

ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ ENZYME VÀ THỜI GIAN ĐẾN QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN SỤN CÁ MẬP (*Carcharhinus dussumieri*)

EFFECTS OF THE ENZYME CONCENTRATION AND HYDROLYSIS TIME TO THE PROCESS OF SHARK CARTILAGE (*Carcharhinus dussumieri*) HYDROLYSIS

Đình Hữu Đông¹, Vũ Ngọc Bội², Nguyễn Thị Mỹ Trang²

¹ Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm Tp. HCM

² Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: Vũ Ngọc Bội (Email: boivn@ntu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 06/05/2020; Ngày phân biện thông qua: 18/05/2020; Ngày duyệt đăng: 12/06/2020

TÓM TẮT

Bài báo này công bố kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến quá trình thủy phân sụn cá mập (*Carcharhinus dussumieri*) bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ enzyme và thời gian thủy phân có ảnh hưởng mạnh đến hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa, chondroitin sulphate và N_{NH_3} tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập là 0,3%. Sau 10h thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với nồng độ enzyme 0,3%, nhiệt độ thủy phân 50°C, thủy phân ở pH tự nhiên (6,8), khối lượng mẫu 2kg và tỷ lệ nước bổ sung 2 lít, dịch thủy phân có hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa, chondroitin sulphate và N_{NH_3} cao gấp 7,06 lần, 3,68 lần, 9,01 lần, 83,42 lần và 1,27 lần so với ban đầu.

Từ khóa: hỗn hợp alcalase - papain, protein, peptide, Naa, N_{NH_3} , chondroitin sulphate, sụn cá mập, thủy phân.

ABSTRACT

This paper focused on the research to determine the effect of the enzyme concentration on hydrolyzing shark cartilage (*Carcharhinus dussumieri*) by the alcalase-papain enzyme mixture. The results showed that the enzyme concentration and hydrolysis time strongly affected the content of soluble proteins, peptides, Naa, chondroitin sulphate, and N_{NH_3} formed in shark cartilage hydrolyzate. The results also indicated that the alcalase-papain enzyme mixture concentration of 0.3% was suitable for shark cartilage hydrolysis. After 10 hours of shark cartilage hydrolysis by alcalase-papain enzyme mixture at concentration of 0.3%, temperature of 50°C, natural pH (6.8), sample weight of 2 kilograms and the additional water ratio of 2 liters, the hydrolyzate had the content of protein, peptide, Naa, chondroitin sulphate, and N_{NH_3} higher than 7.06 times, 3.68 times, 9.01 times, 83.42 times and 1.27 times higher than that in the original.

Key words: mixture of alcalase-papain enzyme, protein, peptide, Naa, N_{NH_3} , chondroitin sulphate, shark cartilage, hydrolysis.

I. MỞ ĐẦU

Từ xưa người ta đã biết sụn cá mập có khả năng làm sáng mắt, khả năng ức chế sự hình thành các vi mao mạch tân sinh nên có thể hạn chế các khối u, có khả năng ức chế hệ miễn dịch nên giúp giảm nhẹ các chứng miễn dịch như đau nhức xương, vẩy nến, ... [5]. Sụn cá mập có chứa chondroitin sulfat là thành phần chiếm tỷ lệ chính tạo nên cấu trúc của mô sụn, hoạt dịch bao quanh khớp, giúp bôi trơn sụn khớp [6]. Do vậy, sụn cá mập còn thường được điều chế

thành các loại thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp và mắt [6]. Tuy vậy, mô sụn nói chung và sụn cá mập nói riêng thường được cấu trúc bởi các protein không tan trong nước nên con người rất khó hấp thụ các chất từ mô sụn [3, 5, 6, 7, 10]. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu thu nhận các chất tự nhiên từ sụn cá mập bằng phương pháp thủy phân sụn cá mập tươi bằng phương pháp thủy phân sử dụng enzyme protease và thu dịch thủy phân định hướng cho việc sử dụng làm thực phẩm

hỗ trợ phòng chống thoái hóa sụn khớp. Trong bài báo này, chúng tôi tiếp tục công bố nghiên cứu về ảnh hưởng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain và thời gian thủy phân đến quá trình thủy phân sụn cá mập.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên vật liệu

1.1. Sụn cá mập:

Cá mập trắng (*Carcharhinus dussumieri*



Hình 1. Hình ảnh về sụn cá mập (*Carcharhinus dussumieri*) đã xử lý.

1.2. Enzym alcalase

Enzym alcalase 2.4L là chế phẩm protease thương mại do hãng Novozyme - Đan Mạch cung cấp. Alcalase thuộc nhóm enzyme serine endopeptidase có các đặc tính kỹ thuật như sau: pH thích hợp trong khoảng 6 - 8, nhiệt độ thích hợp 30 - 65°C, hoạt tính 2,4AU/g được bảo quản ở 0 - 5°C.

1.3. Enzym papain: Papain thương mại có hoạt tính $\geq 2,0$ mAnsonU/mg (cơ chất hemoglobine, pH 6, nhiệt độ 35,5°C) do Merck - Đức sản xuất. Papain là một enzyme chịu được nhiệt độ tương đối cao. Ở dạng nhựa khô, papain không bị biến tính trong 3 giờ ở 100°C, còn ở dạng dung dịch, papain bị mất hoạt tính sau 30 phút ở 82,5°C. Papain có pH thích hợp 4,5 - 8,5, dễ bị biến tính ở pH < 4,5 và ở pH > 12.

(Muller & Henle, 1839)) được thu mua nguyên con tại các tàu khai thác tại vùng biển Khánh Hòa. Cá tươi có trọng lượng trung bình 40-60kg/con. Cá mập được khai thác trong thời gian từ tháng 3÷7 và tháng 9÷12 hàng năm. Sau thu mua, thu toàn bộ vây cá, sụn cá và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Tại phòng thí nghiệm, tiến hành xử lý loại bỏ thịt, mô liên kết, làm sạch, cấp đông và bảo quản đông ở -20°C để dùng trong suốt quá trình nghiên cứu.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Các phương pháp phân tích:

* **Định lượng Nitơ axit amin (N_{aa}):** theo TCVN 3708-1990 Thủy sản- Phương pháp xác định hàm lượng Nitơ amin.

* **Định lượng Nitơ ammoniac (N_{NH_3}):** theo TCVN 3706-1990 Thủy sản – Phương pháp xác định hàm lượng Nitơ ammoniac.

* **Xác định hoạt độ protease theo phương pháp Anson [1, 2, 9]**

Nguyên tắc của phương pháp: dùng protein casein làm cơ chất xác định hoạt độ thủy phân protein của enzyme protease trên cơ sở định lượng sản phẩm được tạo thành trong phản ứng bằng phản ứng màu với thuốc thử Folin - Ciocalteau. Dựa vào đồ thị chuẩn tyrosine để định lượng tương ứng với lượng sản phẩm tạo

thành dưới tác dụng của enzyme.

- Định lượng protein hòa tan theo phương pháp Lowry [1, 9]:

Nguyên tắc của phương pháp là các axit amin có vòng thơm, Tyr và Trp có mặt trong protein sẽ phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu tạo thành phức chất màu xanh đen có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 650nm. Dựa vào đường chuẩn protein người ta có thể định lượng hàm lượng protein.

- Xác định hàm lượng peptid [1]: hàm lượng peptid được định lượng dựa vào đường chuẩn tyrosine. Lấy 1g mẫu thủy phân, cho thêm 9ml nước cất sau đó khuấy đều trong khoảng 5 ÷ 10 phút rồi ly tâm lấy dịch trong để xác định hàm lượng peptid như sau: lấy 2 ống nghiệm sạch 1 ống thí nghiệm và một ống đối chứng. Ống thí nghiệm: hút chính xác 2ml dung dịch lọc ở trên cộng với 2ml Trichloacetic acid (TCA) 20% để 30 phút rồi lọc qua giấy lọc thu dịch lọc. Lấy một ống nghiệm sạch cho vào 1ml dịch lọc + 5ml dung dịch Na₂CO₃ 0,4 M lắc đều, rồi cho vào 1ml Folin để 20 phút so màu ở bước sóng 660 nm. Ống đối chứng: lấy

1ml dung dịch TCA 10% + 5ml Na₂CO₃ 0,4 M + 1ml folin để 20 phút đem so màu. Tính kết quả: dựa vào đường chuẩn để tính lượng tyrosin tương ứng.

Hàm lượng peptid được tính theo công thức:

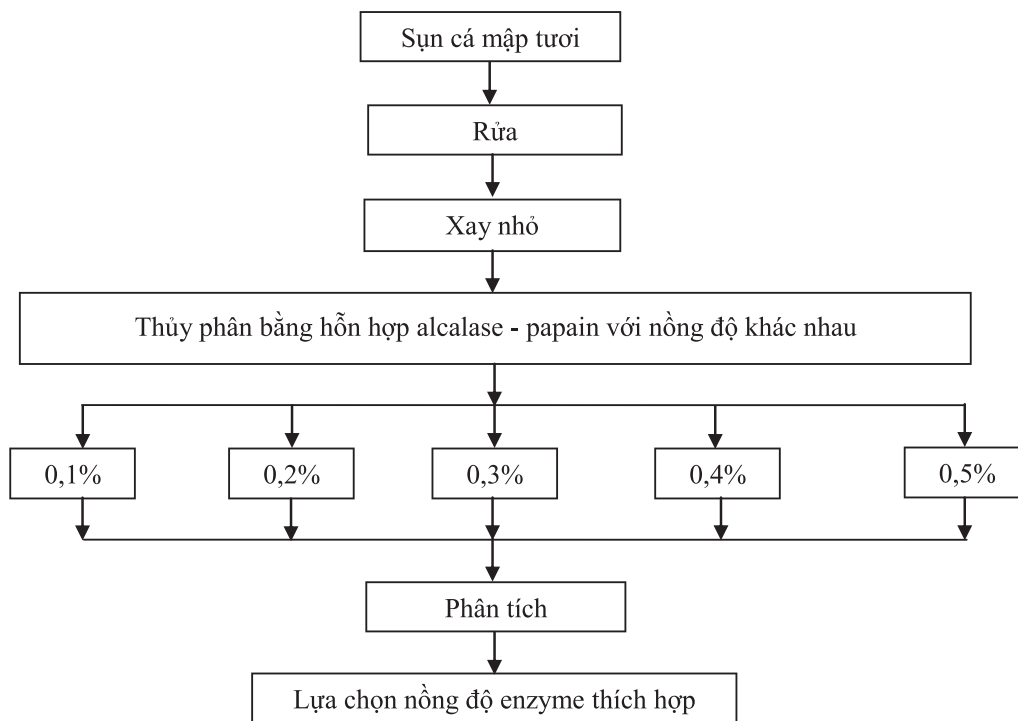
$$Peptid (mg/ml) = \frac{mg \text{ tyrosine}}{ml \text{ mẫu}} * độ \text{ pha loãng}$$

2.2. Phương pháp định lượng chondroitin sulfate (CS) bằng phương pháp so màu theo Farndale và cộng sự [8]

Nguyên lý: Dựa trên sự thay đổi trong quang phổ hấp thụ của DMMB (1,9 Dimethylmethylene) khi tác dụng với chondroitin sulfate (glycosaminoglycan sulfate) ở bước sóng 525nm. Dựa vào đường chuẩn của chondroitin sulfate A (gốc sulfate gắn ở vị trí C-4 (chondroitin-4-sulfate), CS4) với DMMB để xác định hàm lượng chondroitin sulfate. Phương pháp này có độ nhạy cao, có thể định tính và định lượng hàm lượng CS ở mức µg.

2.3. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Bố trí thí nghiệm để xác định nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain thủy phân sụn cá mập được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Sơ đồ thí nghiệm xác định nồng độ hỗn hợp alcalase-papain thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập.

Vi sụn cá mập đã xử lý, được rã đông, rửa, xay nhỏ bằng máy xay và được sử dụng để làm nguyên liệu nghiên cứu thủy phân bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain. Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với nồng độ của hỗn hợp enzyme khác nhau: mẫu 1: 0,1%, mẫu 2: 0,2%, ..., mẫu 5: 0,5%. Các mẫu thủy phân đều sử dụng 2kg hỗn hợp sụn cá mập, tỷ lệ alcalase/papain trong hỗn hợp 60/40, lượng nước bổ sung là 2 lít, thủy phân ở pH tự nhiên của hỗn hợp sụn cá mập (pH 6,8) và nhiệt độ thủy phân 50°C. Sau các khoảng thời gian: 0h, 2h, 4h, 6h, 8h và 10 giờ thủy phân, tiến hành lấy mẫu dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng protein hòa tan, hàm lượng peptid, hàm lượng N_{aa} , N_{NH_3} và hàm lượng chondroitin sulphate tạo thành. Kết quả đánh giá là cơ sở để lựa chọn nồng độ hỗn hợp enzyme thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập.

2.4. Thiết bị và hóa chất

- Thiết bị: sử dụng các thiết bị hiện có tại Trung tâm Thí nghiệm Thực hành – Trường Đại học Nha Trang và Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm - TP. HCM: Máy so màu UV-VIS DR6000 - Hach (Mỹ); Bể ổn nhiệt MEMMERT WNB14 - Đức, Máy ly tâm lạnh

tốc độ cao HERMLE Z36HK - Đức, Hệ thống phân tích hàm lượng nitro/protein theo phương pháp Dumas (Đức), Bồn nước điều nhiệt Memmert WNB22 (Đức), nồi thủy phân dung tích 30 lít (Việt Nam),...

- Các hóa chất sử dụng trong thí nghiệm đều là hoá chất tinh khiết do hãng Merck - Đức cung cấp.

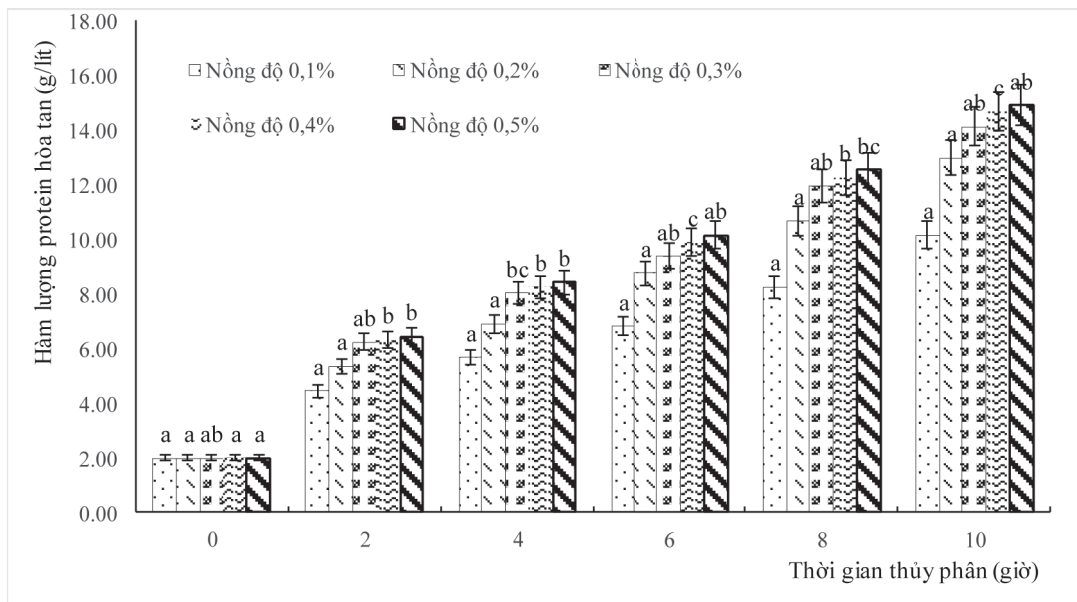
2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm đều tiến hành lặp lại 3 lần độc lập và số liệu là kết quả trung bình của các lần thí nghiệm. Kiểm tra sự khác biệt giữa các số liệu thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVII trial.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng thời gian thủy phân và nồng độ hỗn hợp alcalase-papain tới hàm lượng protein hòa tan

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain với nồng độ khác nhau: 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5%. Sau các khoảng thời gian: 0h, 2h, 4h, 6h, 8h và 10 giờ thủy phân, tiến hành lấy mẫu dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng protein hòa tan. Kết quả được thể hiện trên hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain và thời gian thủy phân đến hàm lượng protein tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập.

Từ kết quả phân tích ở hình 3 cho thấy theo thời gian thủy phân hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp alcalase-papain đều tăng theo sự tăng nồng độ enzyme và thời gian thủy phân nhưng mức độ tăng khác nhau tùy thuộc vào nồng độ enzyme. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở nồng độ enzyme 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5% là 4,45 g/kg, 5,37g/kg, 6,24g/kg, 6,34g/kg và 6,46g/kg, cao gấp 2,23 lần, 2,69 lần, 3,12 lần, 3,17 lần và 3,23 lần so với ban đầu. Sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân sụn cá mập với nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain sử dụng 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5% là 10,16 g/kg, 12,98g/kg, 14,12g/kg, 14,67g/kg và 14,89g/kg, cao gấp tương ứng so với ban đầu là 5,08 lần, 6,49 lần, 7,06 lần, 7,34 lần và 7,45. Kết quả này cho thấy khi tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain từ 0,1% ÷ 0,3% thì hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong dịch thủy phân tăng mạnh theo thời gian và tăng mạnh theo chiều tăng nồng độ enzyme. Tuy vậy, khi tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain > 0,3% thì hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong dịch thủy phân lại có xu thế tăng chậm lại và không tương xứng với mức độ tăng nồng độ enzyme. Mặt khác, kết quả đánh giá cũng cho thấy sự khác biệt về hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong dịch thủy phân ở các mẫu bổ sung 0,3%, 0,4% và 0,5% không đáng kể, không có ý nghĩa thống kê. Như vậy, khi tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain > 0,3% thì không làm tăng đáng kể hàm lượng protein hòa tan trong dịch thủy phân dẫn tới nếu tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain > 0,3% sẽ dẫn tới lãng phí enzyme.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng có nét tương đồng với một số nghiên cứu đã công bố trước đây. Cụ thể, năm 2004, Vũ Ngọc Bội khi nghiên cứu về quá trình thủy phân protein cá mòi và cá com bằng enzyme protease từ *B. subtilis* S5 cho thấy nồng độ enzyme protease từ *B. subtilis* S5 thích hợp cho quá trình thủy

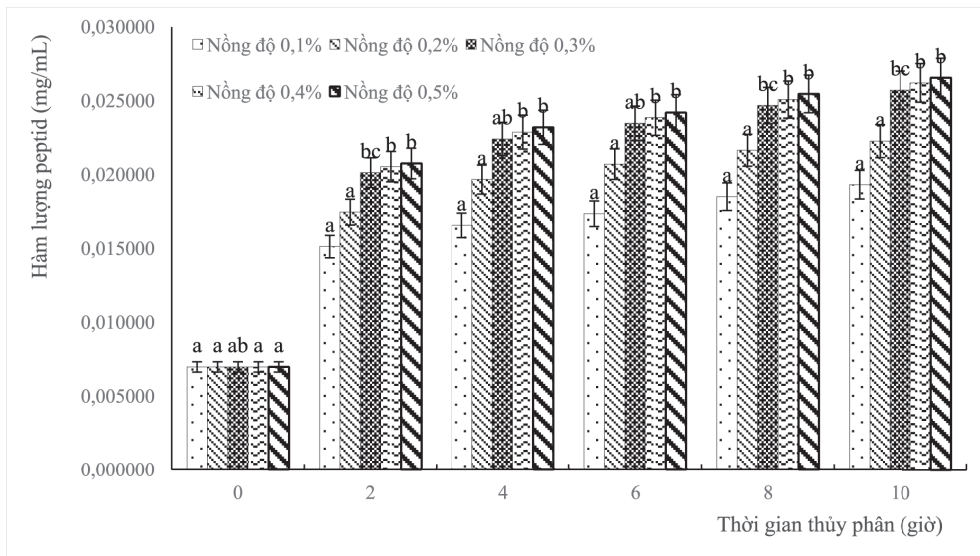
phân cơ thịt cá mòi là 0,3% và nồng độ enzyme protease từ *B. subtilis* S5 thích hợp cho quá trình thủy phân cá com trong sản xuất nước mắm là 0,2% [1]. Năm 2010, Trần Cảnh Đình tiến hành thủy phân hỗn hợp sụn cá mập khô và tươi bằng enzyme protease cho rằng nồng độ enzyme protease thích hợp là 0,2% [3].

Từ những phân tích ở trên cho thấy khi xét theo khía cạnh hàm lượng protein hòa tan thì sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain với nồng độ 0,3% là phù hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập.

2. Ảnh hưởng thời gian thủy phân và nồng độ hỗn hợp alcalase-papain tới hàm lượng peptid tạo thành

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain với nồng độ khác nhau: 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5%. Sau các khoảng thời gian: 0h, 2h, 4h, 6h, 8h và 10 giờ thủy phân, lấy mẫu dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng peptid. Kết quả được thể hiện trên hình 4.

Từ kết quả phân tích ở hình 4 cho thấy cũng giống như hàm lượng protein, hàm lượng peptid tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain đều tăng theo nồng độ enzyme và thời gian thủy phân nhưng mức độ tăng khác nhau tùy thuộc vào nồng độ hỗn hợp enzyme sử dụng. Cụ thể, ở thời điểm sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain tương ứng với nồng độ enzyme 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5% là 0,015146mg/mL, 0,01748 mg/mL, 0,020139mg/mL, 0,020561mg/mL và 0,020773mg/mL, cao gấp tương ứng 2,16 lần, 2,50 lần, 2,88 lần, 2,94 lần và 2,97 lần so với ban đầu. Ở thời điểm sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain tương ứng với nồng độ enzyme 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5% là 0,019327 mg/mL, 0,02228mg/mL, 0,025735mg/mL, 0,026218mg/mL và 0,026564mg/mL, cao gấp 2,76 lần, 3,18 lần, 3,69 lần, 3,75 lần và 3,80 lần so với ban đầu. Kết quả này cho thấy khi



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain và thời gian thủy phân đến hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập.

tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain từ 0,1% ÷ 0,3% thì hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân cũng tăng mạnh theo thời gian và tăng mạnh theo chiều tăng nồng độ enzyme. Nhưng khi tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain > 0,3% thì hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân tăng rất ít và không tương xứng với mức độ tăng nồng độ enzyme. Mặt khác, kết quả đánh giá cũng cho thấy sự khác biệt về hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân ở các mẫu bổ sung 0,3%, 0,4% và 0,5% không đáng kể, không có ý nghĩa thống kê. Như vậy, khi tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain > 0,3% thì không làm tăng hàm lượng peptid trong dịch thủy phân dẫn tới nếu tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain > 0,3% sẽ dẫn tới lãng phí enzyme.

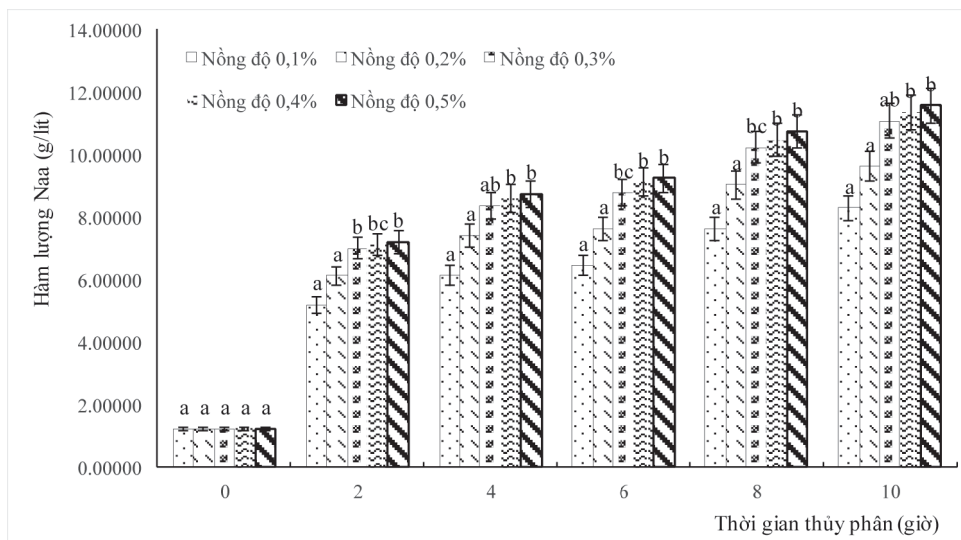
Từ các phân tích hàm lượng peptid ở trên cho thấy nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập là 0,3%.

3. Ảnh hưởng thời gian thủy phân và nồng độ hỗn hợp alcalase-papain tới hàm lượng Naa

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain với nồng độ khác nhau: 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5%. Sau các khoảng thời gian: 0h, 2h, 4h, 6h, 8h và 10 giờ thủy phân, lấy mẫu

dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng Naa. Kết quả được thể hiện trên hình 5.

Kết quả phân tích trình bày ở hình 5 cho thấy hàm lượng Naa tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp alcalase-papain đều tăng theo thời gian thủy phân và nồng độ hỗn hợp enzyme nhưng mức độ tăng của các mẫu thí nghiệm sử dụng nồng độ enzyme khác nhau cũng khác nhau. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng Naa của dịch thủy phân tương ứng với nồng độ hỗn hợp enzyme 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5% là 5,21243g/lít, 5,21243g/lít, 7,00673g/lít, 7,11911g/kg và 7,21414g/lít, cao gấp tương ứng so với ban đầu là 4,24 lần, 4,98 lần, 5,70 lần, 5,79 lần và 5,87 lần. Ở thời điểm sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng Naa của dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở nồng độ 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5% là 8,28690g/lít, 9,62671g/lít, 11,08536g/lít, 11,36078g/kg và 11,56613g/lít, cao gấp 6,74 lần, 7,83 lần, 9,01 lần, 9,24 lần và 9,40 lần so với ban đầu. Kết quả này cũng cho thấy khi tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain từ 0,1% ÷ 0,3% thì hàm lượng Naa tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập tăng mạnh theo chiều tăng nồng độ enzyme và thời gian thủy phân. Trái lại, khi tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain > 0,3% thì hàm lượng



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain và thời gian thủy phân đến hàm lượng Naa tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập.

Naa tạo thành trong dịch thủy phân lại tăng rất chậm, không đáp ứng được mức độ tăng nồng độ enzyme. Như vậy, khi tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain > 0,3% thì không làm tăng đáng kể hàm lượng Naa trong dịch thủy phân dẫn tới nếu tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain > 0,3% có thể dẫn tới lãng phí enzyme.

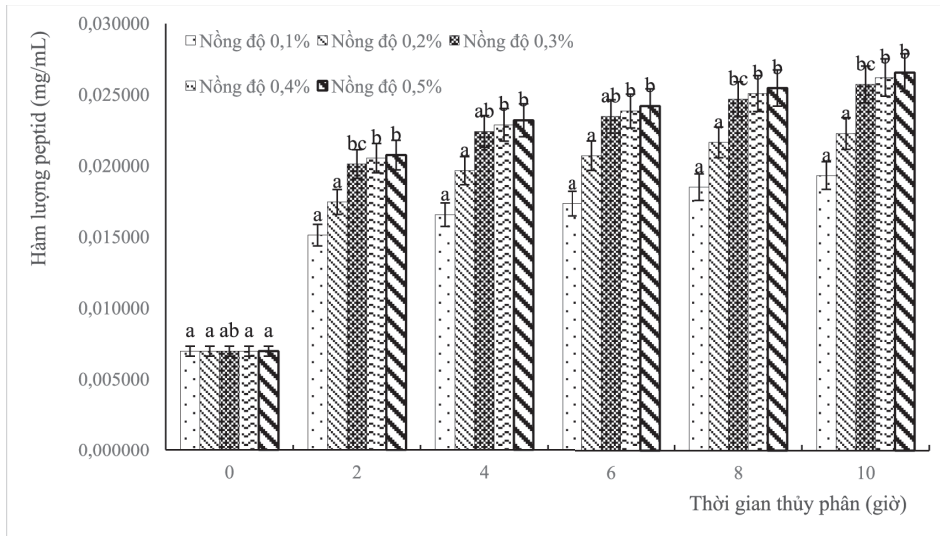
Từ những phân tích ở trên khi xét theo khía cạnh hàm lượng nitơ acid amin thì sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain để thủy phân sụn cá mập với nồng độ enzyme 0,3% là phù hợp.

4. Ảnh hưởng thời gian thủy phân và nồng độ hỗn hợp alcalase-papain tới hàm lượng chondroitin sulphate tạo thành

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain với nồng độ khác nhau: 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5%. Sau các khoảng thời gian: 0h, 2h, 4h, 6h, 8h và 10 giờ thủy phân, lấy mẫu dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng chondroitin sulphate. Kết quả được thể hiện trên hình 6.

Kết quả phân tích trình bày ở hình 6 cho thấy hàm lượng chondroitin sulphate tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp alcalase-papain đều tăng theo thời gian thủy phân và nồng độ hỗn hợp enzyme nhưng mức độ tăng khác nhau tùy thuộc vào nồng độ enzyme. Ở giai

đoạn sau 2 giờ thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain, hàm lượng chondroitin sulphate tạo thành trong dịch thủy phân của các mẫu thí nghiệm sử dụng enzyme với nồng độ 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5% là 7,33062mg/mL, 9,11400mg/mL, 9,84540mg/mL, 10,43168mg/mL và 10,54282mg/mL, cao gấp tương ứng so với ban đầu là 18,85 lần, 23,43 lần, 25,31 lần, 26,82 lần và 27,10 lần. Ở thời điểm sau 10 giờ thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain, hàm lượng chondroitin sulphate của dịch thủy phân tương ứng với nồng độ enzyme đã sử dụng 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5% là 23,23486mg/mL, 28,40800mg/mL, 32,44880mg/mL, 33,05696mg/mL và 33,09104mg/mL, cao gấp tương ứng 59,73 lần, 73,03 lần, 83,42 lần, 84,98 lần và 85,07 lần so với ban đầu. Kết quả này cho thấy khi tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain từ 0,1% ÷ 0,3% thì hàm lượng chondroitin sulphate tạo thành trong dịch thủy phân tăng mạnh theo chiều tăng nồng độ enzyme. Tuy vậy, khi tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain > 0,3% thì hàm lượng chondroitin sulphate tạo thành trong dịch thủy phân có xu hướng tăng chậm lại và mức độ tăng không tương xứng với mức độ tăng nồng độ enzyme. Mặt khác, kết quả đánh giá cũng cho thấy sự khác biệt về hàm lượng chondroitin



Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain và thời gian thủy phân đến hàm lượng chondroitin sulphate tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập.

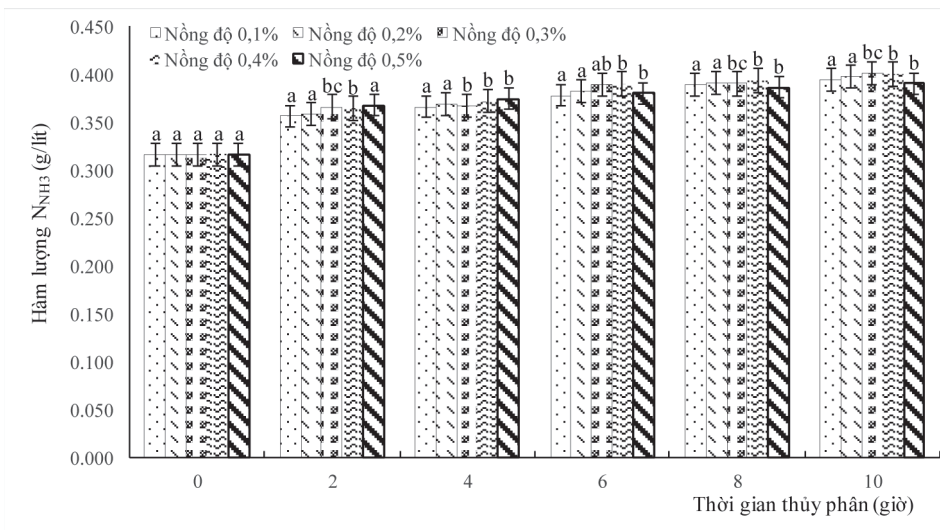
sulphate tạo thành trong dịch thủy phân của các mẫu bổ sung enzyme với nồng độ 0,3%, 0,4% và 0,5% không đáng kể, không có ý nghĩa thống kê. Như vậy, khi tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain > 0,3% thì không làm tăng đáng kể hàm lượng chondroitin sulphate trong dịch thủy phân dẫn tới khi tăng nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain > 0,3% sẽ dẫn tới lãng phí enzyme.

Từ những phân tích ở trên khi xét theo khía cạnh hàm lượng chondroitin sulphate tạo thành thì nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase -

papain thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập là 0,3%.

5. Ảnh hưởng thời gian thủy phân và nồng độ hỗn hợp alcalase-papain tới hàm lượng N_{NH_3} .

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain với nồng độ khác nhau: 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5%. Sau các khoảng thời gian: 0h, 2h, 4h, 6h, 8h và 10 giờ thủy phân, lấy mẫu dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng N_{NH_3} . Kết quả được thể hiện trên hình 7.



Hình 7. Ảnh hưởng của nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain và thời gian thủy phân đến hàm lượng N_{NH_3} tạo thành trong dịch thủy phân vi sụn cá mập.

Từ kết quả phân tích ở hình 7 cho thấy hàm lượng N_{NH_3} tạo thành trong các mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với nồng độ enzyme sử dụng khác nhau đều tăng theo thời gian thủy phân nhưng mức độ tăng chậm và khác nhau không đáng kể giữa các mẫu thí nghiệm. Cụ thể, sau 10 giờ thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain, các mẫu thủy phân sử dụng enzyme với nồng độ: 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5% đều có hàm lượng N_{NH_3} tăng trong khoảng từ 1,13-1,27 lần so với ban đầu và sự chênh lệch về hàm lượng N_{NH_3} giữa các mẫu thí nghiệm không có ý nghĩa thống kê.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu ở trên cho phép rút ra kết luận:

1) Nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain và thời gian thủy phân có ảnh hưởng mạnh đến hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa, chondroitin sulphate và N_{NH_3} tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain.

2) Nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập là 0,3%. Sau 10h thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với nồng độ enzyme 0,3%, nhiệt độ thủy phân 50°C, thủy phân ở pH tự nhiên (6,8), khối lượng mẫu 2kg và tỷ lệ nước bổ sung 2 lít, dịch thủy phân có hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa, chondroitin sulphate và N_{NH_3} cao gấp 7,06 lần, 3,68 lần, 9,01 lần, 83,42 lần và 1,27 lần so với ban đầu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Vũ Ngọc Bội (2004), *Nghiên cứu quá trình thủy phân protein cá bằng enzyme protease từ B. subtilis*, Luận án tiến sĩ Sinh học chuyên ngành Hóa sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP. Hồ Chí Minh, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
2. Vũ Ngọc Bội, Lê Hương Thủy, Phạm Thị Hương, Đặng Thị Thu Hương (2015), “Nghiên cứu thủy phân moi biển (Acetes sp) bằng hỗn hợp enzym alcalase - bromelin thô”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Thủy sản*, Số 4/2015, Trường Đại học Nha Trang, Trang 18-26.
3. Trần Cảnh Đình và cộng sự (2010), *Nghiên cứu ứng dụng sản xuất thử nghiệm chondroitin và glucosamin từ nguyên liệu thủy sản*, Báo cáo tổng kết đề tài nghiên cứu khoa học thuộc chương trình CNSH - thủy sản, Viện Hải sản, Hải phòng.
4. Đặng Văn Hợp, Đỗ Minh Phụng, Vũ Ngọc Bội, Nguyễn Thuần Anh (2010), *Phân tích kiểm nghiệm thực phẩm thủy sản*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
5. Phạm Thị Khánh Vân & Vũ Thị Thái (2004), "Phím nước mắt và tác dụng của chondroitin sulphat". *Tạp chí Thuốc và Sức khỏe*, Số 273(12).

Tiếng Anh

6. Antonilli L. and Paroli E. (1993), “Role of the oligosaccharide inner core in the inhibition of human leukocyte elastase by chondroitin sulfates”, *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.*;13 Suppl:11-7.
7. Bruyere O. & Reginster J. Y. (2007), "Glucosamine and chondroitin sulfate as therapeutic agents for knee and hip osteoarthritis”, *Drugs Aging*, 24(7): p. 573-580.
8. Farndale W. R., Buttle D. J. & Barrett A. J. (1986), "Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue", *Biochim. Biophys. Acta.*, 883: p. 173-177.
9. J. Jayaraman (1998), *Laboratory manual in biochemistry*, Wiley Eastern Limited.
10. Robert M. Lauder (2009), "Chondroitin sulphate: A complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems", *Complementary Therapies in Medicine*, 17: p. 56-62.