

## ẢNH HƯỞNG CỦA pH VÀ THỜI GIAN ĐẾN QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN SỤN CÁ MẬP (*Carcharhinus dussumieri*) BẰNG HỖN HỢP ENZYME ALCALASE-PAPAIN

### EFFECTS OF THE pH AND TIME TO THE SHARK CARTILAGE (*Carcharhinus dussumieri*) HYDROLYTIC PROCESS BY THE ALCALASE-PAPAIN ENZYME MIXTURE

Nguyễn Thị Mỹ Trang<sup>1</sup>, Vũ Ngọc Bội<sup>1</sup>, Đinh Hữu Đông<sup>2</sup>, Vũ Quang Minh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Nha Trang

<sup>2</sup>Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm Tp. Hồ Chí Minh

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

Ngày nhận bài: 05/03/2022; Ngày phân biên thông qua: 25/03/2022; Ngày duyệt đăng: 28/03/2022

#### TÓM TẮT

Bài báo này công bố kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của pH và thời gian đến quá trình thủy phân sụn cá mập (*Carcharhinus dussumieri*) bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain. Kết quả nghiên cứu cho thấy pH 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. Theo thời gian thủy phân, dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở pH 6,5 -7,0 có hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa, chondroitin sulphate cao hơn dịch thủy phân ở pH 6,0 và 8,0 nhưng hàm lượng  $N_{NH_3}$  lại tương đương. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy pH thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain là pH 7,0. Sau 10h thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở pH 7,0, với nồng độ enzyme 0,3%, nhiệt độ thủy phân 50°C, 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 tương ứng 7,39 lần, 3,69 lần, 9,42 lần, 88,96 lần và 1,25 lần so với ban đầu.

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

#### ABSTRACT

This paper focused on the research to determine the effect of the pH and time on shark cartilage (*Carcharhinus dussumieri*) hydrolytic process by the alcalase-papain enzyme mixture. The results showed that the pH and hydrolysis time strongly affected the content of soluble proteins, peptides, Naa, chondroitin sulphate, and  $N_{NH_3}$  formed in shark cartilage hydrolyzate by alcalase-papain enzyme mixture. According to hydrolysis time, shark cartilage hydrolyzate by alcalase-papain enzyme mixture at pH 6.5 -7.0 had higher content of soluble protein, peptide, Naa, chondroitin sulphate than hydrolyzate at pH 6, 0 and 8.0 but the content of  $N_{NH_3}$  was equivalent. The results also indicated that pH 7.0 was suitable for shark cartilage hydrolysis by alcalase-papain enzyme mixture. After 10 hours of shark cartilage hydrolysis by alcalase-papain enzyme mixture at pH 7.0, concentration of 0.3%, temperature of 50°C, sample weight of 2 kilograms and the additional water of 2 liters, the hydrolyzate had the content of soluble protein, peptide, Naa, chondroitin sulphate, and  $N_{NH_3}$  higher than 7.39 times, 3.69 times, 9.42 times, 88.96 times and 1.25 times from the original.

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

#### 1. MỞ ĐẦU

Chondroitin sulfate là thành phần cơ bản cấu tạo nên sụn khớp, giúp cho sự vận động linh hoạt và tính đàn hồi trong hoạt động của khớp, tạo độ bền khi bị nén ép [6]. Mặt khác, chondroitin sulfate còn tham gia chức năng của các tế bào hình que của võng mạc mắt [2, 5].

Do vậy, chondroitin sulfate thường được sử dụng để hỗ trợ điều trị các bệnh lý về xương khớp, chống thoái hoá sụn khớp và góp phần nuôi dưỡng, tái tạo các tế bào hình que của võng mạc mắt từ đó giúp sáng mắt [2, 3, 5, 6]. Chondroitin sulfate thường có nhiều trong các mô sụn động vật, đặc biệt có nhiều trong mô

sụn cá mập. Do vậy, ngày nay sụn cá mập được người ta điều chế thành các loại thực phẩm chức năng dùng trong hỗ trợ điều trị các bệnh về lý về xương khớp và mắt [4]. Trong sụn cá mập, chondroitin sulfate thường liên kết với protein bằng liên kết o-glycosid tạo thành phức hợp glucoprotein nằm trong mô sụn nên con người rất khó hấp thụ [2, 3, 5, 6, 7, 10, 11]. Chính vì thế, chúng tôi tiến hành nghiên cứu thủy phân sụn cá mập tươi bằng phương pháp sử dụng enzyme protease và thu dịch thủy phân chứa chondroitin sulfate định hướng sử dụng làm thực phẩm hỗ trợ chống thoái hóa sụn khớp và sáng mắt. Trong bài báo này, chúng tôi chỉ công bố nghiên cứu ảnh hưởng của pH và thời gian đến quá trình thủy phân sụn cá mập tươi bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain.

## 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên vật liệu

#### 2.1.1. Sụn cá mập:

Cá mập trắng (*Carcharhinus dussumieri* (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 2÷10 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, đóng túi 2kg/túi, cấp đông và bảo quản đông ở  $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  để dùng trong suốt quá trình nghiên cứu.



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

#### 2.1.2. 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 $^{\circ}\text{C}$ , hoạt tính 2,4AU/g được bảo quản ở 0 - 5 $^{\circ}\text{C}$ .

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

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. 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.

\* **Định lượng protein hòa tan theo phương pháp Lowry** [4, 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** [2]: 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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  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:

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

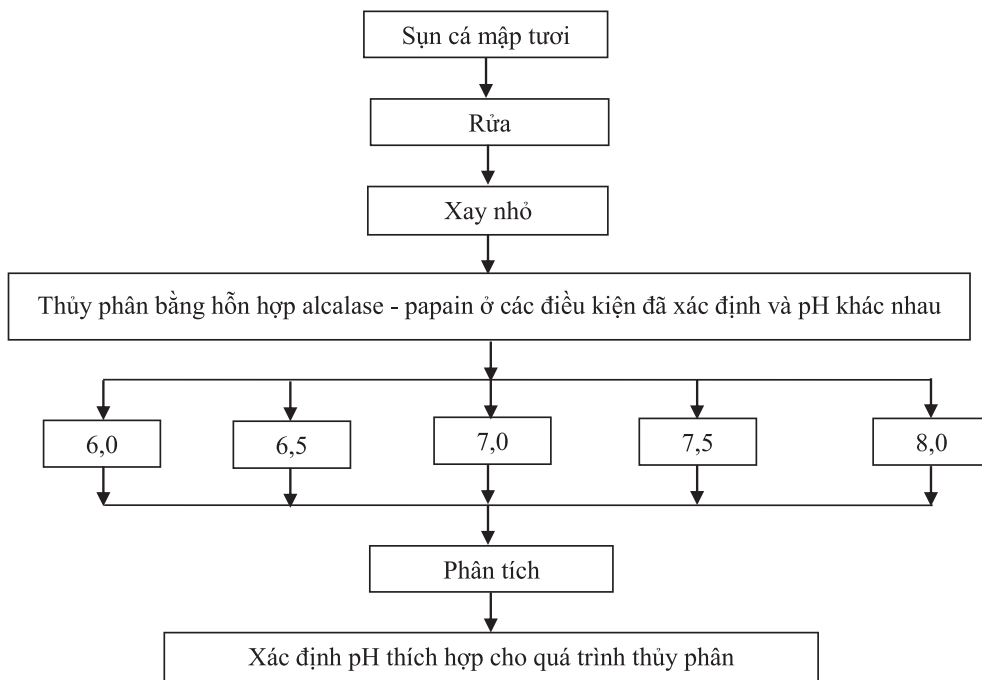
**2.2.2. Phương pháp định lượng chondroitin sulfate (CS) bằng phương pháp so màu theo Farndale và cộng sự [8]**

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.

*2.2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm*

Bố trí thí nghiệm để xác định pH thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain được trình bày ở hình 2.



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

Sụn cá mập đã xử lý làm sạch, xay nhỏ bằng máy xay và dùng làm nguyên liệu cho quá trình 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 ở các pH khác nhau: mẫu 1: thủy phân ở pH 6,0; mẫu 2: thủy phân ở pH 6,5; mẫu 3: thủy phân ở 7,0; mẫu 4: pH 7,5 và mẫu 5: thủy phân ở pH 8,0. Các mẫu thủy phân đều sử dụng 2kg sụn cá mập tươi, tỷ lệ alcalase/papain trong hỗn hợp 60/40, tỷ lệ hỗn hợp enzyme alcalase-papain sử dụng là 0,3%,

lượng nước bổ sung 2 lít và nhiệt độ thủy phân 50°C. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2giờ, 4giờ, 6giờ, 8giờ và 10 giờ, tiến hành lấy mẫu đánh giá hàm lượng protein hòa tan, hàm lượng peptid, hàm lượng Naa, hàm lượng chondroitin sulfate và hàm lượng N<sub>NH3</sub>. Kết quả đánh giá là cơ sở để lựa chọn pH thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain.

**2.3. 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 nitơ/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.

**2.4. 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

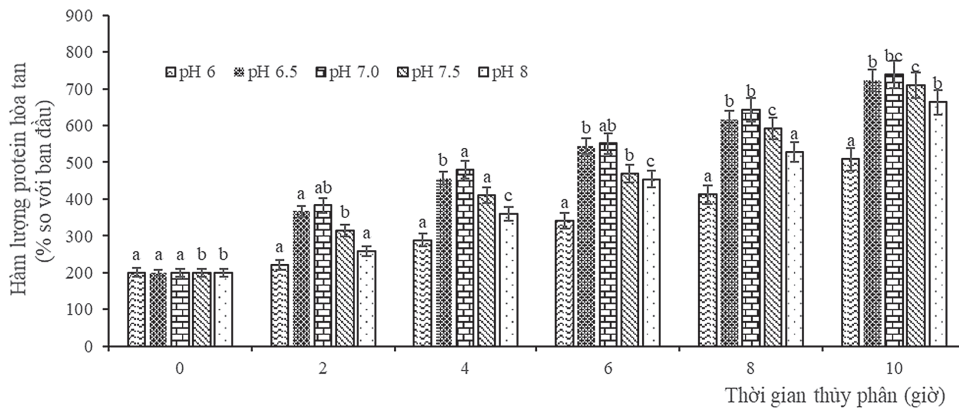
Centurion XVII trial.

**3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Ảnh hưởng pH và thời gian thủy phân tới hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain**

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở các pH khác nhau: mẫu 1: thủy phân ở pH 6,0, mẫu 2: thủy phân ở pH 6,5, mẫu 3: thủy phân ở pH 7,0, mẫu 4: pH 7,5 và mẫu 5: thủy phân ở pH 8,0. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ, tiến hành lấy mẫu để đánh giá hàm lượng protein hòa tan. Kết quả được trình bày ở hình 3.

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3 cho thấy



**Hình 3. Ảnh hưởng của pH và thời gian thủy phân đến hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập.**

theo thời gian thủy phân hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp alcalase-papain đều tăng theo thời gian thủy phân và thay đổi theo sự thay đổi của pH nhưng mức độ tăng và thay đổi cũng khác nhau. Sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0 là 4,43 mg/g; 7,33mg/g; 7,65mg/g; 6,28mg/g và 5,15mg/g, cao gấp 2,21 lần, 3,66 lần, 3,87 lần, 3,14 lần và 2,58 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 ở pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0 là 10,18mg/g; 14,46mg/g; 14,77mg/g; 14,30mg/g

và 12,38mg/g, cao gấp 5,9 lần, 7,13 lần; 7,39 lần; 7,15 lần và 6,19 lần so với ban đầu. Như vậy, khi thực hiện quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain tại pH 8,0 và pH 6,0 thì hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân tăng theo thời gian thủy phân nhưng mức độ tăng thấp hơn so với khi thủy phân dịch sụn cá mập ở pH 6,5, pH 7,0 và pH 7,5. Kết quả phân tích cũng cho thấy hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập ở pH = 7,0 cao hơn các mẫu khác và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, có nghĩa là hàm lượng protein hòa tan tạo thành khi thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 7,0 là cao nhất. Như vậy, thực hiện quá trình thủy phân sụn cá



mập ở pH 7,0 (giá trị pH 7,0 tương đương với pH tự nhiên của sụn cá mập) vừa tạo ra hàm lượng protein hòa tan cao lại không cần điều chỉnh pH nên quá trình sản xuất sẽ đảm bảo “xanh”, “sạch” - đây chính là là lợi ích lớn đối với quá trình sản xuất thực phẩm.

*Từ những phân tích ở trên cho thấy thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 7,0 sẽ tạo thành dịch thủy phân có chứa hàm lượng protein hòa tan cao hơn khi thủy phân ở các giá trị pH khác đã thử nghiệm.*

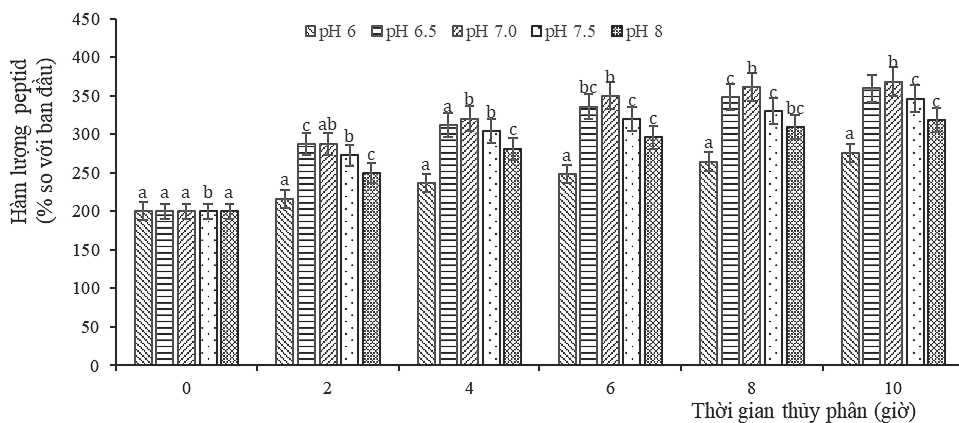
### 3.2. Ảnh hưởng pH và thời gian thủy phân tới hàm lượng peptid tạo thành trong quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở các pH khác nhau: mẫu 1: thủy phân ở pH 6,0; mẫu 2: thủy phân ở pH 6,5; mẫu 3: thủy phân ở pH 7,0; mẫu 4: pH 7,5 và mẫu 5: thủy phân ở pH 8,0. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2giờ, 4giờ, 6giờ, 8giờ và 10 giờ, tiến hành lấy mẫu để đánh giá hàm lượng peptid. Kết quả được trình bày ở hình 4.

Kết quả phân tích ở hình 4 cho thấy theo thời gian thủy phân hàm lượng peptid tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp alcalase-papain đều tăng theo thời gian thủy phân và thay đổi theo pH nhưng mức độ tăng khác nhau tùy thuộc vào pH thủy phân. Sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng peptid của dịch thủy phân sụn cá mập ở pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0 là

0,015146mg/ml, 0,020103mg/ml; 0,020139mg/ml, 0,019106mg/ml và 0,01748mg/ml, cao gấp tương ứng 2,16 lần; 2,85 lần, 2,88 lần, 2,73 lần và 2,49 lần so với ban đầu. Sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng peptid của dịch thủy phân sụn cá mập ở pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0 là 0,019327mg/ml; 0,025156mg/ml; 0,025348mg/ml; 0,024218mg/ml và 0,022228mg/ml, cao gấp 2,76 lần; 3,59 lần; 3,69 lần, 3,46 lần và 3,18 lần so với ban đầu. Kết quả phân tích cũng cho thấy khi thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 8,0 và pH 6,0 thì hàm lượng peptid thu được cũng tăng theo thời gian thủy phân nhưng mức độ tăng thấp hơn so với khi thủy phân ở pH 6,5; pH 7,0 và pH 7,5. Kết quả đánh giá cũng cho thấy hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 6,5 và pH 7,0 cao hơn các mẫu thí nghiệm khác. Mặt khác, kết quả phân tích thống kê còn cho thấy mức độ chênh lệch giữa hàm lượng peptid giữa mẫu thủy phân ở pH 6,5 và pH 7,0 không nhiều và không có ý nghĩa thống kê. Như vậy, khi thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 6,5 và pH 7,0 thì hàm lượng peptid tạo thành theo thời gian tương đương nhau.

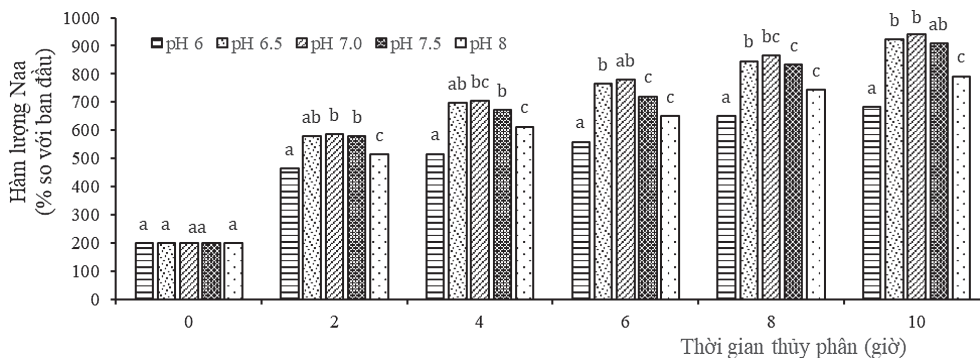
*Từ những phân tích ở trên cho thấy thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 7,0 là phù hợp do dịch thủy phân tạo thành có chứa hàm lượng peptid cao hơn khi thủy phân ở các giá trị pH khác đã thử nghiệm.*



**Hình 4.** Ảnh hưởng của pH và thời gian thủy phân đến hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập.

**3.3. Ảnh hưởng pH và thời gian thủy phân tới hàm lượng Naa tạo thành trong quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain**

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở các pH khác nhau: mẫu 1: thủy phân ở pH



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

tương tự như quy luật tạo thành protein hòa tan và peptid, hàm lượng Naa tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain đều tăng theo thời gian thủy phân với mức độ tăng khác nhau tùy thuộc vào pH. Sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng Naa của dịch thủy phân sụn cá mập ở pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0 là 5,71233mg/g; 7,12804mg/g; 7,20044mg/g; 7,10862mg/g và 6,32125mg/g cao gấp tương ứng 4,64 lần; 5,79 lần; 5,85 lần; 5,78 lần và 5,14 lần so với ban đầu. Sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng peptid của dịch thủy phân sụn cá mập ở pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0 là 8,38470mg/g; 11,34264mg/g; 11,58621mg/g; 11,6642mg/g và 9,73874mg/g cao gấp 6,82 lần; 9,22 lần; 9,42 lần; 9,48 lần và 7,92 lần so với ban đầu. Kết quả phân tích cũng cho thấy khi thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 6,0 và pH 8,0 thì hàm lượng Naa tạo thành trong dịch thủy phân tăng mạnh theo thời gian nhưng mức độ tăng thấp hơn khi thủy phân sụn cá mập ở pH 6,5 và pH 7,0. Mặt khác, kết quả phân tích còn cho thấy hàm lượng Naa tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 6,5 và pH 7,0 khác biệt không đáng kể và sự khác biệt không

6,0; mẫu 2: thủy phân ở pH 6,5; mẫu 3: thủy phân ở pH 7,0; mẫu 4: pH 7,5 và mẫu 5: thủy phân ở pH 8,0. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ, tiến hành lấy mẫu để đánh giá hàm lượng Naa. Kết quả được trình bày ở hình 5.

Kết quả phân tích ở hình 5 cho thấy cũng

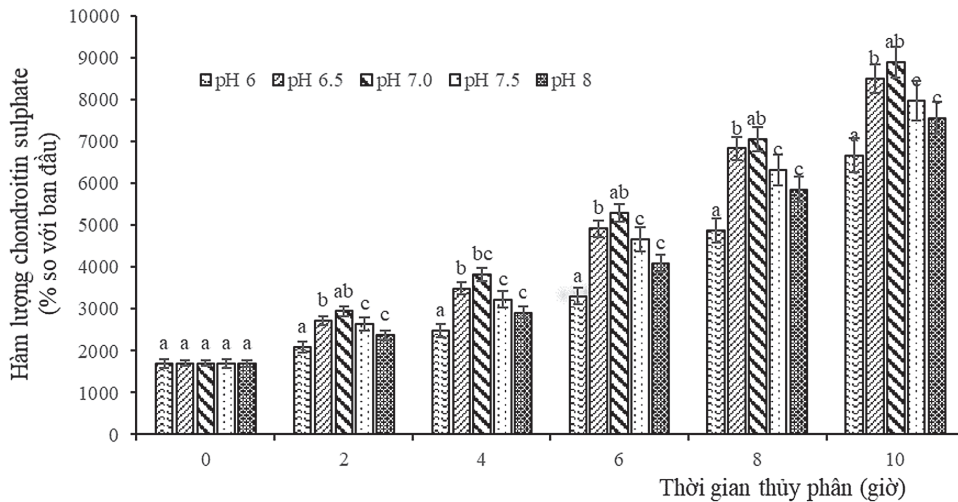
có ý nghĩa thống kê. Như vậy, thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 6,5 và pH 7,0 thì hàm lượng peptid tạo thành theo thời gian tương đương nhau và cao hơn khi thủy phân ở pH 6,0; pH 8,0.

Từ những phân tích ở trên cho thấy thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 7,0 sẽ tạo thành dịch thủy phân có chứa hàm lượng Naa cao hơn khi thủy phân ở các giá trị pH khác đã thử nghiệm.

**3.4. Ảnh hưởng pH và thời gian thủy phân tới hàm lượng chondroitin sulphate tạo thành trong quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain**

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở các pH khác nhau: mẫu 1: thủy phân ở pH 6,0; mẫu 2: thủy phân ở pH 6,5; mẫu 3: thủy phân ở pH 7,0; mẫu 4: pH 7,5 và mẫu 5: thủy phân ở pH 8,0. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ, tiến hành lấy mẫu để đánh giá hàm lượng chondroitin sulphate. Kết quả được trình bày ở hình 6.

Kết quả phân tích ở hình 6 cũng cho thấy theo thời gian thủy phân hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp



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

alcalase-papain đều tăng theo thời gian thủy phân nhưng mức độ tăng khác nhau tùy thuộc vào giá trị pH thủy phân. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng chondroitin sulfate của dịch thủy phân sụn cá mập ở pH thủy phân 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0 là 8,12116mg/ml; 10,551430mg/ml; 11,4578mg/ml; 10,23641mg/ml và 9,234mg/ml; cao gấp tương ứng 20,88 lần; 27,12 lần; 29,45 lần; 26,31 lần và 23,74 lần so với ban đầu. Sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng chondroitin sulfate của dịch thủy phân sụn cá mập ở pH thủy phân 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0 là 25,94367mg/ml; 33,06316mg/ml; 34,6048mg/ml; 31,04492mg/ml và 29,4270mg/ml; cao gấp 66,69 lần; 84,99 lần; 88,96 lần, 79,81 lần và 75,65 lần so với ban đầu. Kết quả phân tích ở trên cũng cho thấy khi thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 6,0 và pH 8,0 thì hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong dịch thủy phân tăng mạnh theo thời gian nhưng mức độ tăng thấp hơn khi thủy phân sụn cá mập ở pH 6,5 và pH 7,0. Mặt khác, kết quả phân tích cũng cho thấy hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong dịch thủy phân mạnh sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 6,5 và pH 7,0 khác biệt không đáng kể và sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này chứng tỏ thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp

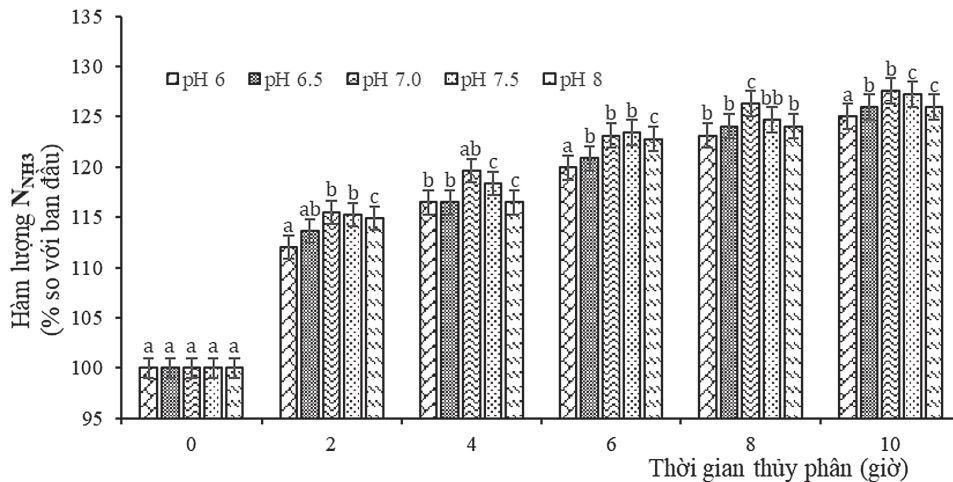
enzyme alcalase - papain ở pH 6,5 và pH 7,0 thì hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành theo thời gian tương đương nhau và cao hơn khi thủy phân ở pH 6,0 hoặc pH 8,0.

Từ những phân tích ở trên cho thấy thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 7,0 sẽ tạo thành dịch thủy phân có chứa hàm lượng chondroitin sulfate cao hơn khi thủy phân ở các giá trị pH khác đã thử nghiệm.

### 3.5. Ảnh hưởng pH và thời gian thủy phân tới hàm lượng $N_{NH_3}$ tạo thành trong quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở các pH khác nhau: mẫu 1: thủy phân ở pH 6,0; mẫu 2: thủy phân ở pH 6,5; mẫu 3: thủy phân ở pH 7,0; mẫu 4: pH 7,5 và mẫu 5: thủy phân ở pH 8,0. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ, tiến hành lấy mẫu để đánh giá hàm lượng  $N_{NH_3}$ . Kết quả được trình bày ở hình 7.

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 ở các pH 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



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

mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain, các mẫu thủy phân sử dụng enzyme thủy phân với pH: là 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0 đều có hàm lượng  $N_{NH_3}$  tăng trong khoảng từ 1,25÷1,26 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. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng có những nét tương đồng với một số nghiên cứu đã công bố trước đây. Năm 2010, Trần Cảnh Đình tiến hành thủy phân hỗn hợp sụn cá mập khô bằng enzyme protease cũng cho rằng quá trình thủy phân sụn cá mập tiến hành ở pH 6,5 tốt hơn các pH khác [3].

Từ những phân tích ở trên cho thấy thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 7,0 sẽ tạo thành dịch thủy phân có chứa hàm lượng  $N_{NH_3}$  không có sự chênh lệch so với khi thủy phân ở các giá trị pH khác đã thử nghiệm.

Từ tất cả những phân tích trên cho thấy sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain trong thủy phân sụn cá mập ở pH 7,0 sẽ tạo ra dịch thủy phân có hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa, chondroitin sulfate cao hơn các mẫu thủy phân khác nhưng hàm lượng  $N_{NH_3}$  tạo thành lại tương đương. Do vậy, pH 7,0 nên

được lựa chọn cho quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme protease alcalase - papain.

#### 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

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

1) Thời gian thủy phân và pH 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. Theo thời gian thủy phân, dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở pH 6,5 -7,0 có hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa, chondroitin sulphate cao hơn dịch thủy phân ở pH 6,0 và 8,0 nhưng hàm lượng  $N_{NH_3}$  lại tương đương.

2) pH 7,0 là thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain. Sau 10h thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở pH 7,0, nồng độ enzyme 0,3%, nhiệt độ thủy phân 50°C, 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 tương ứng 7,39 lần, 3,69 lần, 9,42 lần, 88,96 lần và 1,25 lần so với ban đầu.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

1. 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.
2. Đinh Hữu Đông, Vũ Ngọc Bội, Nguyễn Thị Mỹ Trang (2020), “Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và loại enzyme đến quá trình thủy phân sụn cá mập (*Carcharhinus dussumieri*) bằng protease”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Số 382, Kỳ 7 (4.2020), pp. 96-102 (ISSN 1859-4581).
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.
11. Yu M. T., Toida T., Imanari T. G. and Linhardt R. J. (1998), “Conformational changes and anticoagulant activity of chondroitin sulfate following its O -sulfonation”, *Carbohydr. Res.* 306, pp. 35-43.
12. Yuo L., Yang J., Shen M., Wen H., Huang R. and Rong L. (2020), “Recent advance in delivery system and tissue engineering applications of chondroitin sulfate”, *Elsevier*, Vol. 230, 115650, pp
13. Yves Jean, Reginster and Nicola Veronese, (2021), “Highly purified chondroitin sulfate: a literature review on clinical efficacy and pharmacoeconomic aspects in osteoarthritis treatment”, *Aging Clinical and Experimental Research*, Vol. 33, pp. 37-47.