

**MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA PHƯƠNG PHÁP *IN VIVO* VÀ *IN VITRO*
TRONG VIỆC XÁC ĐỊNH PROTEIN TIÊU HÓA TRONG THỨC ĂN
TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)**

**CORELATION BETWEEN *IN VIVO* AND *IN VITRO* METHODS TO DETERMINE THE
PROTEIN DIGESTIBILITY IN WHITE LEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) FEEDS**

Nguyễn Thị Lan Chi*, Nguyễn Văn Nguyễn, Lê Thị Lâm, Vũ Mai Hoa

Viện nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản II

Email: lanchiria2@yahoo.com.vn

ABSTRACT

Protein digestibility is an important indicator in quality assessment for aquafeed ingredients. Many *in vitro* assays have been developed for quick estimation of protein digestibility and replacement of feeding trials. pH stat, pH drop and pepsin digestibility with single/multi enzyme, one/two step digestion have been studied for mammals from 1970s. These methods have been found to correlate well with *in vivo* protein digestibility. However, to date, the application of *in vitro* assays for shrimp and fish is still not populated. Currently, Research Institute for Aquaculture No. 2 has performed a research on quick procedures evaluating protein digestibility of feeds for white leg shrimp. The objective of this research is to find a diagnosis tool to support authority departments in quality control of commercial aquafeeds. In the study, five *in vitro* methods (including pH drop with 3 or 4 enzyme, pH stat with 3 or 4 enzyme and pepsin digestibility) were investigated. The results showed that only the three-enzyme pH stat method was well correlated with *in vivo* technique ($R^2 = 0,6664$). The other methods had a low regression coefficient between *in vitro* and *in vivo* protein digestibility ($R^2 < 0,13$). However, the regression coefficient of the three-enzyme pH stat system is still not high for utilization. Therefore, it is necessary to conduct more experiments in order to increase the correlation and accuracy.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Những nghiên cứu về dinh dưỡng của vật nuôi thủy sản rất cần thiết trong ngành nuôi trồng thủy sản vì ảnh hưởng trực tiếp đến lợi nhuận. Hiệu quả cho ăn phụ thuộc vào kiến thức về cách vật nuôi tiêu hóa thức ăn. Trong nuôi trồng thủy sản, các thử nghiệm nuôi *in vivo* thường xác định giá trị dinh dưỡng của thức ăn khi đánh giá tốc độ tăng trưởng. Tuy nhiên, những phương pháp này chi phí rất cao, tốn nhiều thời gian và kết quả bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường. Phương pháp hóa học cổ điển dùng để xác định chất lượng protein là phương pháp Kjeldahl và phương pháp xác định thành phần acid amin. Các phản ứng trong các phương pháp này thường diễn ra trong điều kiện khắc nghiệt hơn so với điều kiện trong tiêu hóa tự nhiên của vật nuôi.

Ngày nay, các nhà khoa học rất quan tâm đến việc phát triển những phương pháp nhanh, nhưng cho kết quả tương đối tương đồng với độ tiêu hóa biểu kiến của vật nuôi. Các phương pháp *in vitro* dùng để đánh giá protein tiêu hóa là rất cần thiết. Bởi vì chúng thường nhanh và ít tốn kém hơn so với các phương pháp *in vivo*. Theo Dimes & Haard (1994), ban đầu, các phương pháp *in vitro* dựa trên khả năng thủy phân của các enzyme như pepsin (Sheffner et al., 1956), protease từ *Streptomyces griseus* (Ford & Salter, 1966), papain (Buchanan, 1969) hay trypsin (Maga et al., 1973). Sau đó, kỹ thuật đa enzyme tiêu hóa 1 giai đoạn như phương pháp 3 enzyme (trypsin, chymotrypsin, aminopeptidase của Hsu et al., 1977), phương pháp 4 enzyme (trypsin, chymotrypsin, aminopeptidase và protease từ *Streptomyces griseus* của Satterlee et al., 1979). Kỹ thuật 4 enzyme cho tương quan tốt với hiệu quả sử dụng protein (PER) cho cả protein thực vật và protein động vật. Tiêu hóa 2 giai đoạn sử dụng pepsin và một hay nhiều protease và/hoặc peptidase cũng đã được nghiên cứu (Thresher et al. 1989). Các phương pháp này tuy cho kết quả ổn định trên động vật máu nóng, nhưng để áp dụng cho động vật thủy sản vẫn còn là một vấn đề cần quan tâm.

Các nghiên cứu về đạm tiêu hóa trên động vật thủy sản chủ yếu được thực hiện nhằm khảo sát nguyên liệu. Năm 1997, Ezquerro et al. dùng phương pháp pH-stat để dự đoán tiêu hóa protein ở tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Tác giả sử dụng phương pháp pH-stat với 2 nguồn enzyme: enzyme tách chiết từ gan tụy tôm và hỗn hợp 4 enzyme thương mại để xác định mức độ thủy phân protein (DH), ước tính chất lượng protein trong bột cá mèi dầu, cá cơm, cá tuyết, bột phụ phẩm cá ngừ, bánh dầu đậu nành, bột tôm. Kết quả cho thấy có sự tương quan đáng kể giữa mức độ thủy phân protein DH và sự tiêu hóa protein biểu kiến APD. Hệ số tương quan $r^2 = 0,77$ đối với enzyme tách chiết từ gan tụy tôm và $r^2=0,71$ đối với enzyme thương mại.

Tương tự, năm 1998, Lazo et al. đã sử dụng phương pháp pH drop 1 enzyme (trypsin theo Lazo, 1994), 3 enzyme (trypsin, α -chymotrypsin và peptidase theo Hsu et al., 1977) và 4 enzyme (trypsin, α -chymotrypsin, peptidase và pronase E theo Satterlee et al., 1979) để ước tính protein tiêu hóa ở tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) trên các nguyên liệu như casein, gelatin, cám gạo, bột tôm, bánh dầu đậu nành, bột mì và một số loại bột cá. Kết quả cho thấy phương pháp 1 enzyme và 3 enzyme ít nhạy hơn so với phương pháp 4 enzyme khi phân biệt sự khác nhau về protein tiêu hóa giữa các thành phần nguyên liệu. Phương pháp 4 enzyme cho kết quả xếp loại nguyên liệu theo protein tiêu hóa tương tự như khi xác định APD bằng phương pháp *in vivo*. Tuy nhiên thí nghiệm sử dụng hỗn hợp 3 enzyme và 4 enzyme đã không cho thấy sự khác biệt về chất lượng giữa các loại bột cá.

Một nghiên cứu khác trên tôm thẻ chân trắng cũng đã được thực hiện bởi Lemos et al. (2009). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng ước lượng đạm tiêu hóa trên 26 mẫu nguyên liệu bằng phương pháp pH stat, sử dụng enzyme tách chiết từ khối gan tụy tôm. Kết quả nghiên cứu cho thấy ở những điều kiện khác nhau nhưng hệ số tương quan khá tương đồng nhau ($r^2 = 0,85 - 0,86$). Mối tương quan giữa DH% và APD là phương trình phi tuyến $y = (a+bx)/(1+cx+dx^2)$.

Với mục tiêu tìm kiếm một công cụ hỗ trợ cho công tác kiểm tra, đánh giá chất lượng đạm tiêu hóa trong thức ăn thủy sản, đề tài thực hiện khảo sát một số phương pháp *in vitro* (gồm: phương pháp pH drop 3 và 4 enzyme, pH stat 3 và 4 enzyme, phương pháp pepsin tiêu hóa), sau đó so sánh mối tương quan với phương pháp *in vivo* nhằm tìm ra phương pháp có tương quan gần nhất.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Thức ăn thủy sản dùng trong nghiên cứu là các loại thức ăn dùng cho nuôi tôm thẻ chân trắng, khá phổ biến trên thị trường do các công ty tại Việt Nam sản xuất như Uni-president, Tongwei, CJ-Vina và CP. Mỗi công ty thu từ 1 - 4 mẫu thức ăn có thành phần protein khác nhau.

Đối tượng nghiên cứu trong nuôi thử nghiệm *in vivo* là tôm nuôi thương phẩm (trọng lượng tôm từ 8–10g/con) được thu tại Trung tâm Quốc gia giống thủy hải sản Nam Bộ, Bà Rịa Vũng Tàu (Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II) sau khi kiểm tra không có mầm bệnh nguy hiểm.

Các enzyme trong khảo sát *in vitro* là các enzyme tinh khiết hoặc hỗn hợp enzyme được chiết tách từ vi sinh vật của các hãng Himedia (Ấn Độ), Sigma-Aldrich (Mỹ) và Novozyme (Đan Mạch): Pepsin tinh khiết, hoạt độ 1:10.000 (RM1251, Himedia); Trypsin từ tụy heo, loại IX-S, hoạt độ: 13.000 - 20.000 (T0303, Sigma-Aldrich); α -chymotrypsin từ tụy bò, loại II, hoạt độ: ≥ 40.000 (C4129, Sigma-Aldrich); Protease từ *Streptomyces griseus*, loại XIV, hoạt độ $\geq 3,5$ (P5147, Sigma-Aldrich); Protamex[®], Flavourzyme[®] 500mg và Neutrase[®] 0,8L (Novozyme).

Các thí nghiệm khảo sát *in vitro* được thực hiện từ tháng 05 đến tháng 11 năm 2012, chủ yếu tại phòng thí nghiệm Hóa sinh, Vi sinh và phòng thí nghiệm dinh dưỡng động vật nuôi thủy sản thuộc Trung tâm Công nghệ sau thu hoạch (Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II).

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu

Thức ăn thương mại thu được được xay mịn và sàng qua rây 0,5mm. Sau đó, trộn với 1% Cr₂O₃. Thêm khoảng 45 - 50% nước cất vào thức ăn, nhào và trộn đều cho đến khi thức ăn thành một hỗn hợp đặc, sệt, khi bóp nén lại thành cục. Sử dụng máy xay thịt Meat mincing machine TJ12-B để ép lại viên thức ăn, mặt sàng 2mm, ép nhiều lần nhằm tăng độ nén và độ bền của viên thức ăn. Sau đó, sấy khô ở 60°C trong 24 giờ, thỉnh thoảng mở cửa tủ sấy nhằm tạo sự thông thoáng và để không khí ẩm có thể thoát ra ngoài. Trong quá trình sấy, kiểm tra nhanh độ ẩm của viên thức ăn, nếu độ ẩm < 10% là đạt. Sau đó, thức ăn được cắt nhỏ thành viên có kích thước 5mm. Trước khi tiến hành nuôi thử nghiệm, thức ăn được đem phân tích độ ẩm, thành phần protein thô và hàm lượng Cr₂O₃.

Phương pháp pH drop 3 enzyme

Theo Hsu et al. (1977) và Lazo et al. (1998), phương pháp pH drop 3 enzyme được thực hiện như sau: cân mẫu chứa khoảng 6,25mg protein. Thêm 10ml nước cất vào các cốc, lắc đều trong 1 giờ, ở nhiệt độ phòng. Điều chỉnh pH dung dịch về pH 8,0 bằng NaOH 0,1N. Thêm 1,0ml hỗn hợp enzyme (1,6mg.ml⁻¹ trypsin + 3,1mg.ml⁻¹ chymotrypsin + 1,6mg.ml⁻¹ Flavourzyme® 500MG), lắc đều, đo lại pH sau 10 phút. Kết quả xác định độ tiêu hóa tương đối như sau:

$$\text{Độ tiêu hóa protein tương đối (RPD, \%)} = \frac{(-\Delta\text{pH mẫu})}{(-\Delta\text{pH casein})} * 100$$

Phương pháp pH drop 4 enzyme: (Satterlee et al., 1979; Lazo et al., 1998)

Chuẩn bị mẫu tương tự pH drop 3 enzyme. Sau đó, thêm 1,0ml dung dịch A (1,6mg.ml⁻¹ trypsin + 3,1mg.ml⁻¹ chymotrypsin + 1,6mg.ml⁻¹ Flavourzyme® 500MG), lắc đều trong 10 phút. Thêm 1,0ml dung dịch B (7,95mg.ml⁻¹ protease từ *Streptomyces griseus*), lắc đều và chuyển vào bể ủ nhiệt, ủ ở 55°C trong 9 phút. Lấy cốc ra để ở nhiệt độ phòng và ghi nhận giá trị pH sau 1 phút. Độ tiêu hóa tương đối được tính tương tự pH drop 3 enzyme.

Phương pháp pH stat 3 enzyme: (Pedersen & Eggum, 1983)

Cân mẫu thức ăn sao cho mẫu chứa 18,75mg protein. Thêm 30ml nước cất vào các cốc, lắc đều trong 1 giờ, ở nhiệt độ phòng. Điều chỉnh pH dung dịch về pH 8,0 bằng NaOH 0,1N. Thêm 3,0ml hỗn hợp 3 enzyme (1,6mg.ml⁻¹ trypsin + 3,1mg.ml⁻¹ chymotrypsin + 1,6mg.ml⁻¹ Flavourzyme® 500MG), lắc đều và duy trì pH của dung dịch ở pH 8,0 bằng cách thêm NaOH 0,1N từ máy chuẩn độ điện thế tự động Radiometer TritraLab 865, trong 3 giờ. Sau đó, ghi nhận lại thể tích NaOH 0,1N đã sử dụng.

$$\text{Độ thủy phân (DH, \%)} = B * N_B * 1/\alpha * 1/M_P * 1/h_{\text{tot}} * 100$$

Trong đó: B: thể tích NaOH 0,1N đã sử dụng (ml); N_B: Nồng độ đương lượng của NaOH (N); 1/α: Hệ số thủy phân của nhóm α -amin phụ thuộc pK amin ở điều kiện nhiệt độ và pH thực nghiệm; M_P: lượng protein trong phản ứng (%); 1/h_{tot}: tổng số liên kết peptide của các mẫu protein khác nhau (meq.g⁻¹).



Hình 1. Máy chuẩn độ điện thế tự động

Phương pháp pH stat 4 enzyme: (Ezquerria et al., 1997)

Thực hiện tương tự phương pháp pH stat 3 enzyme, tuy nhiên enzyme sử dụng là hỗn hợp 4 enzyme ($1,6\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ trypsin + $3,1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ chymotrypsin + $1,6\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Flavourzyme[®] 500MG + $7,95\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ protease từ *Streptomyces griseus*), thời gian phản ứng là 2 giờ. Kết quả xác định độ thủy phân (DH) được tính theo công thức như trong phương pháp pH stat 3 enzyme.

Phương pháp pepsin tiêu hóa: (Siccardi III, 2006; AOAC, 971.09)

Ban đầu mẫu được khử béo bằng cách chiết mẫu với ether dầu bằng Soxhlet.

Cân 0,5g mẫu đã khử béo, cho vào ống máy xay cùng với 150ml dung dịch pepsin 0,0002% (trong HCl 0,075N). Ủ ở 45°C , tốc độ xay: 15 vòng/phút, trong 16 giờ.

Sau khi ủ, để lắng, lọc bằng giấy lọc đã cân trọng lượng qua phễu buchner. Rửa lại 2 lần với acetone, mỗi lần 15 mL acetone.

Xác định protein thô trên cặn thu được (Protein thô của cặn không tiêu hóa).



Hình 2. Máy xay ủ mẫu trong xác định pepsin tiêu hóa

$$\text{Protein tiêu hóa (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{Protein thô cặn thu được} \times 100}{\text{Protein thô của mẫu}} \right)$$

Nếu xem xét hàm lượng Nitơ phi protein:

$$\text{Protein tiêu hóa (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{Protein thô cặn thu được} \times 100}{\text{Protein thô của mẫu} - (\text{Nitơ phi protein} \times 6,25)} \right)$$

Quy trình nuôi thử nghiệm in vivo

Chọn tôm thí nghiệm có kích cỡ đồng đều (8 – 10g), khỏe mạnh, còn đầy đủ râu, bơi lội nhanh nhẹn. Tôm được bố trí vào 30 bể kính có đánh số, mật độ 10 con/bể, thể tích bể 120 lít, thể tích chứa nước 70 lít, nước nuôi tôm có độ mặn 18‰. Thử nghiệm bao gồm 10 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Trước khi thí nghiệm tôm được nuôi dưỡng trong vòng một tháng để thích nghi với môi trường, cho ăn cùng một loại thức ăn thương mại. Sau đó tập cho tôm ăn thức ăn thí nghiệm trong vòng 3 ngày rồi mới tiến hành thu phân.

Khi tiến hành thử nghiệm cho tôm ăn 03 lần/ngày, cho ăn 4 - 6% trọng lượng thân, lượng thức ăn được điều chỉnh sao cho tôm ăn hết tránh để thức ăn còn dư trong bể. Sau 45 phút cho ăn kiểm tra lại lượng thức ăn đã cho ăn. Sau đó, tiến hành siphong những cặn không phải là phân trong bể để chuẩn bị thu phân, ngày thu phân 2 lần. Tôm được nuôi tới khi thu đủ phân thí nghiệm.

Hệ thống sục khí hoạt động liên tục suốt ngày đêm. Hệ thống lọc nước chỉ được sử dụng vào ban đêm. Định kỳ một tuần thay nước một lần, thay khoảng 50% thể tích nước của bể.

Trong thời gian thí nghiệm các chỉ tiêu môi trường như: pH, t° , DO, N-NH_3 , N-NO_2^- được theo dõi thường xuyên: pH, nhiệt độ đo mỗi ngày 1 lần; DO, N-NH_3 , N-NO_2^- đo mỗi tuần 1 lần.

Phân thu được được bảo quản ở -20°C cho đến khi tiến hành sấy đông khô. Sau khi sấy đông khô, phân được đem xác định độ ẩm, protein thô và hàm lượng Cr_2O_3 .

$$\text{Độ tiêu hóa protein khả kiến APD (\%)} = 100 - \left[\frac{\% Cr_2O_3 \text{ thức ăn}}{\% Cr_2O_3 \text{ phân}} \times \frac{\% \text{PROTEIN phân}}{\% \text{PROTEIN thức ăn}} \times 100 \right]$$

Phương pháp phân tích

- Hàm lượng protein thô được xác định theo TCVN 4328-1:2007.
- Hàm lượng lipid thô được xác định theo TCVN 4331:2001.
- Hàm lượng tro được xác định theo TCVN 4327:2007.
- Độ ẩm được xác định theo TCVN 4326:2001.
- Hàm lượng Nitơ phi protein xác định theo TCVN 8801:2011.
- Hàm lượng Cr_2O_3 được xác định theo phương pháp của Furukawa & Tsukahara, 1966.
- Hàm lượng $N-NO_2^-$ xác định theo phương pháp APHA 2005.4500. NO_2^- -B.
- Hàm lượng $N-NH_3$ xác định theo phương pháp APHA 2005.4500. NH_3 F.
- Hoạt độ peptidase được xác định theo phương pháp của Sigma-Aldrich.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát enzyme thay thế peptidase từ màng nhầy ruột heo P7500 (Sigma-Aldrich, 40 units/g)

Tiến hành khảo sát hoạt độ các enzyme thay thế peptidase từ màng nhầy ruột heo P7500 (Sigma-Aldrich, 40 units.g⁻¹), gồm các chế phẩm enzyme như: Protamex[®], Flavourzyme[®] 500mg và Neutralse[®] 0,8L (Novozyme).

Bảng 1. Kết quả xác định hoạt độ peptidase của một số enzyme thay thế

Enzyme	Hoạt độ (units.g ⁻¹ enzyme)
Protamex [®]	0,003
Flavourzyme [®] 500mg	31,9 ± 1,6
Neutralse [®] 0,8L	0

Từ bảng trên có thể thấy trong ba enzyme được chọn khảo sát, chỉ có sản phẩm Flavourzyme[®] 500mg có hoạt độ peptidase (31,9 ± 1,6 units.g⁻¹ enzyme), hai sản phẩm còn lại gần như không phát hiện. Theo Hsu et al. (1977) và Navarrete del Toro & García-Carreño (2002), peptidase từ màng nhầy ruột heo dùng trong phương pháp pH drop hay pH stat có hoạt độ khoảng 40 units.g⁻¹ enzyme. Như vậy, sản phẩm Flavourzyme[®] 500mg có hoạt độ tương đương và có thể dùng làm enzyme thay thế peptidase P7500 (Sigma-Aldrich) trong các phương pháp pH drop hay pH stat khi xác định độ tiêu hóa và độ thủy phân protein.

Kết quả phân tích thành phần dinh dưỡng trong các mẫu thức ăn được khảo sát

Trong 10 mẫu thức ăn tôm thẻ chân trắng được khảo sát, tất cả các mẫu đều có protein thô > 44% (từ 44,22 – 47,47%). Hàm lượng lipid thô từ 6,73 – 8,21%. Tro thô từ 10,93 – 13,80%. Hàm lượng xơ thô từ 1,61 – 3,46%. Khi xét hàm lượng Nitơ phi protein, hàm lượng dao động từ 8,13 – 9,49%, thay đổi không phụ thuộc hàm lượng protein thô.

Bảng 2. Thành phần dinh dưỡng của thức ăn tôm thẻ chân trắng được khảo sát

Thức ăn	Ẩm (%)	Protein (% (%, VCK)	Lipid (% (%, VCK)	Tro (% (%, VCK)	Xơ (% (%, VCK)	NPP (% (%, VCK)
TT A0 (40%)	8,81 ± 0,04	46,09 ± 0,43	7,24 ± 0,04	13,49 ± 0,05	2,65 ± 0,03	9,18 ± 0,02
TT A4 (40%)	8,12 ± 0,03	46,51 ± 0,26	7,15 ± 0,25	11,54 ± 0,11	1,61 ± 0,02	8,74 ± 0,02
TT A5 (38%)	8,50 ± 0,04	46,10 ± 0,35	7,41 ± 0,20	10,93 ± 0,02	2,67 ± 0,04	8,31 ± 0,04
TT B1 (40%)	8,89 ± 0,03	47,47 ± 0,08	8,21 ± 0,03	13,74 ± 0,02	2,49 ± 0,03	8,62 ± 0,02
TT B3 (40%)	9,88 ± 0,06	46,76 ± 0,25	8,09 ± 0,10	13,80 ± 0,07	2,34 ± 0,03	9,37 ± 0,01
TT B4 (38%)	9,67 ± 0,02	46,51 ± 0,17	7,47 ± 0,04	13,36 ± 0,01	3,16 ± 0,01	8,30 ± 0,02
TT C3 (40%)	7,71 ± 0,05	45,40 ± 0,16	7,87 ± 0,06	11,32 ± 0,03	3,19 ± 0,04	8,65 ± 0,02
TT C4 (38%)	8,62 ± 0,02	44,52 ± 0,04	8,01 ± 0,13	11,12 ± 0,03	2,06 ± 0,05	8,13 ± 0,01
TT C4Plus (40%)	7,48 ± 0,05	46,10 ± 0,51	7,03 ± 0,12	11,33 ± 0,04	2,66 ± 0,04	9,49 ± 0,01
TT D3 (40%)	8,92 ± 0,01	44,22 ± 0,06	6,73 ± 0,36	13,74 ± 0,03	3,46 ± 0,06	8,43 ± 0,03

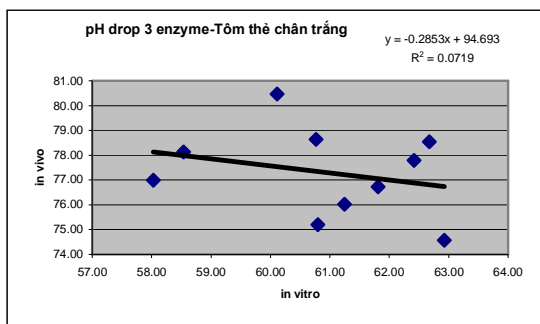
Đánh giá phương pháp *in vitro* xác định độ tiêu hóa protein trong thức ăn tôm thẻ chân trắng bằng thử nghiệm *in vivo*

Trong thời gian nuôi thử nghiệm các yếu tố môi trường đều nằm trong khoảng rất thuận lợi cho sự sinh trưởng của tôm, trong đó nhiệt độ từ 26,2 – 28,5°C; pH: 7,2 – 8,3; DO: 6,3 – 7,3 mg.l⁻¹; NH₃: 0,002 – 0,180 mg.l⁻¹; NO₂: 0,003 – 0,019 mg.l⁻¹. Nguyên nhân là do quá trình chăm sóc quản lý tốt, sử dụng hệ thống sục khí liên tục, kết hợp với sử dụng hệ thống lọc nước vào ban đêm, đồng thời do thí nghiệm tiến hành thu phân nên trong bể nuôi tôm hầu như không có nhiều các chất cặn như thức ăn dư hay vỏ tôm lột xác.

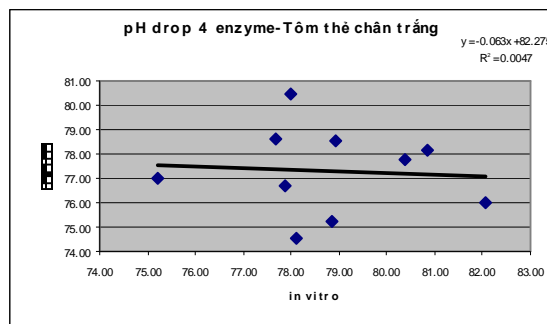
Mối tương quan giữa phương pháp *in vitro* và phương pháp *in vivo* được thể hiện trong bảng 3 và trong các hình 3 - 8.

Khi so sánh giữa phương pháp pH drop 3 enzyme và phương pháp pH drop 4 enzyme, cho thấy có sự khác biệt đáng kể. Kết quả độ tiêu hóa protein tương đối thu được từ phương pháp pH drop 4 enzyme luôn cao hơn so với phương pháp pH drop 3 enzyme.

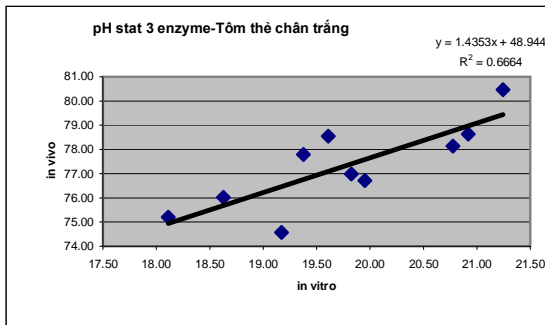
So sánh giữa phương pháp pH stat 3 enzyme và phương pháp pH stat 4 enzyme, cho thấy có sự khác biệt đáng kể. Kết quả độ tiêu hóa protein tương đối thu được từ phương pháp pH stat 4 enzyme luôn cao hơn so với phương pháp pH stat 3 enzyme.



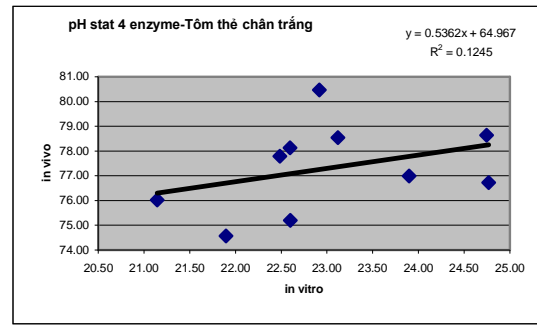
Hình 3. Mối tương quan giữa phương pháp pH drop 3 enzyme và phương pháp *in vivo*



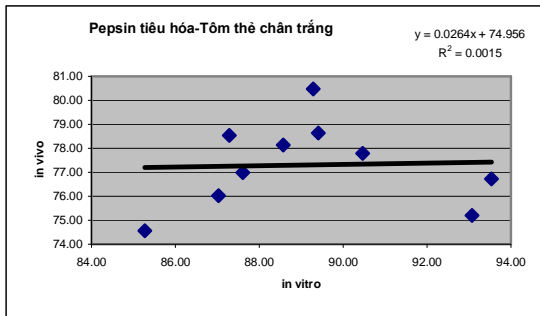
Hình 4. Mối tương quan giữa phương pháp pH drop 4 enzyme và phương pháp *in vivo*



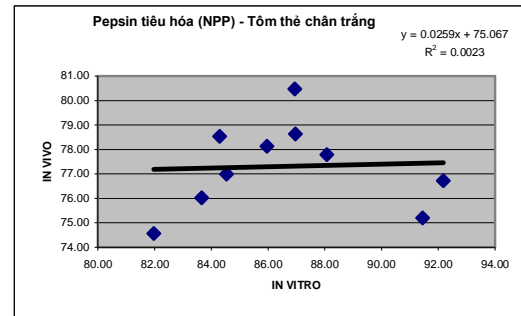
Hình 5. Mối tương quan giữa phương pháp pH stat 3 enzyme và phương pháp *in vivo*



Hình 6. Mối tương quan giữa phương pháp pH stat 4 enzyme và phương pháp *in vivo*



Hình 7. Mối tương quan giữa phương pháp pepsin tiêu hóa và phương pháp *in vivo*



Hình 8. Mối tương quan giữa phương pháp pepsin tiêu hóa có xét đến hàm lượng nitơ phi protein và phương pháp *in vivo*

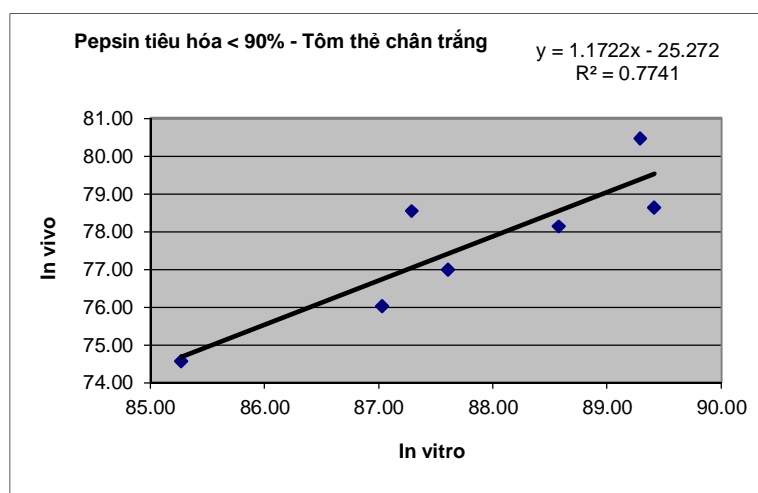
Kết quả giữa phương pháp pepsin tiêu hóa có và không có tính hàm lượng nitơ phi protein cho thấy không khác biệt đáng kể. Nếu tính đến hàm lượng nitơ phi protein thì kết quả protein tiêu hóa luôn thấp hơn so với khi không tính hàm lượng nitơ phi protein.

Kết quả đánh giá các phương pháp *in vitro* dựa trên mối tương quan giữa phương pháp *in vitro* và phương pháp *in vivo* cho thấy hệ số tương quan của 5 phương pháp (pH drop 3 enzyme, pH drop 4 enzyme, pH stat 4 enzyme, pepsin tiêu hóa và pepsin tiêu hóa có tính NPP) đều thấp $R^2 < 0,13$. Chỉ có phương pháp pH stat 3 enzyme cho hệ số tương quan tương đối ($R^2 = 0,6664$).

Riêng đối với phương pháp pepsin tiêu hóa, có thể nhận thấy khi độ tiêu hóa *in vitro* $< 90\%$ thì các mẫu khá tuyến tính ($R^2 = 0,7741$). Tuy nhiên, khi protein tiêu hóa *in vitro* $> 90\%$ thì APD lại bắt đầu giảm chứ không tăng theo. Như vậy, có thể phương pháp pepsin tiêu hóa chỉ thích hợp xác định độ tiêu hóa protein đối với những mẫu có protein tiêu hóa *in vitro* $< 90\%$. Cần thiết xác định trên nhiều mẫu hơn nữa để có thể khẳng định điều này.

Bảng 3. Bảng so sánh kết quả xác định độ tiêu hóa protein bằng phương pháp *in vitro* và *in vivo*

Thức ăn	pH drop (RPD, %)		pH stat (DH, %)		Pepsin tiêu hóa (%)		Độ tiêu hóa biểu kiến APD (%)
	Hệ 3 enzyme	Hệ 4 enzyme	Hệ 3 enzyme	Hệ 4 enzyme	Không tính NPP	Tính NPP	
TT A0	58,03 ± 0,59	75,21 ± 1,89	19,83 ± 0,53	23,90 ± 1,15	87,61 ± 0,61	84,53 ± 0,76	76,99 ± 0,51
TT A4	60,77 ± 1,18	77,69 ± 0,60	20,92 ± 1,35	24,74 ± 0,46	89,41 ± 0,75	86,96 ± 0,92	78,64 ± 0,64
TT A5	60,11 ± 0,00	78,01 ± 2,12	21,25 ± 1,78	22,92 ± 0,18	89,29 ± 0,75	86,94 ± 0,92	80,47 ± 1,01
TT B1	58,54 ± 1,18	80,83 ± 1,09	20,78 ± 0,62	22,60 ± 1,39	88,57 ± 1,06	85,96 ± 1,30	78,13 ± 1,96
TT B3	62,42 ± 3,08	80,37 ± 1,32	19,38 ± 2,11	22,49 ± 2,38	90,47 ± 0,96	88,07 ± 1,20	77,79 ± 0,72
TT B4	61,81 ± 3,63	77,86 ± 2,36	19,95 ± 0,56	24,77 ± 1,52	93,53 ± 0,39	92,17 ± 0,47	76,72 ± 1,60
TT C3	60,80 ± 2,10	78,85 ± 1,05	18,11 ± 0,14	22,60 ± 0,14	93,07 ± 2,69	91,44 ± 3,33	75,20 ± 0,58
TT C4	62,92 ± 3,00	78,11 ± 1,84	19,17 ± 2,32	21,90 ± 0,84	85,27 ± 1,31	81,98 ± 1,61	74,57 ± 0,55
TT C4Plus	61,25 ± 0,00	82,05 ± 1,05	18,63 ± 1,17	21,14 ± 1,15	87,03 ± 1,14	83,66 ± 1,44	76,02 ± 0,34
TT D3	62,67 ± 1,77	78,94 ± 0,80	19,61 ± 1,72	23,12 ± 0,69	87,29 ± 0,72	84,29 ± 0,89	78,54 ± 3,49
Hệ số tương quan (R ²)	0,0719	0,0047	0,6664	0,1245	0,0015	0,0023	
Phương trình hồi quy	y = -0,2853x + 94,693	y = -0,063x + 82,275	y = 1,4353x + 48,944	y = 0,5362x + 64,967	y = 0,0264x + 74,956	y = 0,0259x + 75,067	



Hình 9. Mối tương quan giữa phương pháp pepsin tiêu hóa (< 90%) và phương pháp *in vivo*

Hiện nay, trên thế giới vẫn chưa có phương pháp chuẩn xác định độ tiêu hóa protein trong thức ăn thủy sản, chỉ có phương pháp pepsin tiêu hóa AOAC 971.09 là phương pháp xác định đạm tiêu hóa trong các loại nguyên liệu có nguồn gốc động vật, mà chủ yếu là bột cá. Sở dĩ như vậy vì thức ăn hoàn toàn khác với nguyên liệu. Thức ăn là một hỗn hợp, bao gồm cả nguyên liệu có nguồn gốc động vật, thực vật, một số nhà máy còn bổ sung đạm thủy phân với mục đích tăng tính hấp dẫn. Thành phần thức ăn thì vô cùng đa dạng, các nhà máy sử dụng rất nhiều các loại nguyên liệu khác nhau, mỗi loại nguyên liệu lại có nhiều nguồn gốc khác nhau (ví dụ như bột cá Peru có chất lượng hoàn toàn khác với bột cá sản xuất trong nước). Công thức phối trộn thức ăn cũng khác nhau ở từng nhà máy, từng thời điểm. Chính vì sự phối trộn đa dạng của thức ăn làm cho nền mẫu thức ăn vô cùng phức tạp. Ngoài ra, khả năng tiêu hóa của vật nuôi còn phụ thuộc rất nhiều vào môi trường, độ tuổi và sức khỏe. Chính vì những điều đó mà hiện nay vẫn chưa có một phương pháp nào được xem là phương pháp chuẩn để đánh giá độ tiêu hóa protein trong thức ăn thủy sản. Đã có rất nhiều nghiên cứu phát triển phương pháp *in vitro* xác định nhanh protein tiêu hóa nhằm thay thế phương pháp nuôi thử nghiệm *in vivo*. Tuy nhiên, mối tương quan cao nhất giữa các kết quả thu được từ phương pháp *in vivo* và *in vitro* chỉ có được khi so sánh riêng biệt nguồn gốc của nguồn đạm là đạm động vật hay đạm thực vật. Trong những mẫu bao gồm luôn cả đạm động vật và đạm thực vật thì những phương pháp *in vitro* sử dụng enzyme cho kết quả chỉ có tính tương đối (Pedersen & Eggum, 1983).

Khi khảo sát, đánh giá các phương pháp *in vitro* trên thức ăn tôm thẻ chân trắng, kết quả thu được chỉ có phương pháp pH stat 3 enzyme cho mối tương quan đáng kể ($R^2 = 0,6664$), những phương pháp còn lại cho hệ số tương quan thấp ($R^2 < 0,13$). Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Pedersen & Eggum (1983) khi 2 tác giả này xem xét mối tương quan giữa các phương pháp *in vitro* và *in vivo* trên mẫu thực phẩm. Kết quả nghiên cứu của Pedersen & Eggum cho thấy phương pháp pH stat 3 enzyme có mối tương quan với phương pháp *in vivo* cao hơn so với phương pháp pH drop 3 và 4 enzyme và phương pháp pH stat 4 enzyme ($R^2 = 0,94$). Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của đề tài cho thấy hệ số tương quan của phương pháp pH stat 3 enzyme vẫn còn khá thấp, cần thực hiện nhiều thử nghiệm hơn nữa. Theo ý kiến của một số nhà nghiên cứu dinh dưỡng trên thế giới, các phương pháp *in vitro* dùng trong xác định protein tiêu hóa của thức ăn thủy sản chỉ có tính tương đối, không thể đưa ra một giá trị chính xác mà giá trị này có thể phân biệt được chất lượng giữa các mẫu thức ăn có chất lượng tốt. Tuy nhiên, các phương pháp này có thể sử dụng xác định đâu là mẫu thức ăn có chất lượng rất xấu so với các mẫu thức ăn có chất lượng tốt. Đây cũng là một cách tiếp cận cần xem xét thực hiện.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Qua các kết quả nghiên cứu thu được, hiện đề tài có thể đi đến một số kết luận sau:

Kết quả xác định độ tiêu hóa protein và độ thủy phân bằng các phương pháp pH drop 3 và 4 enzyme, pH stat 3 và 4 enzyme trên thức ăn tôm thẻ chân trắng cho thấy có sự khác biệt đáng kể giữa các phương pháp. Tuy nhiên, đối với phương pháp pepsin tiêu hóa, việc tính hay không tính đến hàm lượng Nitơ phi protein lại không khác biệt đáng kể.

Khi xem xét mối tương quan giữa phương pháp *in vitro* và phương pháp *in vivo* trên thức ăn tôm thẻ chân trắng, chỉ có phương pháp pH stat 3 enzyme cho mối tương quan đáng kể ($R^2 = 0,6664$), những phương pháp còn lại cho hệ số tương quan thấp ($R^2 < 0,13$). Tuy nhiên, để áp dụng trong thực tế nhằm kiểm soát chất lượng thức ăn, hệ số tương quan của phương pháp pH stat 3 enzyme còn tương đối thấp, cần tăng số lượng mẫu khảo sát nhằm tăng mức độ tương quan, độ chính xác và độ tin cậy của phương pháp.

Đối với phương pháp pepsin tiêu hóa, khi xét những mẫu có độ tiêu hóa *in vitro* < 90%, mối tương quan giữa *in vitro* và *in vivo* khá tuyến tính ($R^2 = 0,7741$). Đây cũng là trường hợp cần xem xét khi tăng số lượng mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dimes, L. E. & Haard, N. F., 1994. Estimation of protein digestibility – I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 108A: 349 – 362.
- Ezquerro, J. M., Garcia-Carreno, F. L., Civera, R., Haard, N. F., 1997. pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 157: 251 – 262.
- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D., Miller, G. A., 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science* 42(5): 1269 – 1271.
- Lazo, J. P., Romaine, R. P., Reigh, R. C., 1998. Evaluation of three *in vitro* enzyme assays for estimating protein digestibility in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 29 (4): 441 – 450.
- Lemos, D., Lawrence, A.L., Siccardi III, A.J., 2009. Prediction of apparent protein digestibility of ingredients and diets by *in vitro* pH-stat degree of protein hydrolysis with species-specific enzymes for juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 295: 89 – 98.
- Navarrete del Toro, M. A. & García-Carreño, F. L., 2002. Evaluation of the progress of protein hydrolysis. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* B2.2.1-B2.2.14.
- Pedersen, B. & Eggum, B. O., 1983. Prediction of protein digestibility by an *in vitro* enzymatic pH-stat procedure. *Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde* 49 (1-5): 265 – 277.
- Satterlee, L. D., Marshall, H. F., Tennyson, J. M., 1979. Measuring protein quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 56 (3): 103-109.
- Siccardi III, A. J., 2006. Daily digestible protein and energy requirements for growth and maintenance of sub-adult Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *A Dissertation for Doctor of Philosophy (Major subject: Nutrition)*. Texas A & M University.
- Sigma-Aldrich, 1993. Enzymatic assay of peptidase.