội tạng cá tra – nguồn phế liệu dồi dào từ ngành công nghiệp chế biến cá tra đông lạnh trong giai đoạn 1990 đến 2010 (Vương Bảo Thy, 2015).

Đồng bằng sông Cửu Long đang phát triển cá lóc nuôi với diện tích và sản lượng ngày càng tăng. Trong giai đoạn từ năm 2010 đến 2015, việc nuôi cá lóc phát triển mạnh mẽ và đột biến, tập trung nhiều ở tỉnh Trà Vinh (đặc biệt là huyện Châu Thành, Tiểu Cần và Trà Cú), tỉnh Đồng Tháp (huyện Tam Nông, Hồng Ngự), tỉnh Vĩnh Long, Tiền Giang, An Giang, Kiên Giang, Bạc Liêu và Cà Mau. Đến cuối năm 2017, chỉ tính riêng huyện Trà Cú (tỉnh Trà Vinh), sản lượng cá lóc nuôi đạt đến 212 ha, chiếm 84% diện tích nuôi cá lóc toàn tỉnh và là vùng cung cấp cá lóc nuôi lớn nhất Đồng bằng sông Cửu Long. Việc phát triển mạnh mẽ nghề nuôi cá lóc thúc đẩy yêu cầu cấp thiết của sự phát triển các sản phẩm chế biến từ cá lóc như mắm, khô cá, chà bông cá, chà cá lóc gia tăng. Hơn thế nữa, cuộc sống hiện đại với các sản phẩm sơ chế sẵn ngày càng tăng là nguyên nhân

dẫn đến việc loại bỏ một lượng rất lớn nội tạng cá lóc và được bán với giá thấp trực tiếp tại các cơ sở sản xuất khô, các chợ. Giá bán lẻ nội tạng cá lóc đã được làm sạch, loại mỡ ở các chợ dao động từ 20.000÷25.000 đồng/kg và giảm đến mức 10.000÷15.000 đồng/kg khi mua trực tiếp tại các cơ sở sơ chế cá, chế biến khô cá lóc ở Đồng Tháp, An Giang và Cà Mau. Điều này cho thấy tính khả thi của việc tận dụng nguồn phụ phẩm nội tạng cá lóc nuôi để thu nhận hệ enzyme thủy phân, điển hình là lipase và tạo cơ sở phát triển dòng chế phẩm lipase ở điều kiện thực tế trong tương lai.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương tiện

– Nội tạng cá lóc được thu mẫu trực tiếp tại điểm mua bán cá lóc ở các chợ đầu mối trên địa bàn quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ (4 chợ: chợ Xuân Khánh, chợ Cái Khế, chợ Trần Việt Châu và chợ An Bình). Thu mua mẫu ở 4÷6 điểm bán cá mỗi chợ.

– Hóa chất: acid acetic, acetone, tris aminomethane hydrochloride, trisodium citrate dihydrate (Merck, Đức), triolein (độ tinh khiết  $\geq 99,5\%$ , Sigma), gum arabic, HCl đậm đặc, sodium hydroxide (PA, Việt Nam), dầu olive và những hóa chất khác trong nghiên cứu.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Chuẩn bị mẫu

Toàn bộ phần nội tạng sau khi lấy ra khỏi thân thịt cá được chuyển trực tiếp sang dụng cụ chứa - bao bì PE đặt trong thùng xốp hay thùng cách nhiệt có chứa nước đá, nhiệt độ  $0\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Sau đó nguyên liệu được chuyển đến phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ. Thời gian từ khi nội tạng lấy khỏi thân thịt cá đến khi chuyển đến phòng thí nghiệm cần đảm bảo không quá 3 giờ.

Tại phòng thí nghiệm, nguyên liệu được qua các bước xử lý sơ bộ nhằm loại bỏ mang, mỡ, bụi bẩn. Nội tạng cá lóc thu được ở tất cả các nơi được trộn lại với nhau để đảm bảo tính đồng nhất. Cân và phân chia khối lượng mỗi mẫu là 200 g. Cho các mẫu đã chuẩn bị vào bao bì PA, đóng gói chân không. Tiến hành lạnh đông nhanh nguyên liệu ở hệ thống tủ cấp đông có nhiệt độ  $-40^{\circ}\text{C}$  đến khi nhiệt độ tâm sản phẩm đạt  $-18^{\circ}\text{C}$  (thời gian cấp đông trung bình là  $50\pm 55$  phút). Mẫu sau cấp đông được đưa vào tủ trữ đông ở nhiệt độ  $-18^{\circ}\text{C}$ . Trước khi tiến hành thí nghiệm, mẫu nội tạng lạnh đông được nghiền, xay để phá vỡ cấu trúc, cân khối lượng mỗi mẫu theo từng nghiệm thức khảo sát.

### 2.2.2 Phương pháp trích ly lipase từ nội tạng cá lóc

Nội tạng cá lóc lạnh đông được nghiền bằng máy quay sinh tố (tốc độ quay của motor ở mức 2, 3.000 rpm) trong thời gian 3 phút trước khi quá trình trích ly enzyme bắt đầu. Trong quá trình nghiền, nhiệt độ không vượt quá 5°C (Trần Quốc Hiền và Lê Văn Việt Mẫn, 2006). Sau khi nghiền, mẫu được đổ vào cốc thủy tinh, cân xác định khối lượng và đem trích ly bằng dung môi ở điều kiện nhiệt độ và thời gian khác nhau để chiết rút enzyme. Quá trình trích ly sử dụng khuấy từ, tốc độ 200 rpm trong thời gian là 150 phút nhằm tăng khả năng trích ly. Sau đó mẫu được lọc qua vải lọc để loại bỏ tạp chất rắn. Dịch lọc được ly tâm ở tốc độ 6.000 rpm trong thời gian 20 phút để loại bỏ phần cặn, thu dịch chiết, gọi là dịch chiết lipase thô (Vương Bảo Thy và *ctv.*, 2011). Tiến hành xác định hoạt tính lipase trong dịch chiết enzyme thô.

### 2.2.3 Phương pháp xác định hoạt tính enzyme lipase

– Hoạt tính enzyme lipase được xác định theo phương pháp chuẩn độ liên tục pH-stat. Cơ chất là nhũ tương dầu olive (20%) trong 2% gum arabic được chỉnh đến pH = 9. Hỗn hợp phản ứng gồm 4 mL nhũ tương dầu olive, kết hợp với 3,2 mL dung dịch đệm Tris-HCl (0,1 M, pH 7,2), 0,8 mL enzyme lipase. Sau 30 phút, thêm 16 mL acetone để dừng phản ứng. Tiến hành chuẩn độ với dung dịch NaOH 0,05 N, có sử dụng khuấy từ tốc độ 200 rpm. Đến khi dung dịch phản ứng đạt đến pH = 9, ngừng chuẩn độ (Tambekar *et al.*, 2013).

– Công thức xác định hoạt tính enzyme lipase:

$$\text{Hoạt tính enzyme lipase (U/g)} = \left( \frac{\Delta V \times N}{V_{\text{mẫu}}} \times \frac{1000}{30} \right) \times \left( \frac{V_{\text{sl}}}{m_{\text{mẫu}}} \right) \quad (\text{Tambekar et al., 2013})$$

Trong đó:  $\Delta V = V_2 - V_1$ ;  $V_1$ : thể tích dung dịch NaOH dùng để chuẩn độ mẫu đối chứng (mL);  $V_2$ : thể tích dung dịch NaOH dùng để chuẩn độ mẫu thật (mL);  $V_m$ : thể tích enzyme phản ứng (mL);  $V_{\text{sl}}$ : thể tích enzyme sau lọc (mL);  $m_{\text{mẫu}}$ : khối lượng mẫu ban đầu (g) (cân bán khô);  $N$ : nồng độ của dung dịch NaOH (N).

Một đơn vị hoạt tính của enzyme lipase được định nghĩa là lượng lipase cần thiết để giải phóng ra 1  $\mu\text{M}$  acid béo trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm (pH 9, nhiệt độ phòng).

## 2.3 Bố trí thí nghiệm

### 2.3.1 Thí nghiệm 1: Xác định các tính chất cơ bản và sự phân bố của lipase có trong nội tạng cá lóc nuôi

Thí nghiệm được thực hiện nhằm mục đích khảo sát sự hiện diện của lipase ở các bộ phận khác nhau

của nội tạng cá lóc (nội tạng hỗn hợp, dạ dày, ruột, gan và tụy), làm cơ sở cho việc phân riêng bộ phận có hoạt tính lipase cao, sử dụng cho quá trình ly trích và thu nhận lipase tiếp theo.

Nội tạng cá lóc sau khi thu mua được xử lý, phân thành 4 nhóm: nội tạng hỗn hợp, dạ dày, ruột, gan và tụy. Tiến hành xác định khối lượng của từng nhóm nội tạng và phân tích các tính chất cơ bản có trong nguyên liệu ban đầu, bao gồm độ ẩm (AOAC 934.06), pH (sử dụng pH kế, theo ISO 2917:1999(E)), hàm lượng đạm tổng số (TCVN 8125:2009), hàm lượng lipid tổng số (TCVN 8125:2009), hoạt tính lipase (Mục 2.2.3). Quá trình xử lý và phân tích phải tiến hành ngay sau khi thu nhận, đảm bảo giữ trong điều kiện nhiệt độ thấp ( $0 \pm 5^\circ\text{C}$ ) để tránh xảy ra những biến đổi không mong muốn, ảnh hưởng đến kết quả phân tích. Việc trích ly lipase được sử dụng theo phương pháp đã đề cập ở Mục 2.2.2, với dung môi là nước cất với tỷ lệ giữa nguyên liệu và dung môi là 1:1 (w/v), thời gian trích ly là 150 phút ở điều kiện nhiệt độ phòng ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

### 2.3.2 Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của thời gian trữ đông nội tạng cá lóc đến sự ổn định của enzyme lipase

Khảo sát sự thay đổi hoạt tính enzyme lipase có trong nội tạng cá lóc theo thời gian trữ đông ở nhiệt độ  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ . Bộ phận nội tạng cá lóc có hoạt tính lipase cao được cấp đông và trữ đông để tiến hành thu nhận enzyme. Ứng với từng thời gian trữ đông theo khảo sát, mẫu được xay mịn và tiến hành trích ly lipase. Xác định hoạt tính enzyme lipase (U/g CKNL (chất khô nguyên liệu)) có trong dịch trích sau khi ly tâm, từ đó kết luận tính ổn định của enzyme lipase trong nội tạng cá lóc ở nhiệt độ bảo quản  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### 2.3.3 Thí nghiệm 3: Nghiên cứu xây dựng quy trình thu nhận lipase từ nội tạng cá lóc nuôi

Mục tiêu của nghiên cứu là xác định được các thông số thích hợp cho quá trình trích ly lipase từ nội tạng cá lóc, bao gồm tỷ lệ nguyên liệu và dung môi, pH của dung dịch đệm trích ly, tương tác của nhiệt độ và thời gian trích ly đến hiệu quả thu nhận lipase.

Bộ phận nội tạng cá lóc thích hợp (đã được lựa chọn, thí nghiệm 1) được sử dụng làm nguyên liệu trích ly enzyme. Chú ý chỉ sử dụng mẫu nội tạng đã được trữ đông theo khoảng thời gian thích hợp đã lựa chọn từ thí nghiệm 2. Khối lượng nội tạng sử dụng cho một mẫu khảo sát là 50 g.

Trước hết, xác định tỷ lệ dung môi thích hợp cho quá trình trích ly lipase đạt hiệu quả cao nhất được thực hiện bằng cách bổ sung các tỷ lệ nước cất khác nhau vào mẫu nội tạng cá lóc (tỷ lệ nội tạng và nước

thay đổi từ 1:1 đến 1:6, w/v), phương pháp trích ly và thông số cố định được áp dụng giống như thí nghiệm 1 và 2. Dựa trên hoạt tính của lipase có trong mẫu khảo sát (U/g, CKNL), chọn ra tỷ lệ mẫu nội tạng cá lóc và nước cất sử dụng phù hợp giúp hiệu quả thu nhận lipase đạt cao nhất.

Việc đánh giá ảnh hưởng của việc điều chỉnh pH dung dịch trích ly đến hiệu quả thu nhận lipase được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm ở các pH khác nhau trong dãy pH 3 đến 10 (pH 3 và 4 sử dụng đệm glycine-HCl; pH từ 5 đến 8 sử dụng đệm phosphate và pH 9, 10 sử dụng đệm glycine-NaOH),

**Bảng 1: Ma trận quy hoạch thực nghiệm quá trình trích ly lipase từ nội tạng cá lóc**

TT mẫu	Giá trị mã hóa		Giá trị thực nghiệm	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Nhiệt độ trích ly, °C	Thời gian trích ly, phút
1	-1,4	0	26	180
2	-1	-1	30	60
3	-1	+1	30	300
4	0	-1,4	40	10
5	0	0	40	180
6	0	0	40	180
7	0	+1,4	40	350
8	+1	-1	50	60
9	+1	+1	50	300
10	+1,4	0	54	180
11	0	0	40	180

Quy hoạch thực nghiệm đưa ra bảng ma trận thực nghiệm gồm 33 thí nghiệm với 11 thí nghiệm cho 1 lần khảo sát (lặp lại 3 lần), trong đó có 4 thí nghiệm tại tâm (quy hoạch toàn phần 2<sup>2</sup>). Hàm mục tiêu (Y) là hoạt tính lipase (U/g, CKNL), X<sub>1</sub>: Nhiệt độ trích ly (°C) và X<sub>2</sub>: thời gian trích ly (phút). Vẽ đồ thị bề mặt đáp ứng, xác định nhiệt độ và thời gian trích ly tối ưu.

**2.4 Phương pháp phân tích và xử lý số liệu**

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, lặp lại ít nhất 3 lần. Thông số tương ứng với kết quả khảo sát đã lựa chọn từ thí nghiệm trước được sử dụng làm nhân tố cố định cho thí nghiệm kế tiếp.

Việc xác định phương trình tối ưu hóa điều kiện trích ly enzyme dựa trên phương pháp bề mặt đáp ứng RSM với điểm trung tâm (CCD). Phương trình tương quan được chọn lựa dựa trên tác động của các yếu tố khảo sát (2 thừa số) đến kết quả thu nhận (hoạt tính lipase) bằng các thử nghiệm phương trình hồi quy đa thức theo phương pháp bình phương nhỏ nhất.

– Các dạng phương trình hồi qui thường áp dụng đối với lĩnh vực công nghệ hóa học/thực phẩm/công nghệ sinh học gồm:

tỷ lệ nguyên liệu và dung môi được cố định theo kết quả đã khảo sát. Tiến hành thực hiện thí nghiệm trích ly lipase ở nhiệt độ phòng (30±2°C) và thời gian trích ly 150 phút. Xác định hoạt tính của lipase (U/g, CKNL) tương ứng với các nghiệm thức khảo sát.

Xác định tương tác của nhiệt độ và thời gian thích hợp cho quá trình trích ly lipase từ nội tạng cá lóc được thực hiện theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm. Sử dụng trục giao đối xứng, mỗi yếu tố tiến hành tại 3 mức (-1, 0, +1) và các bước nhảy -1,4 và +1,4 theo Bảng 1.

Mô hình bậc hai tuyến tính:  $y = \zeta(x_1, x_2, \dots, x_k) = b_0 + \sum b_j x_j + \sum b_{ju} x_j x_u + \dots$

Mô hình bậc hai phi tuyến:  $y = b_0 + \sum b_j x_j + \sum b_{ju} x_j x_u + \dots + \sum b_{jj} x_j^2$

Với: b<sub>0</sub> là hệ số hồi quy; b<sub>j</sub> là hệ số tuyến tính; b<sub>ju</sub> là hệ số tương tác cặp; k là số yếu tố khảo sát (x<sub>1</sub> ... x<sub>k</sub>).

Kết quả của các thí nghiệm so sánh, chọn nghiệm thức tối ưu và tối ưu hóa quá trình trích ly theo phương pháp bề mặt đáp ứng đều được thống kê và phân tích sử dụng chương trình Statgraphics Centurion 16.2.04 (Statpoint Technologies, Inc., Hoa Kỳ) và phần mềm Excel. Phân tích phương sai (ANOVA) với kiểm định LSD, Duncan được áp dụng để kết luận về sự sai khác giữa trung bình các nghiệm thức.

**3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1 Xác định các tính chất cơ bản và sự phân bố của lipase có trong nội tạng cá lóc nuôi**

Kết quả xác định tỷ lệ phân bố của các bộ phận nội tạng cá lóc (Bảng 2) cho thấy, gan và tụy là thành phần chủ yếu nhất chiếm đến 43,20±1,83%, cao khác biệt có ý nghĩa khi so sánh với tỷ lệ ruột (31,46±2,21%) và dạ dày (25,34±1,42%).

**Bảng 2: Tỷ lệ phân bố và tính chất hóa lý của các thành phần nội tạng cá lóc nuôi**

Thành phần	Tỷ lệ phân bố (% tổng nội tạng)	Thành phần			
		pH	Độ ẩm (%)*	Protein (%cbk)	Lipid (%cbk)
Dạ dày	25,34±1,42	6,71±0,35	74,31±1,71	59,40±2,55	23,90±0,70
Ruột	31,46±2,21	6,60±0,20	71,23±1,00	53,73±2,41	42,12±1,87
Gan tụy	43,20±1,83	6,57±0,25	64,67±2,10	38,72±1,55	54,47±1,72
Ruột, gan, tụy	74,66±2,07	6,63±0,22	65,41±1,70	42,90±1,53	49,81±1,19
Hỗn hợp	100	6,59±0,37	66,28±1,40	42,31±1,32	38,02±1,72

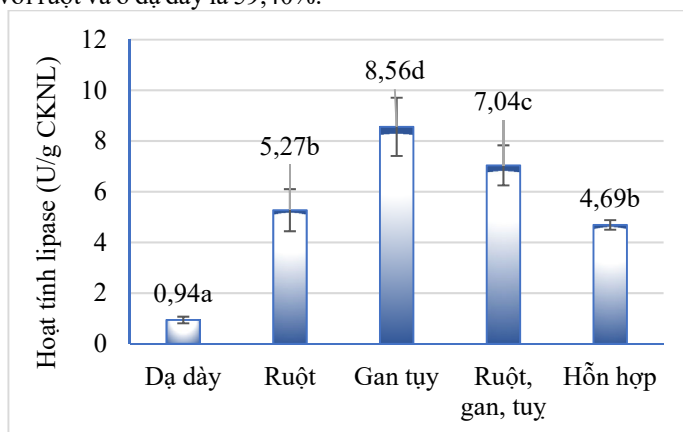
\* Số liệu được phân tích tại Trung tâm Kỹ thuật và Ứng dụng Công nghệ Cần Thơ (Catech); cbk: cân bản khô

Nhìn chung, mức dao động về các tính chất hóa lý khảo sát của nội tạng cá lóc ở các đợt lấy mẫu không nhiều. Điều này cho thấy, nguồn nguyên liệu cá lóc nuôi với chế độ cho ăn hầu như giống nhau đã góp phần làm cho chất lượng cá, kéo theo chất lượng nội tạng khá ổn định. Hơn thế nữa, các điểm bán cá ở khu vực quận Ninh Kiều hầu hết đều được cung cấp cá ở cùng một đầu mối hay cùng vùng nguyên liệu (vùng nuôi tỉnh Hậu Giang).

Giá trị pH của nội tạng cá lóc nằm trong khoảng 6,57÷6,71 chứng tỏ nguyên liệu thu hoạch vẫn còn độ tươi (Nguyễn Trọng Cận và Đỗ Minh Phương, 1989). Tuy nhiên, giá trị pH vào khoảng trung tính là điều kiện thích hợp cho vi sinh vật hoạt động, gây hư hỏng nguyên liệu. Hàm lượng ẩm và protein trong nguyên liệu tỷ lệ nghịch với lipid, gan tụy có hàm lượng lipid cao nhất và protein thấp nhất khi so sánh với ruột và dạ dày. Nhìn chung, độ ẩm của các thành phần nội tạng cá lóc khảo sát tương đối cao (64,67÷74,31%) cùng với hàm lượng protein trong nguyên liệu cũng ở mức cao, 38,72÷42,31% (cbk) đối với gan tụy và mẫu hỗn hợp; 42,90% đối với gan tụy, ruột; 53,73% đối với ruột và ở dạ dày là 59,40%.

Độ ẩm cùng với hàm lượng protein cao tạo điều kiện cho vi sinh vật gây hư hỏng phát triển, tuy nhiên cũng là môi trường thuận lợi cho enzyme hoạt động. Kết quả phân tích hàm lượng lipid tổng số trong nội tạng cá lóc cho giá trị khá cao khoảng 38,02 ÷ 54,47% (cbk) ở các bộ phận ruột, gan, tụy và hỗn hợp nội tạng; giá trị này cũng không quá thấp ở dạ dày (23,90%) - là cơ chất thích hợp cho các phản ứng thủy phân chất béo và là nguyên nhân của nhiều phản ứng oxy hóa chất béo khi có sự hiện diện của oxy, tạo các gốc tự do làm giảm hoạt tính enzyme lipase có trong nguyên liệu (Lê Ngọc Tú và ctv., 2004). Do đó, nguyên liệu nội tạng cá lóc sau khi thu mua và xử lý cần phải được trữ đông để đảm bảo hoạt tính được ổn định trong quá trình trích ly.

Hoạt tính của các enzyme tiêu hóa phụ thuộc vào bản chất của thành phần nội tạng do mỗi enzyme tập trung ở một số cơ quan nhất định. Trong phạm vi nghiên cứu, xác định hoạt tính của lipase trong nội tạng cá lóc ở các bộ phận khác nhau để có cơ sở lựa chọn, phân riêng bộ phận nội tạng thích hợp cho việc trích ly enzyme đạt hiệu quả cao nhất và ít chịu sự tác động của các thành phần khác.



**Hình 1: Sự thay đổi hoạt tính lipase ở các bộ phận nội tạng cá lóc khác nhau**

Kết quả (Hình 1) cho thấy, lipase tập trung nhiều nhất ở gan tụy, kế đến là ruột và ít nhất là dạ dày. Đối với mẫu gan tụy, hoạt tính lipase thu được có giá trị là 8,56 (U/g, CKNL).

Nghiên cứu trích ly enzyme tiêu hoá từ nguồn nguyên liệu là toàn bộ nội tạng cho thấy có sự sụt giảm đáng kể hoạt tính lipase khi so sánh với nguồn gan tụy, điều này có thể do ở dạ dày (27,12%) không

có sự hiện diện của enzyme cao. Nghiên cứu của Natalia *et al.* (2004) cũng ghi nhận giá trị hoạt tính enzyme lipase cao nhất ở tụy và ruột cá *Scleropages formosus*. Odedeyi (2007) cũng khẳng định sự hiện diện của lipase cao tại ruột, đặc biệt là manh tràng và có rất ít ở dạ dày. Sự khác biệt này có thể do tụy tạng là cơ quan chính sản sinh ra các enzyme tiêu hóa. Mặt khác, mẫu gan tụy có tính đồng nhất cao hơn các mẫu còn lại nên quá trình nghiền, trích ly thu nhận enzyme dễ dàng hơn. Kết quả khảo sát cho thấy sự cần thiết của việc loại bỏ dạ dày ra khỏi hỗn hợp nội tạng. Mặc dù vậy, chỉ với khoảng một phần ba khối lượng nội tạng là gan tụy, việc tách riêng chỉ thành phần này làm nguyên liệu để thu nhận lipase

không mang lại hiệu quả kinh tế. Kết quả khảo sát khả năng trích ly enzyme tiêu hoá từ mẫu hỗn hợp gan tụy và ruột cho thấy, hoạt tính lipase thu được khá cao 7,04 U/g CKNL, chỉ thấp hơn trường hợp nguồn gan tụy riêng lẻ. Chính vì vậy, mẫu hỗn hợp gan tụy và ruột được lựa chọn sử dụng cho quá trình trích ly, thu nhận lipase.

**3.2 Ảnh hưởng của thời gian trữ đông nội tạng cá lóc đến hoạt tính của enzyme lipase**

Trữ đông là một giải pháp được sử dụng để bảo quản, giúp duy trì nguồn nguyên liệu ổn định cho quá trình trích ly enzyme tiếp theo. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong Bảng 3.

**Bảng 3: Ảnh hưởng của thời gian trữ đông đến hoạt tính lipase từ nội tạng cá lóc**

Thời gian trữ đông (tuần)	Hoạt tính lipase (U/g, CKNL)	Thời gian trữ đông (tuần)	Hoạt tính lipase (U/g, CKNL)
0			7,04±0,15 <sup>b</sup>
1	6,99±0,27 <sup>ab</sup>	5	6,94±0,12 <sup>ab</sup>
2	6,97±0,21 <sup>ab</sup>	6	6,92±0,15 <sup>ab</sup>
3	6,96±0,21 <sup>ab</sup>	7	6,74±0,09 <sup>a</sup>
4	6,95±0,09 <sup>ab</sup>	8	6,71±0,08 <sup>a</sup>

(Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%)

Kết quả khảo sát đã chứng tỏ việc xử lý nguyên liệu nhanh chóng, lạnh đông nhanh và trữ đông ở nhiệt độ -18°C đã giúp ổn định hoạt tính lipase có trong nội tạng cá lóc. Hoạt tính enzyme lipase trong nội tạng ban đầu là 7,04±0,15 (U/g CKNL) và ở tuần trữ đông thứ 8 là 6,71±0,08 (U/g CKNL), chỉ giảm khoảng 5% so với hoạt tính lipase ban đầu. Nói cách khác, quá trình trữ đông giúp duy trì ổn định hoạt tính lipase trong nội tạng cá lóc (loại bỏ dạ dày) đang khảo sát. Mặc dù vậy, vẫn có sự khác biệt hoạt tính lipase ở tuần đầu tiên với tuần 7 và 8. Điều này có lẽ là do sự dao động nhiệt độ trong quá trình tồn trữ do các tác động bên ngoài (điều kiện thời tiết, dao động nhiệt độ khi lấy mẫu...) có ảnh hưởng đến đặc tính cấu trúc của mô tế bào, tác động một phần đến hoạt tính của enzyme (Asgeirsson *et al.*, 1995). Trong nghiên cứu của Senthil *et al.* (1992) suốt thời gian trữ đông, hoạt tính lipase trong cá mòi và cá hổ giảm dần sau 60 ngày và hoạt tính thấp nhất ở 180 ngày bảo quản. Kết quả cho thấy, có thể trữ đông nội tạng ở nhiệt độ -18°C trong 6 tuần để làm nguồn nguyên liệu trích ly.

ảnh hưởng của tỷ lệ giữa nguyên liệu và dung môi (nước cất) nhằm thu nhận lipase có hoạt tính cao nhất. Kết quả thí nghiệm được tổng hợp và trình bày ở Bảng 4.

**3.3 Các điều kiện trích ly lipase từ nội tạng cá lóc phù hợp**

**3.3.1 Ảnh hưởng của tỷ lệ mẫu và dung môi trích ly đến hiệu quả thu nhận lipase**

Sự chênh lệch nồng độ chất tan giữa nguyên liệu và dung môi càng lớn sẽ thúc đẩy quá trình khuếch tán chất tan (trường hợp này là lipase) ra ngoài dung môi. Trên cơ sở đó, thí nghiệm tiến hành khảo sát

Từ kết quả của Bảng 4 cho thấy, hoạt tính của lipase thu được tăng dần khi tỷ lệ nguyên liệu và dung môi sử dụng tăng từ 1:1 lên đến giá trị 1:4 và sau đó không có sự khác biệt ở tỷ lệ 1:5 và 1:6. Tỷ lệ nguyên liệu: dung môi sử dụng để trích ly là 1:4 (w/v), hoạt tính của lipase đạt cực đại khi so sánh với các mức độ pha loãng cao hay thấp hơn (giá trị hoạt tính lipase tương ứng là 20,18±1,35 U/g CKNL). Tuy nhiên, hoạt tính lipase khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê ở hai tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là 1:5 (20,07±1,41 U/g CKNL) và 1:6 (19,95±0,48 U/g CKNL).

Ở tỷ lệ dung môi sử dụng để trích ly enzyme thấp, lượng dung môi sử dụng ít, không đủ cho sự xâm nhập vào nguyên liệu và khuếch tán chất tan vào dung môi (Lonsane and Krishnaiah, 1992 ; Madhusudhan *et al.*, 2011). Khi gia tăng tỷ lệ dung môi sử dụng, sự chênh lệch nồng độ chất tan giữa nguyên liệu và dung môi tăng, làm tăng tính tan và tăng sự khuếch tán, vì thế làm tăng hoạt tính enzyme trong quá trình trích ly (Castilho *et al.*, 2000; Madhusudhan *et al.*, 2011). Tuy nhiên, ở các tỷ lệ dung môi sử dụng cao (1:5 và 1:6), thì hoạt tính lipase thu được sẽ giảm trở lại do mức độ pha loãng của lipase trong dịch trích tăng (Lonsane and Krishnaiah, 1992). Với tỷ lệ dung dịch đậm sử dụng

càng cao thì thể tích dịch trích thu được càng nhiều, trong khi lượng enzyme sinh ra từ quá trình trích ly là không đổi. Ngoài ra, khi tỷ lệ nguyên liệu và dung môi gia tăng cũng thúc đẩy quá trình hòa tan enzyme vào dung môi tăng nhanh ở giai đoạn đầu. Với nhiệt độ và thời gian trích ly được giữ cố định, lượng enzyme được hòa tan vào dung môi có thể đạt đến mức cao nhất ở thời gian ngắn hơn khi so sánh với các tỷ lệ nguyên liệu và dung môi thấp hơn, việc duy trì quá trình trích ly vượt quá thời gian thu nhận tối ưu này, enzyme có khả năng bị vô hoạt và giảm hoạt tính (Shata and Farid, 2012).

**Bảng 4: Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu và nước cất đến hoạt tính lipase thu nhận từ nội tạng cá lóc**

Tỷ lệ nguyên liệu: nước cất (w/v, g/mL)	Hoạt tính lipase (U/g CKNL)
1:1	7,04 <sup>a</sup> ±1,27
1:2	14,62 <sup>b</sup> ±0,60
1:3	17,47 <sup>c</sup> ±2,16
1:4	20,18 <sup>d</sup> ±1,35
1:5	20,07 <sup>d</sup> ±1,41
1:6	19,95 <sup>d</sup> ±0,48

(Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%)

Ở điều kiện khảo sát, tỷ lệ nguyên liệu và dung môi để trích ly là 1:4 vẫn được ưu tiên chọn lựa do trong trường hợp này hiệu suất enzyme thu được không có sự khác biệt nhưng có tính kinh tế hơn so với tỷ lệ 1:5 và 1:6 nhờ tiết kiệm được một phần thể tích dung môi sử dụng trong quá trình trích ly và giảm lượng hóa chất sử dụng trong quá trình tinh sạch enzyme (Castilho *et al.*, 2000). Vương Bảo Thy (2015) cũng đề xuất tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là 1:2 (w/v) để trích ly cả protease và lipase từ nội tạng cá tra. Trong khi đó, Islam *et al.* (2008) lại đề nghị tỷ lệ nguyên liệu và dung môi đến 1:10 (w/v) để tiến hành thu nhận lipase từ cá đối. Việc trích ly lipase từ nội tạng cá lóc chưa được công bố, tuy nhiên kết quả thu được đã cho thấy tỷ lệ dung môi thích hợp cho quá trình trích ly enzyme phụ thuộc vào từng loại enzyme, nguồn nguyên liệu và có thể phụ thuộc cả vào điều kiện sơ chế, tốc độ ly tâm (Đặng Thị Thu và Nguyễn Thị Xuân Sâm, 2009). Dựa trên kết quả khảo sát, tỷ lệ nguyên liệu và dung môi sử dụng cho quá trình trích ly lipase từ nội tạng cá lóc được lựa chọn là 1:4 (w/v).

### 3.3.2 Ảnh hưởng của sự thay đổi pH dung môi đến hiệu quả trích ly lipase

Dựa trên nghiên cứu ảnh hưởng của việc điều chỉnh pH của dung môi đến quá trình trích ly enzyme, dung dịch đệm ở các giá trị pH khác nhau

được sử dụng để khảo sát trích ly lipase, với mẫu đối chứng sử dụng dung môi trích ly là nước cất.

Kết quả phân tích đánh giá sự ảnh hưởng của pH đến hoạt tính tương đối của lipase được thể hiện ở Bảng 5 cho thấy, ở giá trị pH 6,0 của dung môi trích ly, lipase thu được có hoạt tính cao nhất (56,04±0,54 U/g CKNL), cao hơn 3 lần hoạt tính lipase thu được ở mẫu đối chứng (trích ly bằng nước).

**Bảng 5: Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính enzyme lipase thu nhận từ nội tạng cá lóc**

pH của dung dịch đệm sử dụng	Hoạt tính lipase (U/g CKNL)
Đối chứng	20,18 <sup>a</sup> ±1,35
3	25,63 <sup>b</sup> ±0,18
4	25,81 <sup>b</sup> ±0,11
5	30,14 <sup>c</sup> ±1,09
6	56,04 <sup>f</sup> ±0,54
7	46,06 <sup>c</sup> ±3,61
8	28,63 <sup>bc</sup> ±3,26
9	32,79 <sup>d</sup> ±4,20
10	30,62 <sup>cd</sup> ±2,49

(Các giá trị trong một cột có cùng một chữ cái theo sau thì không khác biệt thống kê theo kiểm định Duncan ở mức độ tin cậy 95%)

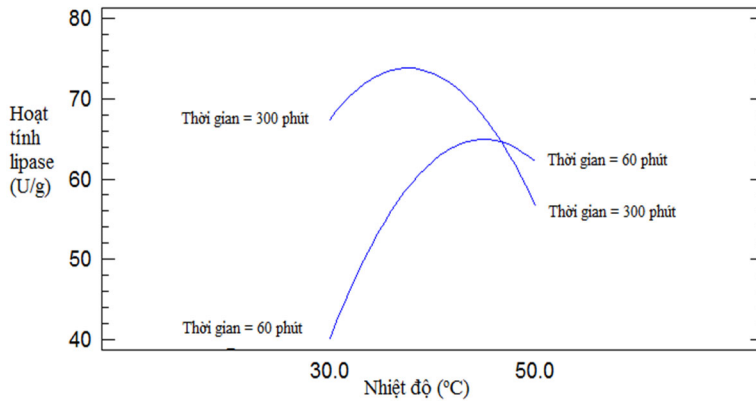
Nghiên cứu của Senthilkumar and Selvakumar (2008) đưa ra giá trị pH môi trường sử dụng để thu nhận lipase ngoại bào từ *Bacillus* sp. SS-1 là 8,0. Trong khi đó, theo Sirisha *et al.* (2010) giá trị pH là 7,0 là giá trị pH thích hợp để thu nhận lipase từ vi khuẩn có trong đất chứa dầu. Điều này là do mỗi enzyme chỉ có hoạt tính mạnh nhất ở một vùng pH xác định gọi là pH tối thích. Nghiên cứu của Prasertsan and Prachumratana (2008) đã đề xuất giá trị pH trích ly 9 và 10 là phù hợp cho quá trình thu nhận cả lipase và protease từ nội tạng cá ngừ. Trước đó, nghiên cứu của Kim *et al.* (1994) đã đề xuất giá trị pH 7,5÷8,0 là điều kiện phù hợp cho quá trình trích ly lipase từ nội tạng tôm hùm nước ngọt (*Procambarus clarkii*). Hiratsuka *et al.* (2008) đã tìm ra khoảng pH của dung môi trích ly phospholipase A1 từ buồng trứng của cá ngừ vằn là 6÷7. Nhìn chung, sự thay đổi pH môi trường có ảnh hưởng đến mức độ ion hóa cơ chất, đặc biệt là độ bền của enzyme. Nói cách khác, điều kiện pH thích hợp cho quá trình trích ly còn phụ thuộc vào đặc tính nguồn cơ chất sử dụng (Prasertsan and Prachumratana, 2008). Dựa trên kết quả khảo sát, dung dịch phosphate với pH 6,0 được sử dụng làm dung dịch trích ly enzyme lipase từ nội tạng cá lóc cho các khảo sát tiếp theo.

3.3.3 Tương tác của nhiệt độ và thời gian trích ly đến hiệu quả thu nhận lipase

Dựa vào kết quả thí nghiệm thăm dò cho thấy, nhiệt độ và thời gian trích ly là hai yếu tố có tác động lớn đến hiệu quả thu nhận lipase. Tiến hành khảo sát sự tương tác của 2 yếu tố này đến khả năng trích ly lipase từ nội tạng cá lóc (bỏ dạ dày) theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm. Ở khảo sát này, tỷ lệ mẫu và dung môi được cố định là 1:4 (w/v), sử dụng dung dịch đệm phosphate pH 6.

Kết quả khảo sát được thể hiện qua biểu đồ thể hiện sự tương tác của thời gian và nhiệt độ trích ly đến hoạt tính lipase ở Hình 2 và 3.

Từ đồ thị tổng quát biểu diễn sự tương tác của cặp nhân tố nhiệt độ và thời gian đến hoạt tính lipase thu nhận ở Hình 2 cho thấy, hai nhân tố này thật sự có sự ảnh hưởng đồng thời đến quá trình trích ly enzyme lipase. Với nhiệt độ xử lý thấp và thời gian ủ ngắn cho hiệu quả trích ly kém, trong khi đó, nếu nâng nhiệt độ trích ly lên mức cao nhất và thời gian ủ kéo dài, lipase sẽ bị mất hoạt tính.



Hình 2: Đồ thị biểu diễn sự tương tác của nhiệt độ và thời gian trích ly đến hoạt tính của lipase từ nội tạng cá lóc

Đồ thị bề mặt đáp ứng và đồ thị đường đồng điểm được thể hiện đồng thời ở Hình 3 một lần nữa khẳng định cả hai yếu tố nhiệt độ và thời gian đều ảnh hưởng đến quá trình trích ly lipase từ nội tạng cá lóc. Giá trị cao nhất của hàm mục tiêu  $Y_1$  khi  $X_1$  có giá trị trong khoảng từ 0 đến +1 (40°C đến 50°C) và  $X_2$  có giá trị trong khoảng từ 0 đến +1 (180 đến 300 phút).

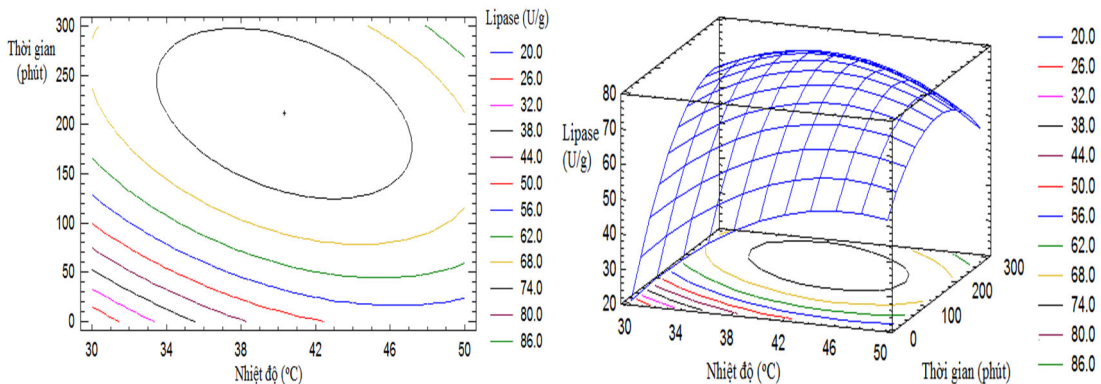
các nhiệt độ cao hơn.

Phương trình thực nghiệm tối ưu hóa hai nhân tố thời gian và nhiệt độ đối với quá trình trích ly thông qua kết quả thí nghiệm có được là:

$$Y_1 = -190,56 + 10,3651X_1 + 0,568461X_2 - 0,110672X_1^2 - 0,00682569X_1.X_2 - 0,000694116X_2^2 \quad (1)$$

Hoạt tính lipase từ nội tạng cá lóc tăng đều từ 10 đến 211 phút đối với điều kiện nhiệt độ 30°C và 40°C, và giảm dần theo thời gian 300 và 350 phút ở

Giá trị thời gian và nhiệt độ tối ưu cho quá trình trích ly enzyme từ nội tạng cá lóc khi giải phương trình hồi quy (1).

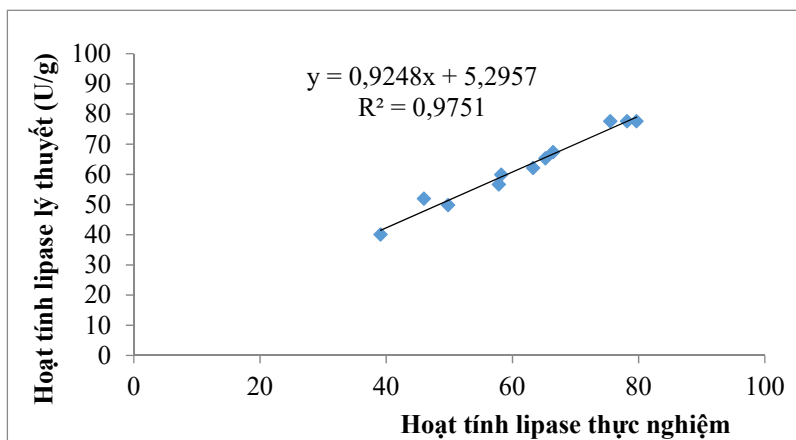


Hình 3: Đồ thị đường đồng điểm và bề mặt đáp ứng thể hiện sự tương tác của nhiệt độ và thời gian trích ly đến hoạt tính của lipase thu nhận từ nội tạng cá lóc



Dựa theo kết quả thu được trên Hình 3, điều kiện nhiệt độ tối ưu để trích ly lipase từ nội tạng cá là 40,3°C tương ứng với 211,2 phút. Hoạt tính lipase thu được từ thực nghiệm và tính toán theo phương trình có độ tương thích cao ở giá trị  $R^2 = 0,9751$  (Hình 4).

Như vậy có thể kết luận rằng phương trình hồi quy đã mô tả đúng các kết quả thực nghiệm. Hệ số tương quan cho biết 97,51% sự biến đổi hoạt tính lipase là do ảnh hưởng của các biến độc lập  $X_1, X_2$  và chỉ có 2,49% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định gây ra.



**Hình 4: Đồ thị tương quan giữa hoạt tính lipase xác định bằng thực nghiệm và lý thuyết**

Kết quả đã khẳng định nhiệt độ và thời gian có sự tương tác đến hiệu quả trích ly enzyme lipase. Theo Negi *et al.* (2011), thời gian trích ly quá ngắn hay quá dài đều làm giảm hoạt tính enzyme. Nếu thời gian trích ly ngắn sẽ không đủ cho quá trình ngấm dung môi vào nguyên liệu. Ngược lại, thời gian trích ly dài sẽ làm giảm hoạt tính enzyme (Ghildyal *et al.*, 1991). Đồng thời, hoạt tính lipase tăng khi tăng nhiệt độ, tuy nhiên, khi nhiệt độ quá cao hoạt tính enzyme bắt đầu giảm do các phân tử đóng vai trò trung tâm hoạt tính của enzyme bị phá vỡ bởi nhiệt và trở nên bất hoạt, enzyme bị biến đổi và mất đi vai trò xúc tác (Alyward and Haisian, 1969). Ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ tối ưu, động năng của enzyme và cơ chất giảm làm chúng chuyển động chậm và ít va chạm hơn. Vì thế, các phức chất enzyme - cơ chất cũng hình thành ít hơn làm phản ứng xảy ra chậm hơn so với ở nhiệt độ tối ưu. Nghiên cứu của Knospe and Plendl (1997, trích dẫn bởi Pajojar and Sethar, 2002) đã tìm thấy điều kiện trích ly thích hợp lipase từ nội tạng của dê là ở pH 5,6÷6,5 và khoảng nhiệt độ trích ly thích hợp là 43÷60°C. Tương tự, nghiên cứu của Aryee *et al.* (2007) cho kết quả nhiệt độ tối ưu để trích ly lipase từ nội tạng cá đối xám (*Mugil cephalus*) là 50°C trong 30 phút ở pH 8. Điều này cho thấy, điều kiện trích ly lipase - bao gồm nhiệt độ, thời gian và cả pH dung môi sử dụng phụ thuộc rất lớn vào nguồn nguyên liệu thu nhận enzyme. Trong nghiên cứu này, enzyme lipase từ nội tạng cá lóc có nhiệt độ trích ly tối ưu là 40,3°C tương ứng với 211,2 phút sử dụng đệm phosphate pH 6, hoạt tính enzyme lipase tối ưu có giá trị là 78,42 (U/g CKNL). Trong khảo

sát thực tế, chọn lựa mức nhiệt độ 40°C và thời gian ủ là 210 phút, hoạt tính lipase đạt được ở điều kiện trích ly tối ưu là 77,16±3,14 (U/g CKNL).

#### 4 KẾT LUẬN

Những kết quả thu nhận được từ nghiên cứu đã cho thấy tính khả thi của việc sử dụng nguồn nguyên liệu nội tạng cá lóc nuôi đã được loại bỏ dạ dày (gan, tụy và ruột) trong trích ly và thu nhận chế phẩm lipase. Trong đó, nguồn nguyên liệu có thể được trữ đông ở -18°C mà vẫn duy trì ổn định hoạt tính lipase trong khoảng 6 tuần. Quá trình ly trích lipase từ nội tạng cá lóc nuôi đạt hiệu quả cao nhất khi được tiến hành trong điều kiện tỷ lệ nguyên liệu và dung dịch trích ly là 1:4 (w/v) với dung dịch đệm là phosphate pH 6. Trong khảo sát thực tế, chọn lựa mức nhiệt độ 40°C và thời gian ủ là 210 phút, hoạt tính lipase đạt được ở điều kiện trích ly tối ưu là 77,16±3,14 (U/g CKNL).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alyward, F. and Haisian, D.R, 1969. Oxidation system in fruits and vegetables their relation to the quality of pressured products. *Advances in Food research*, 17: 1-76.
- Aryee, A.N.A., Simpson B.K. and Villalonga. R., 2007. Lipase fraction from viscera of grey mullet (*Mugil cephalus*). Isolation, partial purification and some biochemical characteristics. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (3): 394-402.
- Asgerirsson, B., Hartemink, R. and Chlebowski, J.F., 1995. Alkaline phosphatase from Atlantic cod (*Gadus morhua*)-Kinetic and structural properties which indicate adaptation to low

- temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 110B: 315-329.
- Bagi, K., Simon, L. M. and Szajáni, B., 1997. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 20 (7): 531-535
- Castilho, L.R., Alves, T.L.M. and Medronho, R.A., 2000. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 71: 45-50.
- Đặng Thị Thu và Nguyễn Thị Xuân Sâm, 2009. Công nghệ enzyme. Trích dẫn từ: Cơ sở công nghệ sinh học (chủ biên Đặng Thị Thu). NXB Giáo dục. Việt Nam.
- Gan, K.H., Heijerman, H.G.M., Geus, W.P., Bakker, W. and Lamers, C.B.H.W., 1994. Comparison of a high lipase pancreatic enzyme extract with a regular pancreatin preparation in adult cystic fibrosis patients. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*: 603-607.
- Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M., Lonsane, B.K. and Karanth, N.G., 1991. Efficient and simple extraction of mouldy bran in a pulsed column extractor for recovery of amyloglucosidase in concentrated form. *Process Biochemistry*, 26: 235-241.
- Hiratsuka, S., Kitagawa, T., Yamagishi, K., and Wada, S., 2008. Phospholipase A1 activity of crude enzyme extracted from the ovaries of skipjack tuna. *Fisheries science*, 74 (1), 146-152.
- Islam, M.A., Absar, N. and Bhuiyan, A.S., 2008. Isolation, purification and characterization of lipase from Grey Mullet (*Liza parsia* Hamilton, 1822). *Asian Journal of Biochemistry*, 3: 243-255.
- Kanjanaworakul, S., Jintasatapom, O. and Tabthipwon, P., 2005. Study on Digestive Enzyme Activity in Snakehead Fish (*Channa striata*). Proceedings of 43rd Kasetsart University Annual Conference, Thailand. Subject: Fisheries, 23-35.
- Kim, H.R., Samuel, P., Meyers, J.H. and Godber, J. S., 1994. Enzymatic properties of anionic trypsin from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 107 (2): 197-203.
- Klomklao S., 2008. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. *Songklanakarin Journal of Science Technology*, 30 (1): 37-46.
- Knospe, C., Plendl, J., 1997. Histochemical demonstration of lipase activity in the gastric mucosa of the cat. *Anatomy Histology Embryology Journal*, 26(4): 303-304.
- Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi và Lê Doãn Diên, 2004. Trong: Lê Ngọc Tú (chủ biên). Hóa sinh công nghiệp. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà Nội. Hà Nội, 443 trang.
- Lonsane, B.K. and Krishnaiah, M.M., 1992. Product leaching and downstream processing. In: Doelle, H.W., Mitchell, D.A. and Rolz, C.E. (editors). Solid substrate Cultivation. Elsevier Science Publishers. UK, 147-153.
- Madhusudhan, M.C., Lakshmi, M.C. and Raghavarao, K.S.M.S., 2011. Aqueous Two-Phase Extraction of Enzymes for Food Processing. In: F. Lebovka, N. Vorobiev and E. Chemat (editors). Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, CRC Press.
- Natalia, Y., Roshada, H., Ahyaudin, A. and Alexander, C., 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture*, 233: 305-320.
- Negi, J.S., Singh, P. and Rawat, B., 2011. Chemical constituents and biological importance of swertia-a review. *Current Chemical Research*, 3: 1-15.
- Nguyễn Trọng Căn và Đỗ Minh Phương, 1989. Công nghệ chế biến thực phẩm thủy sản (tập 1 và 2), NXB Nông nghiệp. Việt Nam.
- Odedeyi, D.O., 2007. Digestive enzymes in the gut of Snakehead fish *Parachanna obscura* (Gunter, 1861) (Channidae) in river Ose south western Nigeria. *Journal of Fisheries International*, 2(2): 178-181.
- Pahoja, V.M. and Sethar, M.A., 2002. A Review of Enzymatic Properties of Lipase in Plants, Animals and Microorganisms. *Journal of Applied Sciences*, 2: 474-484.
- Prasertsan, P., and Prachumratana, T., 2008. Comparison and selection of protease and lipase sources from visceral organs of three tuna species. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 30.
- Ramesh, S., Kumar, R., Devi, R. A. and Balakrishnan, K., 2014. Isolation of a lipase producing bacteria for enzyme synthesis in shake flask cultivation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3 (3): 712-719.
- Senthil, V.A., Srikar, L.N., Reddy, G. and Sagar, V., 1992. Effect of frozen storage on protease and lipase activities of oil sardine and ribbon fish. *Journal of Food Science & Technology*, 29 (6): 392-394
- Senthilkumar, R. and G. Selvakumar, G., 2008. Isolation and Characterization of Extracellular Lipase producing *Bacillus* sp. SS-1 from slaughterhouse soil. *Journal of Advanced Research in Biotechnology*, 2: 24-25.
- Sharma, R., Y. Chisti, Y., and U.C. Banerjee., U.C., 2001. Production, purification, characterization and application of lipases. *Biotech. Adv.* 19: 627-662.
- Shata, H.A., and M.A.F. Farid, M.A.F., 2012. Optimization of Extraction Parameters for Keratinase Recovery from Fermented Feather under Solid State Fermentation by *Streptomyces*

- sp. NRC 13S. Journal of Applied Biological Chemistry, 55 (3): 149-156.
- Sirisha, E., N. Rajasekar, N. and M. Lakshmi Narasu., M., 2010. Isolation and Optimization of Lipase Producing Bacteria from Oil Contaminated Soils. Advances in Biological Research, 4 (5): 249-252.
- Tambekar, D. H., S.P. Mundekar, S.P. and Bombode, V.B., (2013). Partial characterization and optimization of lipase production from *Bacillus cereus* isolated from haloalkaliphilic lonar lake. International Journal of Life science and Pharma Research, 2 (3): 249-256.
- Trần Quốc Hiền và Lê Văn Việt Mẫn, 2006. Nghiên cứu ứng dụng enzyme protease từ ruột cá Basa. Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ, 11: 27 - 42.
- Vương Bảo Thy., 2015. Nghiên cứu thu nhận enzyme tiêu hóa từ nội tạng cá tra. Luận án tiến sĩ kỹ thuật ngành Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- War, A.R., Paulraj, M.G., War, M.Y. and Ignacimuthu, S., 2011. Jasmonic acid-mediated induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Plant Growth Regulation, 30: 512–523.