

ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN THỦY PHÂN VÀ LOẠI ENZYME ĐẾN QUÁ TRÌNH THỦY PHÂN SỤN CÁ HỒI (*Salmon salar*) THU CHONDROITIN SULFATE BẰNG PROTEASE

Đinh Hữu Đông^{1, *}, Nguyễn Công Bình¹

TÓM TẮT

Nội dung bài báo trình bày một phần kết quả nghiên cứu thủy phân sụn cá hồi (*Salmon salar*) bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các enzym: neutralse, alcalase, flavourzyme, papain và hỗn hợp enzym alcalase - papain đều có khả năng thủy phân hỗn hợp sụn cá hồi, tuy nhiên trong cùng điều kiện thử nghiệm thì hỗn hợp enzym alcalase - papain đạt hiệu suất thủy phân cao hơn so với các enzym đơn lẻ ở trên. Cụ thể, trong điều kiện thủy phân ở pH tự nhiên, tỷ lệ enzym bổ sung 0,4%, lượng nước bổ sung 100% và nhiệt độ thủy phân 55°C, hỗn hợp enzym alcalase - papain có khả năng thủy phân sụn cá hồi thu dịch thủy phân chứa hàm lượng protein hòa tan, peptid, axit amin, chondroitin sulfate cao hơn tương ứng 1,43 lần, 2,81 lần, 2,31 lần, 12,19 lần so với ban đầu.

Từ khóa: *Neutralse, alcalase, flavourzyme, papain, chondroitin sulfate, sụn cá hồi, thủy phân.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chondroitin sulfate là thành phần cơ bản cấu tạo nên sụn khớp và cấu tạo nên các tổ chức sợi chun (gân, cơ, dây chằng...) giúp cho sự vận động linh hoạt và tính đàn hồi trong hoạt động khớp, tạo độ bền khi bị nén ép [2]. Chondroitin sulfate làm tăng sản xuất chất nhầy và khả năng bôi trơn của dịch khớp, đảm bảo chức năng dinh dưỡng và sự vận động linh hoạt của khớp. Vì vậy, chondroitin sulfate được sử dụng để hỗ trợ điều trị các bệnh lý về xương khớp, hạn chế quá trình thoái hóa khớp. Chondroitin sulfate còn có vai trò bảo vệ sụn khớp bằng cách ức chế các enzym phá hủy sụn khớp như collagenase, phospholipase A2, N - acetylglucosaminidase. Ngoài ra, chondroitin sulfate cũng góp phần nuôi dưỡng và tái tạo các tế bào của giác mạc mắt [5, 7, 8, 10].

Hiện chondroitin sulfate chủ yếu được thu nhận từ các nguồn nguyên liệu tự nhiên. Trong đó, sụn cá mà đặc biệt là sụn cá hồi thường có hàm lượng chondroitin sulfate cao hơn các loại động vật khác. Chính vì thế, người ta thường sử dụng sụn cá trong sản xuất chondroitin sulfate dùng trong sản xuất thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị các bệnh xương khớp. Chondroitin sulfate thường liên kết với protein bằng liên kết o - glycosid tạo thành một proteoglycan (PG) (glucoprotein) nằm trong cấu trúc của mô sụn nên con người rất khó hấp thụ [5, 7, 14]. Hiện có một

số nghiên cứu sử dụng tác nhân hóa học hoặc enzym thủy phân sụn cá khô hoặc tươi và kết tủa thu chondroitin sulfate dùng trong sản xuất thực phẩm chức năng [5]. Tuy vậy, việc chỉ thu nhận chondroitin sulfate dẫn đến sự lãng phí nguồn các chất tự nhiên từ sụn cá và hiệu quả sử dụng không cao cũng như hiệu quả sản xuất hạn chế, giá thành sản phẩm cao [7]. Để khắc phục hiện tượng này, tiến hành nghiên cứu sử dụng enzym trong thủy phân sụn cá hồi tươi với mong muốn tạo ra dịch thủy phân chứa các chất từ sụn cá và chondroitin sulfate để định hướng sử dụng làm thực phẩm cung cấp các thành phần thiết yếu giúp hỗ trợ chống thoái hóa xương khớp. Trong giới hạn của bài báo này, chỉ công bố phần nghiên cứu lựa chọn enzym trong thủy phân sụn cá hồi.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

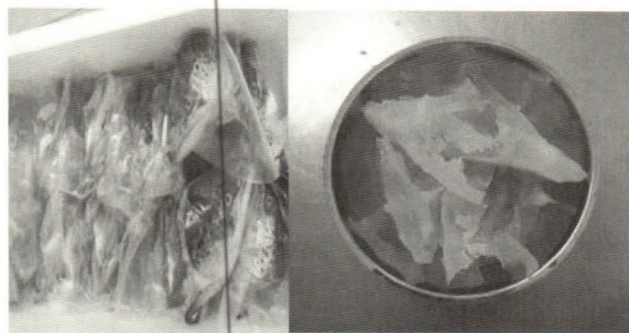
2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Sụn cá hồi

Đầu và xương cá hồi (*Salmon salar* Linnaeus, 1758) được thu mua tại Công ty Trách nhiệm hữu hạn Sài Gòn Food, Khu công nghiệp Vĩnh Lộc, Bình Chánh, thành phố Hồ Chí Minh. Đầu cá tươi có khối lượng trung bình 0,3 kg/đầu - 0,5 kg/đầu. Sau thu mua, ướp đá trong thùng xốp và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Tại phòng thí nghiệm, tiến hành xử lý loại bỏ thịt, mô liên kết, làm sạch, thu sụn, xay nhỏ, cấp đông và bảo quản đông ở - 20°C để dùng trong suốt quá trình nghiên cứu.

¹ Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh

*Email: dongdh@hufi.edu.vn



Hình 1. Hình ảnh sụn cá hồi trước và sau khi 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 enzym serine endopeptidase có các đặc tính kỹ thuật như sau: pH thích hợp trong khoảng 6 - 8, nhiệt độ thích hợp 30°C - 65°C, hoạt tính 2,4 AU/g, enzym được bảo quản ở 0°C - 5°C.

2.1.3. Enzym neutrase

Enzym neutrase 0,8 L là chế phẩm protease thương mại do Công ty Advanced enzym Technologies Ltd - India sản xuất và cung cấp tại Việt Nam. Neutrase thuộc nhóm enzym endopeptidase có các đặc tính kỹ thuật như sau: pH thích hợp 5,5 - 7,5, nhiệt độ thích hợp 40°C - 50°C, hoạt tính 0,8 AU/g, enzym được bảo quản ở 0°C - 5°C.

2.1.4. Enzym Flavourzyme

Flavourzyme là chế phẩm protease thương mại do hãng Novozyme - Đan Mạch cung cấp. Flavourzyme có cả hoạt tính của endopeptidase và của exopeptidase nhưng chủ yếu là exopeptidase, có nguồn gốc từ *Aspergillus oryzae* [4], hoạt độ là 500 LAPU (Leucine Aminopeptidase Units)/g, điều kiện hoạt động thích hợp là 50°C - 55°C, pH = 5,0 - 7,0.

2.1.5. 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 enzym 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.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Các phương pháp phân tích

- Định lượng hàm lượng nitơ axit amin (Naa) theo phương pháp formol; định lượng NH₃ theo phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước [13].

* *Xác định hoạt độ protease theo phương pháp Anson [11, 12]:* Nguyên tắc của phương pháp là dùng protein casein làm cơ chất xác định hoạt độ thủy phân protein của enzym 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 enzym.

- *Định lượng protein hòa tan theo phương pháp Lowry [13]:* 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 - Ciocalteau tạo thành phức chất màu xanh đen có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 650 nm. Dựa vào đường chuẩn protein có thể định lượng hàm lượng protein.

- *Xác định hàm lượng peptid [6, 13]:* Được định lượng dựa vào đường chuẩn tyrosine. Lấy 1 g mẫu thủy phân, cho thêm 9 ml nước cất sau đó khuấy đều trong khoảng 5 phút - 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 2 ml dung dịch lọc ở trên cộng với 2 ml Trichloacetic acid (TCA) 20% để 30 phút rồi lọc qua giấy lọc thu dịch lọc. Lấy một ống nghiệm sạch cho vào 1 ml dịch lọc + 5 ml dung dịch Na₂CO₃ 0,4 M lắc đều, rồi cho vào 1 ml Folin để 20 phút so màu ở bước sóng 660 nm. Ống đối chứng: lấy 1 ml dung dịch TCA 10% + 5 ml Na₂CO₃ 0,4 M + 1 ml 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:

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

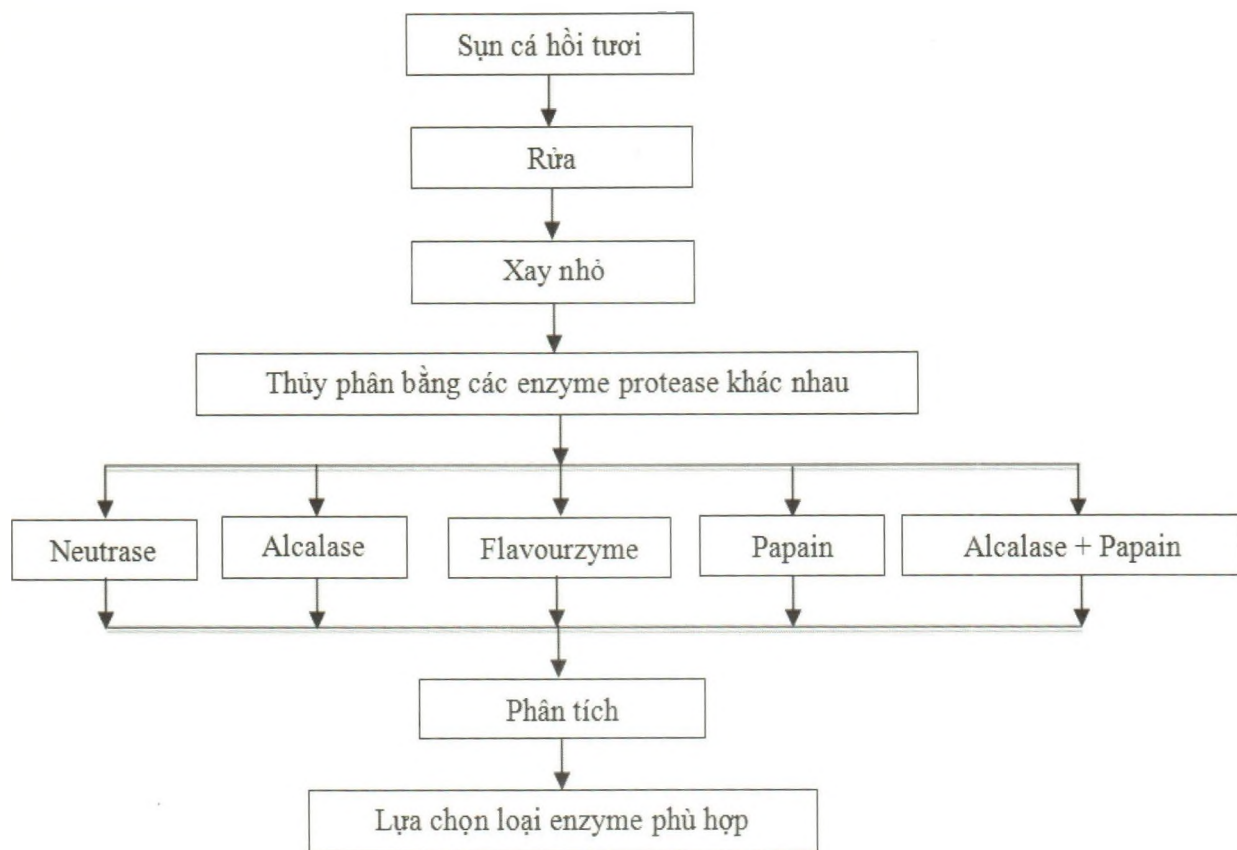
2.2.2. Phương pháp định lượng chondroitin sulfate (CS) bằng phương pháp so màu theo Farndale và cs (1986)

Nguyên lý của phương pháp định lượng chondroitin sulfate (CS) bằng phương pháp so màu theo Farndale và cs (1986) [9] là 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 525 nm. 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 .

2.2.3. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Bố trí thí nghiệm để lựa chọn enzyme protease thủy phân sụn cá hồi trắng được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Sơ đồ thí nghiệm lựa chọn loại enzyme protease thích hợp cho thủy phân sụn cá hồi

Sụn cá hồi đã xử lý được rã đông, rửa và xay nhỏ bằng máy xay và được sử dụng để làm nguyên liệu nghiên cứu thủy phân bằng các enzyme protease: neutrase, flavourzyme, alcalase, papain. Tiến hành 5 thí nghiệm thủy phân hỗn hợp sụn cá hồi bằng các enzyme protease khác nhau: Mẫu 1 thủy phân bằng enzyme neutrase, mẫu 2: thủy phân bằng enzyme alcalase, mẫu 3: thủy phân bằng enzyme flavourzyme, mẫu 4: thủy phân bằng enzyme papain và mẫu 5: thủy phân bằng hỗn hợp enzyme alcalase và papain theo tỷ lệ 1/1. Các mẫu thủy phân đều sử dụng 200 gram hỗn hợp sụn cá hồi, tỷ lệ enzyme sử dụng là 0,4% và lượng nước bổ sung là 200 ml, pH thủy phân là pH tự nhiên của hỗn hợp sụn cá hồi (pH 6,8) và nhiệt độ thủy phân 55°C. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ và 6 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 sulfate tạo thành. Kết

quả đánh giá là cơ sở để lựa chọn enzyme cho quá trình thủy phân.

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 Công nghiệp Thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh: 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 20 lít (Việt Nam),...

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

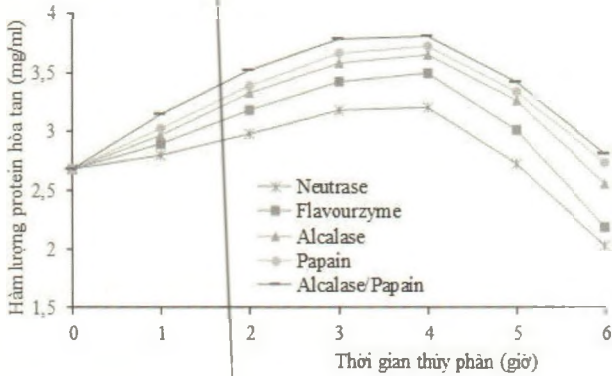
2.4. Phương pháp xử lý số liệu

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 thời gian thủy phân và loại enzym protease tới hàm lượng protein hòa tan

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân hỗn hợp sụn cá hồi bằng 5 loại enzym: neutrase, flavourzyme, alcalase, papain và hỗn hợp enzym alcalase - papain và sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ và 6 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. Sự thay đổi của hàm lượng protein hòa tan theo thời gian thủy phân và loại enzym protease

Hình 3 cho thấy, theo thời gian thủy phân hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân đều tăng nhưng mức độ tăng cũng khác nhau tùy thuộc vào loại enzym protease sử dụng trong thí nghiệm. Trong đó, hàm lượng protein hòa tan của mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain có mức độ tăng nhanh theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn so với các mẫu thủy phân khác, nhưng vẫn có thể thấy rõ: hàm lượng protein hòa tan thu được của tất cả các mẫu thủy phân sụn cá hồi đều tăng mạnh trong thời gian từ 1 - 4 giờ; nếu kéo dài thời gian thủy phân hơn 4 giờ thì hàm lượng protein hòa tan thu được bắt đầu giảm mạnh. Cụ thể, ở giai đoạn sau 1 giờ thủy phân, hàm lượng protein của mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain cao gấp 1,18 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,13 lần, 1,11 lần, 1,07 lần và 1,04 lần so với hàm lượng protein hòa tan tạo thành ở mẫu thủy phân bằng enzym neutrase, flavourzyme, alcalase và papain. Tại thời điểm sau 4 giờ thủy phân, hàm lượng protein của mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain có mức tăng cao nhất, cao gấp tới 1,43 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,40 lần, 1,37 lần, 1,31 lần và 1,20 lần so với hàm lượng protein hòa tan tạo

thành ở mẫu thủy phân bằng enzym neutrase, flavourzyme, alcalase và papain. Nhưng nếu tiếp tục kéo dài thời gian thủy phân > 4 giờ thì hàm lượng protein của tất cả các mẫu thủy phân sụn cá hồi đều giảm. Cụ thể, ở thời điểm sau 6 giờ thủy phân, hàm lượng protein hòa tan của mẫu thủy phân sụn cá hồi cũng chỉ cao gấp tương ứng 1,43 lần, 1,40 lần, 1,37 lần, 1,31 lần và 1,20 lần so với ban đầu ở mẫu thủy phân bằng enzym neutrase, flavourzyme, alcalase và papain. Điều này có thể lý giải: Sau 4 giờ thủy phân, protein hòa tan tiếp tục bị thủy phân thành peptid và axit amin nên hàm lượng protein hòa tan giảm nhanh. Kết quả này cho thấy, hỗn hợp enzym alcalase - papain có khả năng thủy phân hỗn hợp sụn cá hồi mạnh mẽ hơn so với các enzym papain, alcalase, flavourzyme và neutrase. Kết quả nghiên cứu cho thấy, papain và alcalase khi hoạt động một mình cũng có khả năng thủy phân hỗn hợp sụn cá hồi tốt hơn các enzym flavourzyme và neutrase.

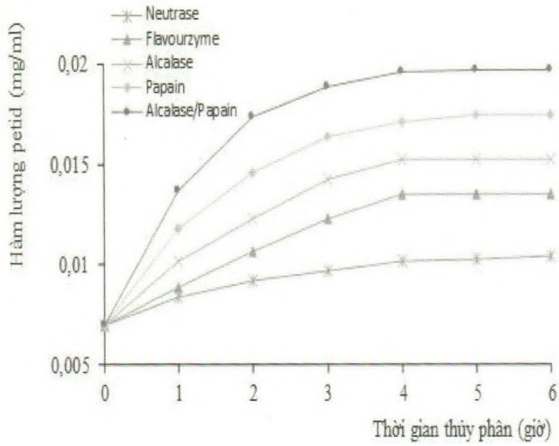
Kết quả này có thể lý giải: cấu trúc mô sụn nói chung và sụn cá hồi nói riêng, bên ngoài được bao bọc bằng các protein mô liên kết, không tan như elastin và bên trong là các protein không tan chứa các axit amin mạch bên có cực và kỵ nước [12]. Theo Đặng Thị Thu và cs (2012) [12], elastin là protein chỉ bị thủy phân bởi papain. Do vậy, khi sử dụng papain phối hợp với alcalase thì papain sẽ thủy phân protein mô liên kết tạo điều kiện cho alcalase phân cắt các protein nằm ở phía trong của cấu trúc mô. Khi bị protease phân cắt chuỗi polypeptid, chiều dài mạch của chuỗi polypeptid trong cấu trúc của protein giảm đi. Protein có cấu trúc phân tử càng nhỏ càng dễ tan trong nước [6, 12, 13]. Do vậy, hàm lượng protein hòa tan trong nước sẽ tăng theo thời gian tác động của enzym protease vào khối mô động vật [1, 4, 7]. Chính vì thế, theo thời gian thủy phân, hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong dung dịch tăng lên.

Từ những phân tích ở trên cho thấy, nếu xét theo khía cạnh hàm lượng protein hòa tan thì sử dụng hỗn hợp enzym alcalase - papain để thủy phân sụn cá hồi có ưu thế là tạo ra hàm lượng protein hòa tan trong dung dịch tăng nhanh theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn các enzym protease khác đã sử dụng.

3.2. Ảnh hưởng thời gian thủy phân và loại enzym protease tới hàm lượng peptid hòa tan

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân hỗn hợp sụn cá hồi bằng 5 loại enzym: neutrase, flavourzyme,

alcalase, papain và hỗn hợp enzym alcalase – papain và sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ và 6 giờ thủy phân, tiến hành lấy mẫu dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng peptid hòa tan. Kết quả được thể hiện trên hình 4.



Hình 4. Sự thay đổi của hàm lượng peptid theo thời gian thủy phân và loại enzym protease

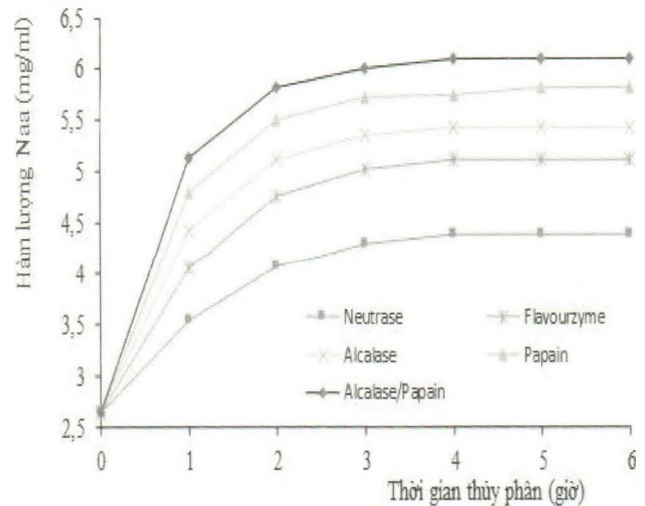
Kết quả phân tích ở hình 4 cũng gần giống như quy luật thay đổi của hàm lượng protein trong quá trình thủy phân, theo thời gian thủy phân hàm lượng peptid tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân đều tăng và mức độ tăng cũng khác nhau tùy thuộc loại enzym protease sử dụng. Trong đó, hàm lượng peptid của mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain tăng nhanh theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn so với các mẫu thủy phân khác. Cụ thể, sau 1 giờ thủy phân, hàm lượng peptid của mẫu thủy phân sử dụng hỗn hợp enzym alcalase - papain cao gấp 1,96 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,69 lần, 1,46 lần, 1,27 lần và 1,20 lần so với hàm lượng peptid tạo thành ở mẫu thủy phân bằng enzym neutrase, flavourzyme, alcalase và papain. Tương tự như vậy, sau 6 giờ thủy phân, hàm lượng peptid của mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain cao gấp tới 2,81 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 2,50 lần, 2,18 lần, 1,94 lần và 1,47 lần so với hàm lượng peptid tạo thành ở mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng enzym neutrase, flavourzyme, alcalase và papain. Mặt khác, kết quả ở trên còn cho thấy papain và alcalase có khả năng thủy phân protein sụn cá hồi tốt hơn các enzym flavourzyme và neutrase. Từ các phân tích ở trên cho thấy, hỗn hợp enzym alcalase - papain có khả năng thủy phân protein của sụn cá hồi mạnh mẽ hơn so với các enzym papain, alcalase, flavourzyme và neutrase khi sử dụng một mình.

Kết quả nghiên cứu cũng có những nét tương đồng với một số nghiên cứu đã công bố trước đây. Cụ thể, năm 2015, Vũ Ngọc Bội và cộng sự công bố nghiên cứu thủy phân protein moi biển (*Acetes sp.*) bằng hỗn hợp enzym alcalase - bromelin thì cho rằng sử dụng hỗn hợp enzym protease alcalase - bromelin để thủy phân protein moi biển sẽ cho hiệu quả thủy phân tốt hơn sử dụng một enzym protease đơn và quá trình thủy phân phụ thuộc vào tỷ lệ phối trộn giữa các enzym thành phần [4].

Từ những phân tích ở trên, khi xét theo khía cạnh hàm lượng peptid tạo thành trong quá trình thủy phân cao hơn thì sử dụng hỗn hợp enzym alcalase - papain để thủy phân sụn cá hồi sẽ tạo ra thành hàm lượng peptid trong dung dịch tăng mạnh theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn các enzym protease khác đã sử dụng.

3.3. Ảnh hưởng thời gian thủy phân và loại enzym protease tới hàm lượng Naa

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân hỗn hợp sụn cá hồi bằng 5 loại enzym: neutrase, flavourzyme, alcalase, papain và hỗn hợp enzym alcalase – papain và sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ và 6 giờ thủy phân, tiến hành lấy dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng Naa. Kết quả được thể hiện trên hình 5.



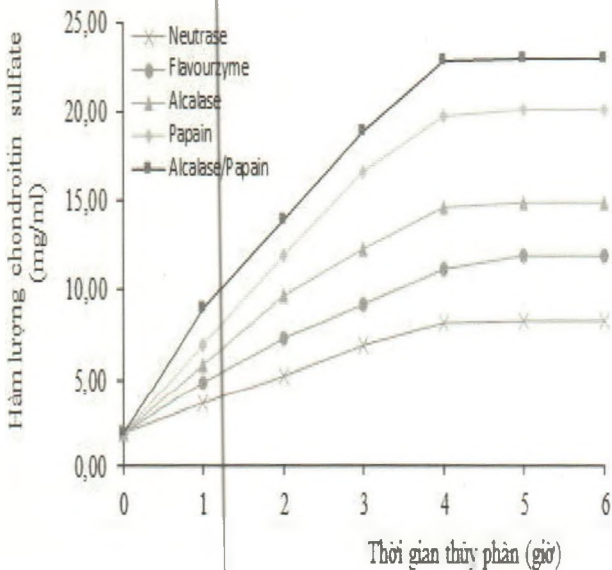
Hình 5. Sự thay đổi của hàm lượng Naa theo thời gian thủy phân và loại enzym protease

Kết quả phân tích ở hình 5 cũng giống như sự thay đổi của hàm lượng protein và peptid trong quá trình thủy phân, theo thời gian thủy phân hàm lượng Naa tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân đều tăng và mức độ tăng cũng khác nhau tùy thuộc loại

enzym protease sử dụng. Hàm lượng Naa của mẫu thủy phân bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain tăng nhanh theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn nhiều so với các mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng các enzym protease khác. Sau 6 giờ thủy phân, hàm lượng Naa của mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain cao gấp tới 2,31 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,66 lần, 1,93 lần, 2,06 lần và 2,20 lần so với hàm lượng Naa tạo thành ở mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng enzym neutrase, flavourzyme, alcalase và papain. Hỗn hợp enzym alcalase - papain có khả năng thủy phân protein của sụn cá hồi thành acid amin mạnh mẽ hơn so với các enzym papain, alcalase, flavourzyme và neutrase. Kết quả cũng cho thấy papain và alcalase cũng có khả năng thủy phân protein của sụn cá hồi thành acid amin tốt hơn các enzym flavourzyme và neutrase.

Từ những phân tích ở trên cho thấy, sử dụng hỗn hợp enzym alcalase - papain để thủy phân sụn cá hồi sẽ tạo thành dịch thủy phân có hàm lượng Naa cao hơn các enzym protease khác đã sử dụng.

3.4. Ảnh hưởng thời gian thủy phân và loại enzym protease tới hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành



Hình 6. Sự thay đổi của hàm lượng chondroitin sulfate theo thời gian thủy phân và loại enzym protease

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân hỗn hợp sụn cá hồi bằng 5 loại enzym: neutrase, flavourzyme, alcalase, papain và hỗn hợp enzym alcalase – papain và sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ và 6 giờ thủy phân, tiến hành lấy dịch thủy

phân để đánh giá hàm lượng chondroitin sulfate. Kết quả được thể hiện trên hình 6.

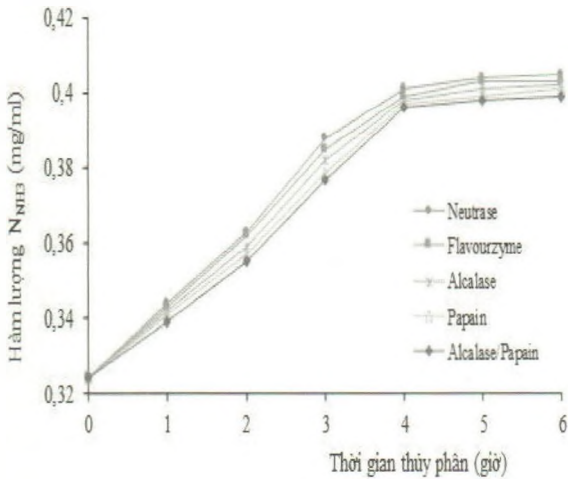
Từ kết quả phân tích ở hình 6 cũng giống như ở trên, theo thời gian thủy phân hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành ở tất cả các mẫu thủy phân đều tăng nhanh và mức độ tăng cũng khác nhau tùy thuộc loại enzym protease. Trong đó, hàm lượng chondroitin sulfate của mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain tạo thành tăng nhanh theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn so với các mẫu thủy phân bằng các enzym protease khác. Cụ thể, sau 6 giờ thủy phân, hàm lượng chondroitin sulfate của mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain cao gấp tới 12,19 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 4,43 lần, 6,36 lần, 7,95 lần và 10,78 lần so với hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành ở mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng enzym neutrase, flavourzyme, alcalase và papain. Kết quả này một lần nữa cho thấy hỗn hợp enzym alcalase - papain có khả năng thủy phân sụn cá hồi giải phóng chondroitin sulfate mạnh mẽ hơn so với các enzym papain, alcalase, flavourzyme và neutrase.

Kết quả này có thể được lý giải: trong cấu trúc của mô sụn chondroitin sulfate thường gắn kết với protein bằng liên kết o - glycosid tạo thành một proteoglycan (PG) (glucoprotein) [3, 5, 8, 9] nằm phía trong của mô sụn. Dưới tác động của enzym protease, cấu trúc mô sụn bị phá vỡ giải phóng ra chondroitin sulfate hòa tan trong nước. Do vậy, hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành ở mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng enzym tăng theo thời gian thủy phân.

Từ những phân tích ở trên cho thấy, sử dụng hỗn hợp enzym alcalase - papain thủy phân sụn cá hồi sẽ tạo ra hàm lượng chondroitin sulfate trong dịch thủy phân cao hơn các enzym protease khác đã sử dụng.

3.5. Ảnh hưởng thời gian thủy phân và loại enzym protease tới hàm lượng N_{NH_3}

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân hỗn hợp sụn cá hồi bằng 5 loại enzym: neutrase, flavourzyme, alcalase, papain và hỗn hợp enzym alcalase – papain và sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ và 6 giờ thủy phân, tiến hành lấy dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng N_{NH_3} . Kết quả được thể hiện trên hình 7.



Hình 7. Sự thay đổi của hàm lượng N_{NH_3} theo thời gian thủy phân và loại enzyme protease

Hình 7 cho thấy, hàm lượng N_{NH_3} tạo thành trong các mẫu thủy phân theo thời gian đều tăng nhưng mức độ tăng chậm và khác nhau không nhiều. Cụ thể, sau 6 giờ thủy phân, các mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng enzyme: neutrase, flavourzyme, alcalase, papain và hỗn hợp enzyme alcalase - papain có hàm lượng N_{NH_3} cao tương ứng so với ban đầu là 1,25 lần, 1,24 lần, 1,24 lần, 1,23 lần và 1,23 lần so với hàm lượng N_{NH_3} ban đầu. Kết quả này cho thấy, các mẫu thủy phân sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain, enzyme alcalase và papain có hàm lượng N_{NH_3} tạo thành thấp hơn không đáng kể so với các mẫu thủy phân khác và không có ý nghĩa thống kê. Kết quả nghiên cứu này khi so sánh với các nghiên cứu thủy phân sử dụng enzyme protease của Vũ Ngọc Bội và cộng sự (2015), Đinh Hữu Đông và cộng sự (2020), Trần Cảnh Đình và cộng sự (2010) [4, 7, 8] cũng cho quy luật tương tự đó là hàm lượng N_{NH_3} tạo thành trong các mẫu thủy phân theo thời gian đều tăng, nhưng mức độ tăng chậm ở các mẫu thí nghiệm và khác nhau không nhiều giữa các mẫu thí nghiệm.

Từ tất cả những phân tích ở trên cho thấy, sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain trong quá trình thủy phân sụn cá hồi sẽ tạo thành dịch thủy phân có hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa và chondroitin sulfate tạo thành theo thời gian thủy phân cao hơn các enzyme protease khác đã sử dụng như neutrase, alcalase, flavourzyme, papain. Mặt khác, hàm lượng N_{NH_3} tạo thành trong các mẫu thủy phân sụn cá hồi lại thấp và tương đương với nhau. Kết quả này cho phép lựa chọn hỗn hợp enzyme alcalase - papain làm tác nhân thủy phân sụn cá hồi (*Salmon salar*) để thu dịch thủy phân chứa

chondroitin sulfate và các thành phần khác.

4. KẾT LUẬN

Các enzyme: neutrase, alcalase, flavourzyme, papain và hỗn hợp enzyme alcalase - papain đều có khả năng thủy phân sụn cá hồi ở điều kiện pH tự nhiên, tỷ lệ enzyme bổ sung 0,4%, lượng nước bổ sung 100% và nhiệt độ thủy phân 55°C.

Trong cùng điều kiện thủy phân ở pH tự nhiên của hỗn hợp sụn cá hồi, lượng nước bổ sung 100%, tỷ lệ enzyme bổ sung 0,4% và nhiệt độ thủy phân 55°C, hỗn hợp enzyme alcalase - papain có khả năng thủy phân sụn cá hồi tạo thành lượng protein hòa tan, peptid, acid amin, chondroitin cao hơn nhiều lần so với các enzyme khác đã thử nghiệm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu quy trình thủy phân thu dịch đậm chứa chondroitin sulfate (CS) từ sụn cá hồi bằng hỗn hợp enzyme alcalase – papain” số 29/HĐ-DCT ngày 5/01/2021 của Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Kiều Anh, Nguyễn Hà Trung, Nguyễn Khách Hoàng Việt, Nguyễn Thị Hồng Loan, Phạm Kiên Cường (2017). Nghiên cứu các điều kiện thủy phân phụ phẩm cá hồi nhằm thu nhận peptid mạch ngắn có hoạt tính oxy hóa. *Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội*, số 1S, tập 33, Trang 7 - 13.
2. Amsbio (2021). Proteoglycans & Glycosaminoglycans Glycobiology Research - Hyaluronic Acid - Chondroitinase ABC - Assays - Enzymes – Antibodies. *AMS Biotechnology (Europe) Ltd - UK & Rest of World*, 184 Park Drive, Milton Park, Abingdon OX14 4SE, U.K.
3. 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: p. 7 - 11.
4. 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 enzyme alcalase – Bromelin thô. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Thủy sản*, Số 4/2015, Trường Đại học Nha Trang, trang 18 - 26.
5. Bruyere O & Reginster JY (2007). Glucosamine and chondroitin sulfate as therapeutic

agents for knee and hip osteoarthritis. *Drugs Aging*. 24 (7): p. 573 - 580.

6. Chervan, Munir & coworker (1984). *Protein hydrolysis*. University of Illinois Foundation, Urbana, IL, US.

7. Đinh Hữu Đông, Vũ Ngọc Bội, Nguyễn Thị Mỹ Trang (2020). Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và loại enzym 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 7, kỳ 1: Trang 96 - 102.

8. 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 Công nghệ sinh học - thủy sản, Viện Nghiên cứu Hải Sản, Hải Phòng.

9. Farndale W. R, Buttle D. J & Barrett A. J (1986). Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta*.

883: p. 173-177.

10. Itsuki M., Tadakazu T., Takashi B., Ryoichii S., Kaori H., Eun Y. P, Yasushi N. and Kenji S. (2008). *Uric acid lowering effect by ingestion of proteolytic digest of shark cartilage and its basic fraction*. Central Research Institute Maruha Nichiro Holdings, Tsukuba University, Japan, p.182 - 194.

11. Jayaraman J. (1998). Laboratory manual in biochemistry, *Wiley Eastern Limited*, 180 page.

12. Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Xuân Sâm (2012). *Công nghệ enzym*. Nxb Khoa học Kỹ thuật, 320 trang.

13. Viện Kiểm nghiệm Vệ sinh an toàn thực phẩm Quốc gia (2018). *Phương pháp kiểm nghiệm chất lượng và an toàn thực phẩm*. Nxb Khoa học Kỹ thuật, tập 1, 214 trang.

14. YakaNo. T, Ikawa N, and Ozimak L (2000). An economical method to extract chondroitin sulphate-peptide from bovine nasal cartilage. *Canadian agricultural engineering*, Vol. 42, No. 4, p. 205 - 208.

EFFECTS OF HYDROLYTIC TIME AND ENZYME TYPES TO THE HYDROLYTIC OF SALMON CARTILAGE COLLECT CHONDROITIN SULFATE BY PROTEASE

Đinh Hữu Đông, Nguyễn Công Bình

Summary

In this paper, we present a part of research results on hydrolyzing salmon cartilage (Salmon salar) by a mixture of enzymes alcalase - papain. The results showed that the enzymes: neutrase, alcalase, flavourzyme, papain and the alcalase - papain enzyme mixture were capable of hydrolysing the salmon cartilage mixture, but under the same test conditions, the alcalase - papain enzyme mixture was also able to hydrolyze the salmon cartilage mixture achieve higher hydrolysis efficiency than the above single enzymes. Specifically, under hydrolysis conditions at natural pH, 0.4% enzyme ratio, 100% water addition and 55°C hydrolysis temperature, alcalase - papain enzyme mixture is able to hydrolyze salmon cartilage hydrolyzate containing soluble proteins, peptides, amino acids, chondroitin sulfate, respectively 1.43 times higher, 2.81 times, 2.31 times, 12.19 times more than the original.

Keywords: *Neutrase, alcalase, flavourzyme, papain, chondroitin sulfate, salmon cartilage, hydrolysis.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Mỹ Hương

Ngày nhận bài: 21/3/2022

Ngày thông qua phản biện: 21/4/2022

Ngày duyệt đăng: 27/4/2022