

ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN THỦY PHÂN VÀ LOẠI ENZYM 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: neutrase, 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: Neutrase, 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 NH_3 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 Na_2CO_3 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 Na_2CO_3 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 Dimethylmethylen) 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),