

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG**

ĐINH HỮU ĐÔNG

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT BỘT ĐẠM THỦY PHÂN
CHỨA CHONDROITIN SULFATE TỪ SỤN CÁ MẬP
TRẮNG (*CARCHARHINUS DUSSUMIERI*)
BẰNG ENZYME PROTEASE**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

KHÁNH HÒA - 2021

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG**

ĐINH HỮU ĐÔNG

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT BỘT ĐẠM THỦY PHÂN
CHỨA CHONDROITIN SULFATE TỪ SỤN CÁ MẬP
TRẮNG (*CARCHARHINUS DUSSUMIERI*)
BẰNG ENZYME PROTEASE**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Chuyên ngành : Công nghệ Chế biến Thủy sản
Mã số : 9540105
Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Vũ Ngọc Bội
PGS.TS. Nguyễn Anh Tuấn

KHÁNH HÒA - 2021

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của cá nhân tôi. Các số liệu, kết quả nêu trong Luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ một công trình nghiên cứu nào trước đó.

Đinh Hữu Đông

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành Luận án này

Trước hết tôi xin gửi tới Ban Giám hiệu, Lãnh đạo phòng Đào tạo Sau đại học và Ban Chủ nhiệm Khoa Công nghệ Thực phẩm sự kính trọng, niềm tự hào được học tập và nghiên cứu tại Trường trong những năm qua.

Sự biết ơn sâu sắc nhất tôi xin được giành cho PGS.TS. Vũ Ngọc Bội - Trưởng Khoa Công nghệ Thực phẩm - Trường Đại học Nha Trang và PGS. TS. Nguyễn Anh Tuấn - Bộ môn Công nghệ Chế biến Thủy sản đã hết lòng hướng dẫn, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Xin chân thành cảm ơn các thầy cô phản biện đã góp ý và cho những lời khuyên quý báu để luận án hoàn thành với chất lượng cao

Xin cảm ơn Lãnh đạo Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm - TP. Hồ Chí Minh đã cho tôi đi học và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận án.

Xin gửi lời cảm ơn các thầy cô giáo trong Khoa Công nghệ Thực phẩm đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập tại trường.

Đặc biệt, xin ghi nhớ và tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến gia đình, người thân và bạn bè đã quan tâm, chia sẻ khó khăn và động viên tôi để tôi hoàn thành luận án.

MỤC LỤC

	Trang
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG	v
DANH MỤC CÁC HÌNH	vi
TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	xii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	4
1.1. GIỚI THIỆU VỀ CHONDROITIN SULFATE VÀ ỨNG DỤNG.....	4
1.2. TÌNH HÌNH KHAI THÁC VÀ SỬ DỤNG SỤN CÁ MẬP	12
1.3. MỘT SỐ NGHIÊN CỨU VỀ THỦY PHÂN SỤN CÁ MẬP	14
1.4. GIỚI THIỆU VỀ KỸ THUẬT SẤY PHUN	17
CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU	19
2.1.1. Sụn cá mập.....	19
2.1.2. Enzyme protease.....	19
2.1.3. Chất mang.....	20
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	20
2.2.1. Các phương pháp nghiên cứu protease và chondroitin sulfate.....	20
2.2.2. Các phương pháp phân tích hóa học	23
2.2.3. Các phương pháp phân tích cấu trúc	24
2.2.4. Phương pháp định lượng vi sinh vật.....	24
2.3. PHƯƠNG PHÁP BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM	25
2.3.1. Phương pháp tiếp cận các nội dung nghiên cứu.....	25
2.3.2. Bố trí thí nghiệm xác định các thông số của quá trình nghiên cứu	27
2.4. HÓA CHẤT VÀ CÁC THIẾT BỊ THÍ NGHIỆM CHỦ YẾU ĐÃ SỬ DỤNG.....	41
2.5. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU	42

CHƯƠNG III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	43
3.1. NGHIÊN CỨU THỦY PHÂN SỤN CÁ MẬP (C. DUSSUMIERI) BẰNG ENZYME PROTEASE	43
3.1.1. Phân tích thành phần cơ bản của sụn cá mập trắng	43
3.1.2. Xác định loại enzyme protease thích hợp cho quá trình thủy phân	43
3.1.3. Xác định tỷ lệ enzyme alcalase/papain thích hợp cho quá trình thủy phân	50
3.1.4. Xác định nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain thích hợp cho quá trình thủy phân	56
3.1.5. Xác định tỷ lệ nước bổ sung thích hợp cho quá trình thủy phân.....	63
3.1.6. Xác định pH thích hợp cho quá trình thủy phân	69
3.1.7. Xác định nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân	76
3.1.8. Xác định thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân	83
3.1.9. Tối ưu hóa quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain.....	87
3.1.10. Đề xuất quy trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase papain	95
3.2. ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG DỊCH THỦY PHÂN SỤN CÁ MẬP BẰNG HỖN HỢP ENZYME ALCALASE - PAPAIN VÀ PHÂN TÍCH CẤU TRÚC CỦA CHONDROITIN SULFATE.....	97
3.2.1. Đánh giá chất lượng dịch thủy phân sụn cá mập.....	97
3.2.2. Phân tích cấu trúc chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân sụn cá mập	100
3.3. NGHIÊN CỨU SẤY PHUN TẠO BỘT ĐẠM THỦY PHÂN CHỨA CHONDROITIN SULFATE	121
3.3.1. Xác định chất mang thích hợp cho quá trình sấy phun	121
3.3.2. Xác định tỉ lệ chất mang thích hợp cho quá trình sấy phun	124
3.3.3. Xác định nhiệt độ không khí buồng sấy thích hợp	125
3.3.4. Xác định tốc độ bơm nhập liệu.....	128
3.3.5. Xác định áp suất buồng sấy	130
3.3.6. Tối ưu hóa quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập	133

3.3.7. Đề xuất quy trình sản xuất và đánh giá chất lượng bột đạm chứa chondroitin sulfate từ sụn cá mập	139
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT Ý KIẾN.....	143
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	145
TÀI LIỆU THAM KHẢO	146
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Naa	: Hàm lượng nitơ acid amin
N _{NH3}	: Nitơ NH ₃ .
N _{TS}	: Nitơ tổng số
pH _{opt}	: pH thích hợp.
t _{opt}	: Nhiệt độ thích hợp
V	: Thể tích.
E	: Enzyme
[E]	: Nồng độ enzyme
GAG	: Glycosaminoglycan
GalNAc	: N-acetyl-D- galactosamine
GlcA	: D-glucuronic acid
CS	: Chondroitin sulfate
CTAB	: Cetyltrimethylammonium bromide
CS4	: Chondroitin-4-sulphate (dermatant sulphate)
CS6	: Chondroitin-6-sulphate
CPC	: Cetylpyridium chloride
HPLC	: (High Performance Liquid Chromatography) Sắc ký lỏng hiệu năng cao
FT-IR	: (Fourrier Transformation InfraRed) Quang phổ hồng ngoại
COSY	: (Correlation Spectroscopy) Phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều COSY
HSQC	:(Heteronuclear Single Quantum Cohenrence) Phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều HSQC
HMBC	: (Heteronuclear Muntiple-Bond Correlation) Phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều HMBC
NMR	: (Nuclear Magnetic Resonance) Phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều NMR

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Phân loại chondroitin sulfate.....	7
Bảng 1.2. Hàm lượng chondroitin sulfate của một số loại sụn động vật	9
Bảng 2.1. Mã hóa biến nồng độ enzyme, nhiệt độ, thời gian thủy phân và các mức độ khảo sát	34
Bảng 2.2. Mã hóa biến nhiệt độ buồng sấy, tỷ lệ maltodextrin bổ sung, tốc độ nhập liệu và các mức độ khảo sát.....	40
Bảng 3.1. Kết quả phân tích một số chỉ tiêu hóa học cơ bản của sụn cá mập trắng	43
Bảng 3.2. Bảng ma trận thực nghiệm ảnh hưởng của biến mã hóa tới hiệu suất thủy phân tạo chondroitin sulfate	88
Bảng 3.3. Kết quả phân tích phương sai và hệ số tuyến tính, tương tác và bình phương của các phương trình hồi quy để dự đoán mức độ ảnh hưởng của các nhân tố thủy phân đến hàm mục tiêu.....	89
Bảng 3.4. Thành phần hóa học và năng lượng của dịch thủy phân sụn cá mập.....	98
Bảng 3.5. Trạng thái cảm quan của dịch thủy phân	99
Bảng 3.6. Kết quả phân tích một số chỉ tiêu vi sinh của dịch thủy phân sụn cá mập ...	99
Bảng 3.7. Bảng gán các tín hiệu dị nhân proton H/C trên phổ HSQC	107
Bảng 3.8. Bố trí thí nghiệm và kết quả qui hoạch trực tâm quay (RCCD) của hàm mục tiêu Y (hiệu suất thu chondroitin sulfate) theo biến nhiệt độ buồng sấy (X_4), tỷ lệ maltodextrin (X_5) và tốc độ nhập liệu (X_6)	133
Bảng 3.9. Kết quả phân tích phương sai và hệ số tuyến tính, tương tác và bình phương của các phương trình hồi quy để dự đoán mức độ ảnh hưởng của các nhân tố sấy đến hàm mục tiêu	137
Bảng 3.10. Kết quả tối ưu hóa hiệu suất thu chondroitin sulfate theo biến X_4 , X_5 , X_6 .	137
Bảng 3.11. Giá trị tối ưu của hàm mục tiêu hiệu suất thu chondroitin sulfate theo nhiệt độ, tỷ lệ maltodextrin và tốc độ nhập liệu tìm được từ mô hình dự đoán	138
Bảng 3.12. Kết quả một số chỉ tiêu hóa học của bột đậm thủy phân	141
Bảng 3.13. Kết quả phân tích một số chỉ tiêu vi sinh của bột đậm chứa chondroitin sulfate .	141

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hoá học của một đơn vị trong chuỗi chondroitin sulfate	5
Hình 1.2. Cấu trúc mạch của các chondroitin sulfate.....	5
Hình 1.3. Cấu trúc một đơn vị của chondroitin sulfate A	6
Hình 1.4. Cấu trúc của chondroitin sulfate B	6
Hình 1.5. Cấu trúc của chondroitin sulfate - C (GlcA-GalNAc-6S) - CS6	6
Hình 1.5. Hình ảnh về một số sản phẩm từ sụn cá mập	14
Hình 2.1. Hình ảnh sụn cá mập trước và sau khi xử lý	19
Hình 2.2. Sơ đồ cách tiếp cận các nội dung nghiên cứu	25
Hình 2.3. Sơ đồ thí nghiệm lựa chọn loại enzyme protease thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập	27
Hình 2.4. Sơ đồ thí nghiệm lựa chọn tỷ lệ hỗn hợp enzyme thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập	28
Hình 2.5. Sơ đồ thí nghiệm xác định nồng độ hỗn hợp enzyme protease thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập	29
Hình 2.6. Sơ đồ thí nghiệm xác định tỉ lệ nước bổ sung thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập	30
Hình 2.7. Sơ đồ thí nghiệm xác định pH thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập.....	31
Hình 2.8. Sơ đồ thí nghiệm xác định nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập	32
Hình 2.9. Sơ đồ thí nghiệm xác định biên thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập	33
Hình 2.10. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định loại chất mang phù hợp	36
Hình 2.11. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định tỉ lệ chất mang bổ sung.....	37
Hình 2.12. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định nhiệt độ buồng sấy thích hợp.....	38
Hình 2.13. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định áp suất buồng sấy thích hợp	39
Hình 2.14. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định tốc độ nhập liệu thích hợp	40
Hình 3.1. Sự thay đổi của hàm lượng protein theo thời gian thủy phân và loại enzyme	

protease	44
Hình 3.2. Sự thay đổi của hàm lượng peptid theo thời gian thủy phân và loại enzyme protease	44
Hình 3.3. Sự thay đổi của hàm lượng Naa theo thời gian thủy phân và loại enzyme protease	45
Hình 3.4. Sự thay đổi của hàm lượng chondroitin sulfate theo thời gian thủy phân và loại enzyme protease	45
Hình 3.5. Sự thay đổi của hàm lượng N_{NH_3} theo thời gian thủy phân và loại enzyme protease	46
Hình 3.6. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và tỷ lệ alcalase/papain đến hàm lượng protein tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập.....	51
Hình 3.7. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và tỷ lệ alcalase/papain đến hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập	51
Hình 3.8. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và tỷ lệ alcalase/papain đến hàm lượng Naa tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập.....	52
Hình 3.9. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và tỷ lệ alcalase/papain đến hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập	52
Hình 3.10. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và tỷ lệ alcalase/papain đến hàm lượng N_{NH_3} tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập	53
Hình 3.11. 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.....	57
Hình 3.12. 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	57
Hình 3.13. 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.....	58
Hình 3.14. Ảnh hưởng của nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain và thời gian thủy phân đến hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập ..	58
Hình 3.15. 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 sụn cá mập	59
Hình 3.16. Ảnh hưởng của tỉ lệ sụn/nước bổ sung và thời gian thủy phân đến hàm lượng	

protein hòa tan của dịch thủy phân sụn cá mập.....	65
Hình 3.17. Ảnh hưởng của tỉ lệ sụn/nước bổ sung và thời gian thủy phân đến hàm lượng peptid của dịch thủy phân sụn cá mập.....	65
Hình 3.18. Ảnh hưởng của tỉ lệ sụn/nước bổ sung và thời gian thủy phân đến hàm lượng Naa của dịch thủy phân sụn cá mập	66
Hình 3.19. Ảnh hưởng của tỉ lệ sụn/nước bổ sung và thời gian thủy phân đến hàm lượng chondroitin sulfate của dịch thủy phân sụn cá mập.....	66
Hình 3.20. Ảnh hưởng của tỉ lệ sụn/nước bổ sung và thời gian thủy phân đến hàm lượng N_{NH_3} của dịch thủy phân sụn cá mập	67
Hình 3.21. Ảnh hưởng của pH và thời gian thủy phân đến hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân sụn cá mập.....	71
Hình 3.22. Ảnh hưởng của pH và thời gian thủy phân đến hàm lượng peptid của dịch thủy phân sụn cá mập	72
Hình 3.23. Ảnh hưởng của pH và thời gian thủy phân đến hàm lượng Naa của dịch thủy phân sụn cá mập	72
Hình 3.24. Ảnh hưởng của pH và thời gian thủy phân đến hàm lượng chondroitin sulfate của dịch thủy phân sụn cá mập.....	73
Hình 3.25. Ảnh hưởng của pH và thời gian thủy phân đến hàm lượng N_{NH_3} của dịch thủy phân sụn cá mập	73
Hình 3.26. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian thủy phân đến hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân sụn cá mập.....	78
Hình 3.27. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian thủy phân đến hàm lượng peptid của dịch thủy phân sụn cá mập	78
Hình 3.28. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian thủy phân đến hàm lượng Naa của dịch thủy phân sụn cá mập	79
Hình 3.29. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian thủy phân đến hàm lượng chondroitin sulfate của dịch thủy phân sụn cá mập	79
Hình 3.30. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian thủy phân đến hàm lượng N_{NH_3} của dịch thủy phân sụn cá mập	80
Hình 3.31. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng protein hòa tan trong dịch	

thủy phân sụn cá mập	83
Hình 3.32. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng peptid trong dịch thủy phân sụn cá mập	84
Hình 3.33. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng Naa trong dịch thủy phân sụn cá mập	84
Hình 3.34. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng chondroitin sulfate trong dịch thủy phân sụn cá mập	84
Hình 3.35. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng N_{NH_3} trong dịch thủy phân sụn cá mập	85
Hình 3.36. Mối tương quan giữa mô hình dự đoán và thực nghiệm của các biến độc lập tới hiệu suất thủy phân tạo chondroitin sulfate cao	89
Hình 3.37. Sự thiếu phù hợp của mô hình thông qua chỉ số (lack of fit >0,05).....	90
Hình 3.38. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nồng độ enzyme (X_1) và nhiệt độ (X_2) đến hiệu suất thủy phân thu chondroitin sulfate	92
Hình 3.39. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nồng độ enzyme (X_1) và thời gian (X_3) đến hiệu suất thủy phân tạo chondroitin sulfate cao.....	92
Hình 3.40. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nhiệt độ (X_2) và thời gian (X_3) đến hiệu suất thủy phân tạo chondroitin sulfate cao	92
Hình 3.41. Mối tương quan giữa mô hình lý thuyết và thực nghiệm của các nhân tố thủy phân đến quá trình thủy phân tạo chondroitin sulfate	95
Hình 3.42. Sơ đồ quy trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain	96
Hình 3.43. Hình ảnh về dịch thủy phân sụn cá mập.....	97
Hình 3.44. Kết quả xác định các nhóm chức của chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân sụn cá mập dựa vào phổ FT-IR.....	100
Hình 3.45. Dự đoán nhóm chức trong cấu trúc chondroitin sulfate từ sụn cá mập.....	101
Hình 3.46. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate thu được bằng phổ 1H -NMR với độ dịch chuyển hóa học proton từ 0ppm ÷ 5,5ppm.....	103
Hình 3.47. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate thu được bằng phổ 1H -NMR với	

độ dịch chuyển hóa học proton từ 2,9ppm ÷ 4,9ppm.....	104
Hình 3.48. Phổ ^{13}C -NMR của chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân từ sụn cá mập	105
Hình 3.49. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate thu được bằng phổ ^{13}C -NMR với độ dịch chuyển hóa học proton từ 50ppm ÷ 105ppm.....	106
Hình 3.50. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate thu được bằng phổ ^{13}C -NMR với độ dịch chuyển hóa học proton từ 67ppm ÷ 82ppm.....	106
Hình 3.51. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HSQC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 4.3 ÷ 5.3ppm và C từ 76 ÷ 106ppm.....	109
Hình 3.52. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HSQC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 3,1 ÷ 4,5ppm và C từ 50 ÷ 85ppm	110
Hình 3.53. Cấu trúc chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân từ sụn cá mập	112
Hình 3.54. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ COSY với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 1,0 ÷ 5,5ppm và C từ 1,0 ÷ 5,5ppm	113
Hình 3.55. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HSQC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 3,1 ÷ 5,4ppm và C từ 3,1 ÷ 5,3ppm	113
Hình 3.56. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HSQC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 3,2 ÷ 4,8ppm và C từ 3,2 ÷ 4,8ppm	114
Hình 3.57. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HMBC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 1,7 ÷ 5,5ppm và C từ 10 ÷ 200ppm.....	116
Hình 3.58. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HMBC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 3,1 ÷ 5,4ppm và C từ 40 ÷ 110ppm	117
Hình 3.59. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HMBC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 3,4 ÷ 4,7ppm và C từ 50 ÷ 85ppm	118
Hình 3.60. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HMBC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 3,2 ÷ 4,0ppm và C từ 60 ÷ 105ppm	119
Hình 3.61. Cấu trúc chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân sụn cá mập.....	121
Hình 3.62. Ảnh hưởng của chất mang đến hàm lượng nitơ tổng của bột đậm.....	122
Hình 3.63. Ảnh hưởng của loại chất mang đến hàm lượng chondroitin sulfate của bột	

đạm	122
Hình 3.64. Ảnh hưởng của chất trợ sấy đến hiệu suất thu hồi bột đạm	122
Hình 3.65. Ảnh hưởng của tỉ lệ maltodextrin sử dụng đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate.....	124
Hình 3.66. Ảnh hưởng của tỉ lệ maltodextrin sử dụng đến hiệu suất thu hồi bột đạm	125
Hình 3.67. Ảnh hưởng của nhiệt độ buồng sấy đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate	126
Hình 3.68. Ảnh hưởng của nhiệt độ buồng sấy đến hiệu suất thu hồi bột đạm	126
Hình 3.69. Ảnh hưởng của nhiệt độ buồng sấy đến độ ẩm của bột đạm.....	126
Hình 3.70. Ảnh hưởng của tốc độ bơm nhập liệu đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate	128
Hình 3.71. Ảnh hưởng của tốc độ bơm nhập liệu đến hiệu suất thu hồi bột đạm.....	129
Hình 3.72. Ảnh hưởng của tốc độ bơm nhập liệu đến độ ẩm bột đạm sau sấy	129
Hình 3.73. Ảnh hưởng của áp suất buồng sấy đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate	131
Hình 3.74. Ảnh hưởng của áp suất buồng sấy đến hiệu suất thu hồi bột đạm	131
Hình 3.75. Ảnh hưởng của áp suất buồng sấy đến độ ẩm của bột đạm	131
Hình 3.76. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nhiệt độ buồng sấy (X_4) và tỷ lệ maltodextrin (X_5) đến hiệu suất thu chondroitin sulfate	134
Hình 3.77. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nhiệt độ buồng sấy (X_4) và tốc độ nhập liệu (X_6) đến hiệu suất thu chondroitin sulfate	135
Hình 3.78. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa tỷ lệ maltodextrin (X_5) và tốc độ nhập liệu (X_6) đến hiệu suất thu chondroitin sulfate	135
Hình 3.79. Mối tương quan giữa mô hình lý thuyết và thực nghiệm của các nhân tố sấy đến quá trình sấy phun tạo bột đạm từ dịch thủy phân sụn cá mập.....	138
Hình 3.80. Sơ đồ quy trình quy trình sản xuất bột đạm chứa chondroitin sulfate từ sụn cá mập trắng bằng enzyme protease.....	139
Hình 3.81. Giảm độ phân tích nhiệt vi sai của bột đạm chứa chondroitin sulfate	141

TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Đề tài luận án: *Nghiên cứu sản xuất bột đậm thủy phân chứa chondroitin sulfate từ sụn cá mập trắng (Carcharhinus dussumieri) bằng enzyme protease*

Chuyên ngành: Công nghệ Chế biến Thủy sản

Mã số: 9540105

Nghiên cứu sinh: Đinh Hữu Đông.

Khóa: 2014

Người hướng dẫn: 1. PGS.TS. Vũ Ngọc Bội

2. PGS.TS. Nguyễn Anh Tuấn

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Nha Trang

Nội dung:

Luận án đã thu được một số kết quả mới bổ sung vào lĩnh vực nghiên cứu thủy phân và tạo bột đậm thủy phân chứa chondroitin sulfate từ sụn cá mập (*C. dussumieri*) định hướng ứng dụng trong thực phẩm chức năng:

1) *Xác định được các thông số tối ưu cho quá trình thủy phân sụn cá mập là: tổ hợp enzyme Alcalase: Papain với tỷ lệ 60/40, nồng độ 0,3%; Tỷ lệ nguyên liệu: nước là 1/1; pH thích hợp là 6,8; nhiệt độ thủy phân là 50°C trong thời gian 20 giờ. Hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate là 96,97%. Dịch đậm thủy phân có năng lượng dinh dưỡng: 20,42 Kcal/100 ml, hàm lượng chondroitin sulfate: 40,5 mg/ml, Nitơ tổng số: 7,46 g/l, khoáng tổng số: 3,02 g/l, Zn: 7,63 mg/l, Mg: 205 mg/l, Fe: 4,78 mg/l, dịch có chứa 18 loại acid amin và đạt tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm theo quy định hiện hành của Bộ Y tế.*

2) *Xác định được cấu trúc đặc trưng bảo toàn cả hai gốc sulfate C4 và C6 của sản phẩm chondroitin sulfate. Sản phẩm là hỗn hợp gồm 2 đồng phân GlcA-GalNAc-4SO₃- và GlcA-GalNAc-6SO₃-.*

3) *Xác định được các thông số tối ưu cho quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập là: 12% chất mang maltodextrin, nhiệt độ buồng sấy là 80°C, tốc độ dòng 12 ml/phút và áp suất buồng sấy 2,5bar. Hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate là 87,81%. Sản phẩm có hàm lượng chondroitin sulfate là 203mg/g, nito tổng số 5,04g/100g, tro tổng số 3,95g/100g, độ ẩm 4,27% và đạt tiêu chuẩn vi sinh vật dùng trong thực phẩm theo quy định của Bộ Y tế.*

4) *Xác định được qui trình sản xuất bột đạm thủy phân chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập tươi bằng enzyme protease ở quy mô thí nghiệm. Sản phẩm bột đạm chứa chondroitin sulfate đạt tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm theo quy định hiện hành của Bộ Y tế.*

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN

NGHIÊN CỨU SINH

PGS.TS. Vũ Ngọc Bội

PGS.TS. Nguyễn Anh Tuấn

Đinh Hữu Đông

MỞ ĐẦU

Chondroitin sulfate là thành phần cơ bản cấu tạo nên sụn khớp và 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. Chondroitin sulfate cũng làm tăng sản xuất chất nhầy và khả năng bôi trơn của dịch khớp, đảm bảo sự vận động linh hoạt của khớp [21, 23]. Chondroitin sulfate còn có vai trò bảo vệ sụn khớp bằng cách ức chế các enzyme phá hủy sụn khớp như collagenase, phospholipase A₂, N-acetylglucosaminidase. Vì vậy, chondroitin sulfate được sử dụng để hỗ trợ điều trị các bệnh lý về xương khớp và hạn chế quá trình thoái hóa sụn khớp. Ngoài ra, chondroitin sulfate cũng góp phần nuôi dưỡng và tái tạo các tế bào của giác mạc mắt [21, 23, 39].

Chondroitin sulfate chủ yếu được thu nhận từ các nguồn nguyên liệu tự nhiên, trong đó, có sụn cá mà đặc biệt là sụn cá mập do sụn cá mập thường có hàm lượng chondroitin sulphat cao hơn sụn các loại động vật khác [21, 39]. Chính vì thế, người ta thường sử dụng sụn cá mập dưới dạng bột khô trong sản xuất viên nén thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị các bệnh xương khớp [39, 43, 47÷49]. Tuy thế, trong sụn cá mập, chondroitin sulfate thường liên kết với protein bằng liên kết o-glycosid tạo thành phức hợp proteoglycan (glucoprotein) nằm trong cấu trúc của mô sụn nên con người rất khó hấp thụ [21, 23, 24, 63]. Hiện có một số nghiên cứu sử dụng tác nhân hóa học hoặc enzyme thủy phân sụn cá khô hoặc tươi sau đó kết tủa thu chondroitin sulfate dùng trong sản xuất thực phẩm chức năng [23, 39, 42, 63÷70]. Tuy vậy, việc chỉ thu nhận chondroitin sulfate dẫn đến sự lãng phí các chất tự nhiên từ sụn cá và hiệu quả sử dụng trong điều trị các bệnh lý về xương khớp không cao cũng như giá thành sản phẩm cao nên hiệu quả hạn chế [23, 39, 42, 44, 45, 63÷70]. Để khắc phục hiện tượng này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu sử dụng enzyme trong thủy phân sụn cá mập tươi với mong muốn tạo ra dịch thủy phân chứa các chất tự nhiên từ sụn cá và chondroitin sulphat để định hướng sử dụng làm thực phẩm chức năng cung cấp các thành phần thiết yếu giúp hỗ trợ điều trị bệnh lý xương khớp và chống thoái hóa xương khớp.

Việt Nam có bờ biển dài hơn 3260km, sản lượng khai thác thủy sản lớn và trong quá trình khai thác thủy sản, số lượng cá mập mắc lưới khá lớn [14, 23, 26, 27]. Hiện cá mập được người dân sử dụng để thu cước cá phần còn lại chiếm tỷ trọng lớn là sụn cá

và vì cá thường phơi khô bán cho thương lái Trung Quốc với giá rẻ [38]. Ở Việt Nam, việc nghiên cứu thủy phân sụn cá mập tươi còn rất mới mẻ và chưa có một công trình nào đề cập đến vấn đề này. Do vậy, Luận án tiến hành: “*Nghiên cứu sản xuất bột đạm thủy phân chứa chondroitin sulfate từ sụn cá mập trắng (Carcharhinus dussumieri) bằng enzyme protease*”.

Mục đích của luận án:

Tận dụng nguồn nguyên liệu còn lại - sụn cá mập tươi trong chế biến tạo dịch thủy phân và bột đạm chứa chondroitin sulfate và các chất tự nhiên từ sụn cá mập (*C. dussumieri*) bằng công nghệ sử dụng enzyme protease thân thiện với môi trường để định hướng sử dụng làm thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị chống thoái hóa xương khớp.

Nội dung nghiên cứu của luận án:

- 1) *Nghiên cứu thủy phân sụn cá mập (C. dussumieri) bằng enzyme protease.*
- 2) *Đánh giá chất lượng dịch thủy phân sụn cá mập và xác định cấu trúc chondroitin sulfate.*
- 3) *Nghiên cứu sấy phun tạo bột đạm thủy phân chứa chondroitin sulfate.*

Ý nghĩa khoa học của luận án:

Luận án lần đầu tiên tiến hành nghiên cứu một cách toàn diện từ công đoạn thủy phân sụn cá mập tươi, ... cho tới nghiên cứu sấy khô tạo bột đạm thủy phân chứa chondroitin sulfate. Do vậy luận án có ý nghĩa về khoa học, thể hiện ở chỗ đã chứng minh rằng có thể thủy phân sụn cá mập bằng tổ hợp enzyme protease và thu dịch thủy phân chứa các chất dinh dưỡng từ sụn cá mập để ứng dụng trong thực phẩm và sấy phun tạo bột đạm thủy phân chứa chondroitin sulfate, đây một sản phẩm hoàn toàn mới trước đây chưa có ai nghiên cứu. Mặt khác các số liệu nghiên cứu của luận án là thông tin khoa học có giá trị và tài liệu tham khảo phục vụ cho việc giảng dạy, các học viên cao học và nghiên cứu sinh quan tâm tới lĩnh vực này.

Ý nghĩa thực tiễn của luận án:

Luận án lần đầu tiên tạo ra dịch thủy phân sụn cá mập và sản phẩm bột đạm thủy phân chứa chondroitin sulfate, dễ hấp thụ và tiện lợi khi sử dụng làm thực phẩm chức năng. Đặc biệt sản phẩm bột đạm thủy phân chứa chondroitin sulfate thích hợp cho

những người bị bệnh về xương khớp, hơn nữa sản phẩm khô dễ bảo quản và vận chuyển. Do vậy, luận án có ý nghĩa thực tiễn cao là cơ sở cho việc định hướng sản xuất thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị chống thoái hóa xương khớp.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. GIỚI THIỆU VỀ CHONDROITIN SULFATE VÀ ỨNG DỤNG

1.1.1. Cấu trúc chondroitin sulfate

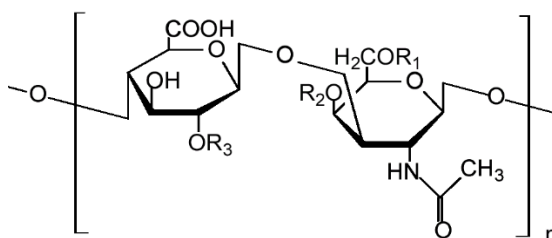
Chondroitin sulfate (CS) là một polysaccharid, thuộc nhóm heteropolysaccharid gọi là glycosaminoglycan (GAG), được tìm thấy trong tự nhiên ở dạng một polyme mạch thẳng gồm các đơn vị cơ bản được cấu tạo bởi 2 loại đường là N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) và D-glucuronic acid (GlcA) xen kẽ nhau (polymeric D-galactosamine and D-glucuronic acid). Các gốc đường này có thể được sulphate hóa hay không bị sulphate hoá [23, 63], một số gốc GlcA bị epime hoá thành L-iduronic acid (IdoA). Chondroitin sulfate là một polyme tự nhiên có chứa 15÷150 đơn vị cấu trúc của đơn vị cơ bản gồm 2 loại đường là GlcA và GalNAc. Khối lượng phân tử của CS thường biến động trong khoảng 10.000 ÷ 100.000 Dalton [23, 37, 57, 65, 79, 84, 85].

Năm 1950, Julia Einbinder và Maxwell Schubert lần đầu tiên phát hiện và tách chiết được chondroitin sulfate từ sụn bằng cách kỹ thuật chiết rút chondroitin sulfate trong dung dịch natri hydroxit 2%. Sau đó, Julia Einbinder và Maxwell Schubert đã tinh sạch được chondroitin sulfate bằng cách sử dụng canxi clorua khử protein ra khỏi dịch chiết, thu được chondroitin sulfate [65].

Năm 1986, Farndale W. R., Buttle D. J. và Barrett A. J. công bố nghiên cứu về CS và cho rằng CS thường gắn với các protein bằng liên kết o-glycosid tạo thành một phức chất proteoglycan (PG) (glucoprotein) - là hợp chất hữu cơ thuộc nhóm mucopolysaccharid [56, 57, 65, 81, 84, 85].

Sự kết hợp giữa nhóm sulphate (SO_4^{2-}) với các nhóm carboxyl (COO^-) làm cho phân tử chondroitin sulfate có mật độ điện tích âm rất cao dễ dàng liên kết đồng hoá trị với các protein trong cấu tạo của PG. Trong cấu trúc của proteoglycan, CS thường gắn với nhóm OH của acid amin serine nằm trong chuỗi polypeptid của protein. Các nhà khoa học vẫn chưa biết được cách protein gắn chọn lọc chính xác với GAG. Tuy thế, họ cho rằng GAG được tổng hợp trong mạng lưới nội bào và trong thể Golgi. Sự gắn kết của chuỗi GAG với 4 gốc đường đơn theo phương thức cố định là Xyl-Gal-Gal-GlcA trong đó xylose gắn với protein trong mạng lưới nội bào, còn các phân tử đường khác được gắn trong hệ Golgi [45, 48, 79].

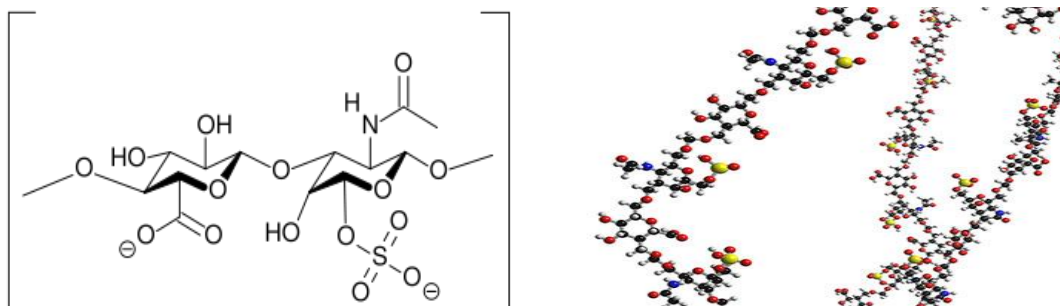
Chondroitin sulfate là polyme ưa nước vì thể mô sụn có hàm lượng nước cao. Phân tử đường trong cấu trúc của CS có thể không bị sulphate hoá, bị sulphate hoá 1 lần hay 2 lần, đa phần nhóm OH ở vị trí carbon 4 và 6 của GalNAc được sulphate hoá, đối với một số chuỗi GAG có thể bị sulphate hoá ở vị trí 2 của GlcA. Quá trình sulphate hoá là nhờ các enzyme sulfotransferase đặc hiệu. Việc sulphate hoá ở các vị trí khác nhau tạo nên hoạt tính sinh học đặc thù cho CS [39, 45, 48÷50]. Trong cơ thể sống, các PG và GAG giữ vai trò quan trọng trong nhiều quá trình khác nhau như: điều hòa hoạt động enzyme và sự bám dính, phát triển và di thực của tế bào [39, 45, 48÷50]. GAG còn có chức năng cấu trúc và điều khiển trong cơ thể sống. Về cấu trúc, nó là thành phần chính của mô sụn. Về điều khiển, CS rất dễ gắn kết với protein trong mô tế bào nhờ có điện tích âm, mối quan hệ này rất quan trọng cho việc điều hòa các hoạt động của tế bào. Phân tử PG của mô sụn (chứa khoảng 80÷100 mạch CS) cùng với protein và acid hyaluronic tạo thành một phức hệ thủy động học có khả năng nén thuận nghịch giúp cho mô sụn chống lại sự ép nén với sự biến dạng nhỏ nhất [38]. Công thức và cấu trúc hoá học của một đơn vị trong cấu trúc của chondroitin sulfate ($C_{14}H_{21}NO_{14}S$)_n được trình bày ở hình 1.1 và 1.2.



Hình 1.1. Cấu trúc hoá học của một đơn vị trong chuỗi chondroitin sulfate [23,56]

Chondroitin-4-sulphate: $R_1 = H$; $R_2 = SO_3H$; $R_3 = H$.

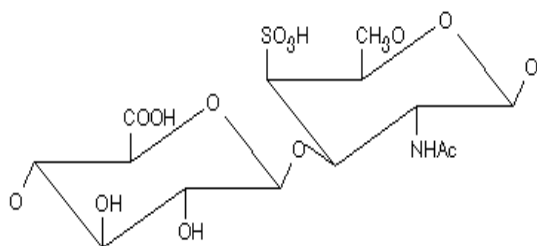
Chondroitin-6-sulphate: $R_1 = SO_3H$; $R_2, R_3 = H$.



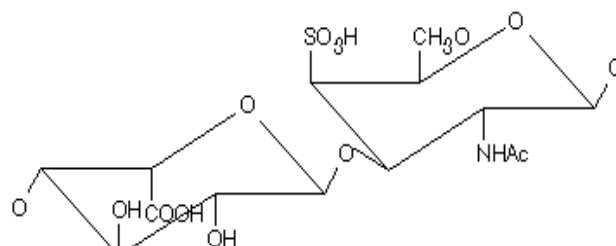
Hình 1.2. Cấu trúc mạch của các chondroitin sulfate [23, 56]

Chondroitin có 3 loại chính là A, B và C được đặc trưng bởi số lượng và vị trí của nhóm sulphate trong disaccharid lặp lại của chuỗi polysaccharid. Chondroitin sulfate A: gốc sulphate gắn ở vị trí C-4 (chondroitin-4-sulphate, GlcA-GalNAc-4S, CS4) (Hình 1.3), kết hợp với protein tạo nên chondromucoid và có nhiều ở mô sụn. Chondroitin sulfate C: gốc sulphate gắn ở vị trí C-6 (chondroitin-6-sulphate, CS6). Chondroitin sulfate B (IdoA-GalNAc-4S, CS4): acid iduronic thay thế acid glucuronic (hình 1.4). CS4 còn được gọi là dermatant sulphate (iduronic acid thay cho glucuronic acid), thường có nhiều ở da, ngoài ra còn gặp ở van tim, gân, thành mạch. Vị trí bị sulphate hoá ở C-4 của GlcNAc và C-5 của glucuronic acid bị epime hoá thành iduronic acid [23, 56] .

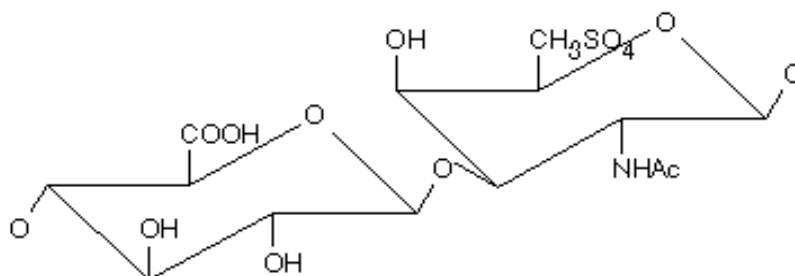
Loại A và B (CS4) thường được tìm thấy ở sụn động vật có vú (bò và lợn), ngược lại loại C (CS6) thường được tìm thấy chủ yếu ở các loài cá sụn (cá mập, cá đuối, ...) [56, 63, 81, 88, 94]. Tuy nhiên, CS từ các nguồn nguyên liệu khác nhau rất đa dạng về cấu trúc và kích thước, chúng chứa nhiều hay ít các isome của CS, có tới 16 isome của CS, phụ thuộc vào vị trí sulphate hóa của các cặp đường đôi tạo nên 16 isome/ mỗi cặp. Trong đó CS A và CS C là những thành phần chủ yếu hình thành PG.



Hình 1.3. Cấu trúc một đơn vị của chondroitin sulfate A



Hình 1.4. Cấu trúc của chondroitin sulfate B



Hình 1.5. Cấu trúc của chondroitin sulfate - C (GlcA-GalNAc-6S) - CS6

Người ta tách chiết được CS trước khi cấu trúc của nó được xác định. Do vậy, tên gọi của CS cũng có sự thay đổi. Phân loại CS được tóm tắt trong bảng 1.1.

Bảng 1.1. Phân loại chondroitin sulfate [23, 56]

Tên	Vị trí bị sulphate hoá	Tên phân loại
<i>Chondroitin sulfate A</i>	Carbon 4 của đường - N-acety-D-galactosamine (GalNAc)	Chondroitin-4-sulphate (CS4); ở người có trong: sụn khớp, giác mạc, da, thành mạch, ...
<i>Chondroitin sulfate B (Dermatan sulphate)</i>	Carbon 4 của GalNAc – L-iduronic acid	Chondroitin-4-sulphate (CS4)
<i>Chondroitin sulfate C</i>	Carbon 6 của GalNAc	Chondroitin-6-sulphate (CS6)
<i>Chondroitin sulfate D</i>	Carbon 2 của glucuronic acid and 6 của GalNAc	Chondroitin-2,6-sulphate (C2, 6S)
<i>Chondroitin sulfate E</i>	Carbon 4 và 6 của GalNAc	Chondroitin-4,6-sulphate (C4, 6S)

CS tinh chế là chất bột màu trắng hoặc trắng ngà, tan tốt trong nước và rất dễ hút ẩm nhưng không tan trong ethanol, methanol, acetone, ... Khối lượng phân tử của CS nguyên liệu thường được sử dụng trong chế phẩm thuốc vào khoảng $15.000 \div 20.000$ Dalton [23, 56].

1.1.2. Kỹ thuật thu nhận chondroitin sulfate

Cấu trúc phân tử CS rất đa dạng và phức tạp nên người ta chưa thể tổng hợp được CS bằng con đường tổng hợp hoá học. Hiện nay người ta mới chỉ tổng hợp được các mạch oligosaccharid ngắn có trình tự giống một đoạn mạch CS như một số CS ở dạng tetrasaccharid (4 gốc đường đơn) có khả năng kích thích sự phát triển và phân hóa của neron thần kinh, còn phân tử CS dạng disaccharid thì không có tác dụng trên [23, 56]. CS thô mới chỉ được thu nhận duy nhất từ các nguồn tự nhiên bằng con đường chiết rút CS từ các loại mô sụn động vật. Sụn vi cá mập (xương sọ, xương sống, vây, ...) là nguồn nguyên liệu thu nhận CS phổ biến nhất dùng làm thuốc và chế phẩm bổ sung dinh dưỡng [58, 63, 66]. Trong mô sụn của động vật, chondroitin sulfate liên kết chặt với protein tạo thành dạng phức proteoglycan. Vì vậy, muốn thu nhận CS, việc đầu tiên người ta phải tách CS ra khỏi protein nhờ việc làm yếu mối liên kết giữa CS-protein và phân huỷ protein để giải phóng các phân tử CS [23, 56].

*** Các phương pháp thu nhận chondroitin sulfate thô**

Quá trình thu nhận chế phẩm CS thô từ sụn cá có thể được thực hiện bằng phương pháp hoá học hoặc phương pháp sinh học (dùng enzyme) để thủy phân sụn cá [23, 44, 56, 58, 81]. Trong phương pháp hoá học, mô sụn được xử lý bằng nước nóng hoặc dung dịch muối hoặc kiềm (NaOH) hoặc acid (HCl, CH₃COOH,...) để tách GAG khỏi các phân tử (protein, hyaluronic acid, ...) [56]. Phương pháp này đã được áp dụng để thu CS từ sụn gà, sụn bò [23, 57, 63, 65, 71, 88]. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp hóa học là phá vỡ các liên kết glycosid của CS khi thu nhận CS.

Phương pháp sinh học dùng enzyme để thủy phân mô sụn, đây là phương pháp có hiệu quả để thu nhận CS. Do CS không bị biến đổi về cấu trúc, giữ được hoạt tính sinh học và phương pháp này không gây ô nhiễm môi trường do các hóa chất (muối, kiềm, acid,...) gây nên. Một số nghiên cứu cho rằng có thể sử dụng enzyme protease (papain, actinase, pronase,...) để thủy phân sụn giải phóng GAG khỏi các protein liên kết. Sau đó, loại bỏ protein thì CS được tách ra và tinh sạch. Phương pháp này đã được dùng để thu nhận GAG từ da xương cá *Labeo rohita* [63], sụn của mực, cá mập, cá sấu, cá đuối, ...

Các chuỗi dài hydrophilic polyme GAG không tan trong ethanol, acetone và methanol. Vì vậy, người ta có thể sử dụng các dung môi hữu cơ để kết tủa thu CS thô. Một số nghiên cứu cho thấy ethanol 60÷80% có khả năng kết tủa được CS và tách CS ra khỏi các polysaccharid khác [56].

*** Các phương pháp tinh sạch chondroitin sulfate**

Chế phẩm CS thô thu được thường có chứa một lượng tạp chất, chẳng hạn như collagen, protein, hyaluronic acid, muối khoáng, ... Do vậy, người ta cần phải tiến hành các bước tinh sạch để loại các tạp chất trên. Để thu CS tinh khiết, người ta có thể sử dụng các muối của ammonium như cetylpyridium chloride (CPC) hoặc cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) để tạo phức kết tủa với các GAG và các polysaccharid khác sau đó loại collagen ra khỏi kết tủa [56]. Các GAG có gốc sulphate trong phức hợp kết tủa CPC-GAG và CTAB-GAG sẽ bị hòa tan trong một số muối NaCl hoặc KCl ở nồng độ thấp (0,3÷0,4M). Sau khi loại bỏ các GAG có gốc sulphate như hyaluronic acid, chỉ còn lại tủa CPC-GAG và CTAB-GAG [56]. CS trong phức tủa CPC-GAG và CTAB-GAG sẽ được hòa tan phần lớn trong một số loại muối ở nồng độ

cao (0,9-2,0M KCl; 2,0M NaCl; 1N MgCl₂ và 0,7N÷1,5 M MgSO₄,...), sau đó tiếp tục tinh chế bằng thẩm tích và kết tủa bằng dung môi hữu cơ để thu CS tinh khiết. Scott cho rằng phương pháp trên là phương pháp hiệu quả để tách và tinh sạch các loại polysaccharid và nucleic acid ra khỏi CS [56].

CS là một polyanion có điện tích âm (-) rất cao, nên CS rất dễ liên kết và bám dính trên các cột sắc ký. Vì vậy, người ta có thể tinh sạch CS bằng sàng lọc phân tử nhờ các cột sắc ký trao đổi ion (DEAE-Sephacel, DOWEX 50, DEAE-Cellulose, ...) hoặc bằng sắc ký lọc gel (Sephacryl S-300, sephadex - G25, ...) [56].

* Các phương pháp định tính và định lượng chondroitin sulfate

Người ta thường xác định hàm lượng CS dựa vào sự thay đổi quang phổ hấp thụ của chất màu DMMB (1,9-dimethylmethylene blue) khi gắn với CS. Trước tiên, người ta hoà tan bột CS khô vào nước đã loại ion để nhận dung dịch 8÷12% (w/v) và xác định hàm lượng CS của dung dịch theo kỹ thuật của Farndale và cộng sự, đó là dùng CS4 và CS6 tinh khiết làm chất chuẩn và đo độ hấp thụ của dung dịch màu ở bước sóng 525nm trên máy quang phổ [36, 41]. Người ta có thể xác định độ tinh sạch của CS bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC, sắc ký lỏng khối phổ LC-MS, quang phổ hồng ngoại FTIR-KBr, điện di trên gel SDS-PAGE hoặc agarose. Hàm lượng CS của các loại sụn động vật khác nhau cũng khác nhau (bảng 1.2).

Bảng 1.2. Hàm lượng chondroitin sulfate của một số loại sụn động vật [23, 56]

STT	Nguyên liệu	CS4 (%)	CS6 (%)	Loại CS
1	Vây cá mập	9,60 ± 1,05	8,76 ± 0,96	CS6, CS4
2	Sụn lưỡi heo	14,84 ± 0,38	13,54 ± 0,35	CS6, CS4
	Xương sườn	5,56 ± 0,96	5,08 ± 0,87	CS6, CS4
	Xương ức	11,55 ± 0,88	10,54 ± 0,80	CS6, CS4
	Cổ họng	9,51 ± 1,99	8,68 ± 1,81	CS6, CS4
3	Cá đuối	5,27 ± 0,91	4,81 ± 0,84	CS6, CS4
4	Xương lưỡi hái của gà	14,08 ± 2,51	13,38 ± 4,74	CS4, CS6
5	Sụn mũi bò	11,50		CS4, CS6

Như vậy, hàm lượng CS trong các nguyên liệu sụn vào khoảng 10,0÷28,3%,

phần lớn chứa cả 2 loại CS4 và CS6.

1.1.3. Ứng dụng của chondroitin sulfate

CS đã được sử dụng rộng rãi như một chế phẩm thực phẩm bổ sung dinh dưỡng (dietary supplements) cho con người và ngày càng được mở rộng ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau, nhất là lĩnh vực y học, đặc biệt trong điều trị các bệnh lý xương khớp [12, 35]. CS có một số ứng dụng như sau:

*** Ứng dụng trong y học:** CS được ứng dụng trong điều trị một số bệnh sau:

+ **Bệnh khớp** (osteoarthritis): Nhiều nghiên cứu trên thế giới [6, 21, 39, 42, 44, 47, 48] cho thấy CS được ứng dụng rộng rãi trong điều trị các bệnh lý về xương khớp, đặc biệt là bệnh viêm khớp theo các cơ chế:

- Giảm đau, kháng viêm, giảm sưng khớp do thúc đẩy tạo ra dịch ổ khớp.
- CS còn được tìm thấy trong hoạt dịch, chất lỏng bao quanh khớp, giúp bôi trơn khớp, tăng sự mềm mại của khớp.
- Tham gia vào cấu trúc tái tạo sụn khớp.
- Bảo vệ khớp bằng cách ức chế các enzyme phá hủy sụn khớp như collagenase, elastase, proteoglycanase, phospholipase A2 và N-acetylglucosaminidase, kích thích hoạt động các enzyme xúc tác phản ứng tổng hợp hyaluronic acid giúp khớp hoạt động tốt. Điều trị CS với liều 800 mg/ngày trong 3 tháng với liệu trình 2 đợt một năm có tác dụng giảm đau và cải thiện chức năng rõ rệt ở bệnh nhân bị viêm khớp. Các nghiên cứu được lý tại châu Âu trong khoảng 10 năm gần đây cho thấy CS được sử dụng điều trị cho bệnh nhân mà không có một phản ứng phụ nào xảy ra.

+ **Bệnh về mắt:** CS là chất sinh lý của giác mạc, giúp duy trì độ trong suốt cho mắt, tạo độ nhớt thích hợp và bồi bổ nội mô giác mạc, nuôi dưỡng các tế bào giác mạc mắt, tái tạo lớp phim nước mắt trước giác mạc, tăng cường độ đàn hồi của thấu kính, chống tình trạng khô mắt. Mac Rae và cộng sự đã chỉ ra CS có tác dụng giảm sự tổn thương thấu kính mắt. CS được dùng trong thuốc nhỏ mắt để phòng ngừa và điều trị các tình trạng khô mắt, mỏi mắt, thoái hoá võng mạc [21]. Ngoài ra CS còn được sử dụng để điều chế chất nhầy thường được dùng trong phẫu thuật lấy thủy tinh thể và đặt thủy tinh thể nhân tạo nhằm bảo vệ biểu mô và nội mô của giác mạc [21, 23]. Công ty TNHH

Rohto-Mentholatum (Việt Nam) đã sản xuất thuốc nhỏ mắt New V. Rohto có chứa CS để chữa các bệnh: mỏi mắt, xung huyết kết mạc, bệnh mắt do tia cực tím hay các tia sáng khác, nhìn mờ do tiết dịch, mắt ngứa, viêm mi,...

+ **Các bệnh khác:** CS của sụn cá mập được một số công trình nghiên cứu chứng minh có khả năng ức chế một số loại ung thư. CS tinh chế từ sụn cá mập có khả năng ức chế sự hình thành các vi mao mạch tân sinh mà các mô ung thư rất cần để phát triển, nên có thể hạn chế sự phát triển của khối u ác tính. CS cùng với mitomycin C có thể ức chế các tế bào ung thư cổ trướng sarcoma 180 [21, 79]. Một số nghiên cứu cho thấy sụn cá mập cũng có khả năng giúp tăng cường hệ miễn dịch nên giúp giảm nhẹ các chứng miễn dịch như thấp khớp, đau nhức xương (phong thấp), vẩy nến, chàm (eczema), luput ban đỏ, ... [79]. Nhiều nghiên cứu cho thấy CS có khả năng tăng cường kháng viêm, ức chế sự tiết các cytokine tiền viêm TNF- α , interleukin-1 β , nitric oxid và các gốc oxy hóa tự do [79].

* **Các ứng dụng khác:** CS còn được ứng dụng trong sản xuất các loại mỹ phẩm (dưỡng tóc, dưỡng và giữ ẩm da, ...). CS còn có trong thành phần các chế phẩm chứa gelatin (thực phẩm, mỹ phẩm, thuốc, nguyên liệu công nghiệp và làm ảnh). Người ta còn cho rằng CS có thể dùng để điều trị và ngăn tắc nghẽn động mạch, có tác động chống đông máu [88]. Ngoài ra, CS còn có tác động điều khiển tế bào, làm tăng sinh một số loại tế bào bạch cầu, tăng tổng hợp RNA trong tế bào sụn nuôi cấy do đó làm tăng tổng hợp proteoglycogens và collagens, thúc đẩy sự tích lũy hyalin trong gan, tụy và hạt lympho [94]. Từ thập niên 70, một số nghiên cứu cho thấy cá mập không bị ung thư. Sau đó người ta nghiên cứu và sử dụng sụn cá mập (Shark cartilage) để tạo ra các loại viên nén chứa sụn cá mập sử dụng để “ngừa ung thư” và một số loại bệnh tự miễn dịch hoặc “làm cho sáng mắt”. Cơ chế tác dụng của sụn cá mập trong điều trị ung thư được cho rằng sụn cá mập tinh chế có chứa các chất có khả năng ức chế sự hình thành các vi mao mạch tân sinh mà các mô ung thư rất cần để phát triển do vậy sụn cá mập sẽ giúp hạn chế sự phát triển của các khối u ung thư. Sụn cá mập cũng có khả năng ức chế hệ miễn dịch nên giúp giảm nhẹ các chứng miễn dịch như thấp khớp, đau nhức xương (phong thấp), vẩy nến, chàm (eczema), luput ban đỏ, ... [21, 79].

1.2. TÌNH HÌNH KHAI THÁC VÀ SỬ DỤNG SỤN CÁ MẬP

1.2.1. Tình hình khai thác cá mập trên Thế giới và Việt Nam

*** Tình hình khai thác cá mập trên Thế giới**

Cá mập là một loài cá sống phổ biến ở các vùng biển trên khắp thế giới. Theo thống kê của các nhà khoa học, hiện nay trên thế giới có hơn 420 loài cá mập với các kích cỡ khác nhau. Việc khai thác, đánh bắt cá mập đã trở thành một nghề nổi trội, thu hút đa số ngư dân tại các nước giáp với biển trên thế giới [38, 54]. Người ta đánh bắt cá mập chủ yếu để lấy vi cá, do vi cá mập có giá trị rất lớn trên thị trường thế giới. Hiện nay, những nước đánh bắt và tiêu thụ vi cá mập lớn nhất thế giới là Mỹ và Trung Quốc. Ở Việt Nam cũng có những vùng khai thác cá mập như Phú Yên, Nha Trang, Bình Định, ... [14]

Việc buôn bán vây cá mập là một động lực chính thúc đẩy hoạt động khai thác cá mập trong ngành thủy sản trên thế giới, hầu hết trong số đó không được quản lý trên cơ sở loài cụ thể. Đặc khu hành chính Hồng Kông của Trung Quốc, một trong những trung tâm thương mại mua bán vây cá mập lớn nhất thế giới, đã được thống kê đánh giá một phần vào năm 1999-2001. Người ta cho rằng Hồng Kông là thị trường nhập khẩu một lượng đáng kể vây cá mập và vây cá mập nhập khẩu được tiêu thụ trong nước hoặc tái xuất khẩu (FAO 2016). Clarke và cộng sự (2006) cho rằng các nhà nhập khẩu Hồng Kông bán đấu giá khoảng 20% số vây cá mập nhập khẩu sau khi phân loại chúng thành khoảng 30 danh mục sản phẩm thương mại [38].

Sự sụt giảm số lượng cá mập trên Thế giới được cho là do đánh bắt quá mức nhiều loài cá mập trên khắp thế giới có liên quan đến việc mua bán vây của chúng để sử dụng trong chế biến súp vây cá mập. Mặc dù vậy, phần lớn các giao dịch thương mại về vây cá mập trên toàn cầu rất ít được giám sát. Hiện có rất ít quốc gia đánh cá lưu giữ dữ liệu một cách chính xác về việc đánh bắt cá mập theo loài. Theo số liệu thống kê kể từ lần kiểm tra Hồng Kông vào năm 1999-2001, số lượng mua bán vây cá mập hàng năm đã giảm từ 44÷59% xuống còn là 30÷50%. Tuy vậy, hiện vẫn có khoảng 83 quốc gia trên thế giới có hiện tượng nhập khẩu và kinh doanh vây cá mập. Do vậy, hiện rất khó đánh giá được chính xác khối lượng vây cá mập buôn bán, tiêu thụ trên thị trường [38, 54].

*** Tình hình khai thác cá mập ở Việt Nam**

Hiện không có số liệu chính thức về tình hình khai thác cá mập ở Việt Nam. Hiện ở Việt Nam chỉ có duy nhất một báo cáo về kết quả điều tra tình hình khai thác nguồn

lợi cá mập của Nguyễn Văn Long và Võ Sĩ Tuấn - Viện Hải dương học Nha Trang thực hiện trong giai đoạn 2010 ÷ 2011 tại 6 tỉnh ven biển có nghề khai thác cá mập chính ở Việt Nam gồm Quảng Ngãi, Bình Định, Phú Yên, Khánh Hòa, Ninh Thuận và Bình Thuận. Kết quả điều tra của Nguyễn Văn Long và Võ Sĩ Tuấn cho thấy có khoảng 530 tàu thuyền đang tham gia khai thác cá nhám/mập, nhiều nhất là Bình Thuận (181 chiếc), Bình Định (140 chiếc), Khánh Hòa (98 chiếc), Phú Yên (74 chiếc), Quảng Ngãi (32 chiếc) và Ninh Thuận (5 chiếc) [14]. Kết quả điều tra cũng cho thấy có 6 loại nghề khai thác cá mập (câu cá mập, câu cá ngừ, lưới cản, lưới ba màng, lưới vây và lặn) hoạt động tại 3 ngư trường tập trung ở khu vực ven bờ Quảng Ngãi, Bình Định và Phú Yên, khu vực Bồ Khảm - Trường Sa - giàn khoan Vũng Tàu và vùng nước giáp Malaysia, Brunei, Indonesia với mùa vụ khai thác từ tháng 2 ÷ 10 hàng năm. Kết quả điều tra cũng cho thấy có trên 13 loài cá mập được khai thác với năng suất trung bình của nghề câu cao nhất (0,53 tấn/ghe/tháng), tiếp đến là nghề lưới vây (0,50 tấn/ghe/tháng) và nghề câu cá ngừ đại dương (0,18 tấn/ghe/tháng). Các địa phương có sản lượng khai thác cao là Bình Thuận (886 tấn/năm), Bình Định (201 tấn/năm) và Phú Yên (186 tấn/năm). Kết quả điều tra của các tác giả trên cũng cho thấy có sự giảm mạnh về số lượng phương tiện tham gia khai thác cá mập (giảm 16,7 - 85,8%), về năng suất (giảm 14,4 - 83,8%) và sản lượng khai thác (giảm 58,4 - 99,4%) của từng loại nghề khai thác tại các địa phương so với 10 năm trước đây. Năm 2010, tổng sản lượng khai thác cá mập vào khoảng 1.130 tấn/năm. Một số tỉnh được hỗ trợ khai thác, có sản lượng đánh bắt cá mập cao là Bình Thuận (886 tấn/năm), Bình Định (201 tấn/năm) và Phú Yên (186 tấn/năm). Kết quả điều tra của các tác giả Nguyễn Văn Long và Võ Sĩ Tuấn cũng cho thấy nguồn lợi cá mập biển đã bị khai thác quá mức, đặc biệt là ở vùng biển ven bờ Việt Nam [14].

Hiện nay do quy định của công ước Quốc tế về việc hạn chế đánh bắt và khai thác cá mập, các tàu thuyền khai thác thủy sản của Việt Nam không được phép đánh bắt cá mập nên sản lượng khai thác cá mập giảm, cá mập khai thác chủ yếu là dạng cá mập dính vào dây câu cá ngừ hoặc bị mắc lưới khai thác cùng với các loại cá khác. Tuy vậy, hiện nay không có số liệu thống kê về sản lượng khai thác cá mập tại Việt Nam [14].

1.2.2. Một số sản phẩm từ sụn cá mập

Sụn cá mập được cho là có nhiều dưỡng chất quý hiếm từ thiên nhiên như collagen, chất đạm, khoáng chất thiết yếu cần thiết cho cơ thể con người như calcium, phosphate,

kẽm, ... đặc biệt là có chứa chondroitin sulfate nên được sử dụng làm thực phẩm chức năng điều trị các bệnh lý về xương khớp và tăng cường sức khỏe. Hiện nay, trên thị trường có nhiều sản phẩm sụn cá mập đến từ các quốc gia khác nhau như Mỹ, Canada, Úc, ... Trong đó, các sản phẩm sụn cá mập của Mỹ luôn được người dùng tin tưởng về chất lượng và độ an toàn. Hiện có một số sản phẩm có nguồn gốc từ sụn cá mập như sản phẩm Now Shark Cartilage 740 mg và 750mg - đây sản phẩm bột sụn cá mập của Mỹ. Sản phẩm này được quảng cáo là nguồn bổ sung chất dinh dưỡng và khoáng chất tốt cho sức khỏe con người [23, 54].



Hình 1.6. Hình ảnh về một số sản phẩm từ sụn cá mập

1.3. MỘT SỐ NGHIÊN CỨU VỀ THỦY PHÂN SỤN CÁ MẬP

1.3.1. Trên thế giới

Trên thế giới hiện đã có một số công trình nghiên cứu thu nhận chondroitin sulfate bằng phương pháp hóa học như sử dụng HCl, NaOH, ... Tuy vậy, hiện có rất ít công trình nghiên cứu sử dụng enzyme protease trong thu nhận chondroitin sulfate từ tự nhiên [54, 58, 74, 84, 86, 92÷ 98] .

Năm 2006, Kang C. W. và các cộng sự - Trường Đại học Konkuk, Hàn Quốc đã tiến hành nghiên cứu và chiết xuất mucopolysaccharid-protein chứa chondroitin sulfate từ sụn gà và nhận thấy có thể sử dụng enzyme alcalase 2% trong xử lý sụn gà để thu nhận mucopolysaccharid-protein. Tuy nhiên Kang C. W. vẫn chưa thu được CS tinh khiết [67].

Anakano T. và Ozimek L. - Khoa Khoa học Thực phẩm và Dinh dưỡng - Đại học Meiji Nhật Bản (2000) đã tiến hành nghiên cứu chiết xuất chondroitin sulfate - peptid từ sụn mũi trâu, bò và nhận thấy sử dụng HCl 6M ở 110°C để xử lý mô sụn mũi trâu trong 24h sẽ thu được CS với hiệu suất thu hồi CS cao nhất. Tuy vậy, công trình nghiên cứu này cũng cho thấy sử dụng HCl thủy phân sụn làm ảnh hưởng đến chất lượng CS thu được do làm mất gốc sulphate 4 của CS [76].

Xei J. và cộng sự - Khoa Khoa học Thực phẩm - Trường Đại học Bắc Kinh Trung Quốc (2014) đã sử dụng nhiều loại enzyme như papain, bromelin, alcalase, neutrase và enzyme tụy tạng trong thủy phân sụn cá mập để thu nhận CS và collagen cho thấy enzyme neutrase cho hiệu quả thu CS cao nhất [95].

Năm 2010, Anlin Lim và cộng sự - Khoa Khoa học Sinh học và Công nghệ Sinh học - Đại học Khoa học và Công nghệ Tây Nam Trung Quốc đã tiến hành nghiên cứu phân tích cấu trúc và thu nhận chondroitin sulfate từ sụn thanh quản lợn. Nhưng nghiên cứu này sử dụng phương pháp tinh chế CS bằng acid tricloacetic, không được khuyến khích trong thực phẩm [36].

Vittajanon M. và cộng sự - Bộ môn Công nghệ thực phẩm - khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Prince Songkla, Hatjai, Thái Lan (2014) đã tiến hành nghiên cứu sản xuất CS thô từ sụn vịt và nhận thấy khi kết hợp NaOH và enzyme alcalase trong thủy phân sụn vịt sẽ thu nhận được CS với hàm lượng cao hơn. Tuy nhiên khi sử dụng NaOH sẽ làm mất gốc sulphate ở vị trí số 6 trong cấu trúc của CS [93].

Cheng Chang Yu và cộng sự - Trường Đại học Khoa học Thực phẩm và Công nghệ - Trường Đại học Hải Nam - Trung Quốc (2014) đã tiến hành nghiên cứu thu nhận CS từ sản phẩm phụ của cá rô phi theo phương pháp thủy phân bằng kiềm loãng với sự hỗ trợ của lò vi sóng. Tuy nhiên phương pháp này đạt hiệu quả không cao và hàm lượng CS thu được thấp, khó có khả năng sản xuất ở quy mô lớn [51].

Shomashekar P. L. và cộng sự - Trường đại học Dược, Ấn Độ (2011) đã nghiên cứu định lượng CS trong thuốc viên bằng phương pháp so màu sử dụng thuốc thử Methylen Blue. Tuy nhiên phương pháp này chỉ chính xác khi thuốc có hàm lượng CS lớn [85].

Xie J., Ye H. Y. và Luo X. F - Trường Đại học Công nghệ Chiết Giang - Trung Quốc (2014) đã tiến hành nghiên cứu thu nhận chondroitin sulfate và collagen peptid từ

sụn cá mập theo kỹ thuật thủy phân bằng enzyme neutrase ở nhiệt độ 45⁰C, trong thời gian 5 giờ, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 10 ml/g. Sau đó, chondroitin sulfate được tinh sạch qua cột DEAE-Sepharose với hiệu suất đạt 88,4% và hiệu suất thu peptid collagen đạt 78,3%. Mặc dù hiệu suất thu chondroitin sulfat trên 70%, nhưng khi tinh sạch chondroitin sulfate bị mất gốc sulfate ở vị trí số 4 [95].

Nadezhda E. U. và cộng sự (2018) đã nghiên cứu thu nhận CS từ hải sâm *Cucumaria frondosa*. Kết quả cho thấy có thể thu nhận CS tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký trao đổi anion. Tuy vậy, sau khi tinh chế CS bị mất gốc sulphate ở vị trí số 6 [75].

Từ các phân tích ở trên cho thấy trên thế giới đã có một số nghiên cứu thủy phân sụn động vật như sụn cá rô phi, sụn gà, sụn cá mập, ... bằng phương pháp thủy phân sử dụng tác nhân hóa học hoặc phối hợp giữa tác nhân hóa học và enzyme protease. Tuy vậy, các nghiên cứu trên thế giới chỉ tập trung vào việc kết tủa thu riêng chondroitin sulfate nhưng với hiệu quả thấp và chondroitin sulfate thường bị mất gốc sulfate ở vị trí số 4 hoặc số 6. Hơn nữa, khi sử dụng tác nhân hóa học trong thủy phân sẽ làm cho sản phẩm không “xanh” và “sạch”. Vì vậy, việc nghiên cứu thủy phân sụn động vật bằng enzyme protease thân thiện với môi trường là hướng nghiên cứu cần thiết và đúng đắn.

1.3.2. Trong nước

Ở Việt Nam hiện hầu như cũng chỉ có một công trình của Trần Cảnh Đình, Võ Hoài Bắc, Đỗ Ngọc Tú - Viện Hải sản Hải Phòng (2010) công bố nghiên cứu thu nhận CS từ sụn cá đuối và sụn cá nhám khô. Trần Cảnh Đình, Võ Hoài Bắc, Đỗ Ngọc Tú đã tiến hành sử dụng protease ngoại bào của *B. subtilis* B26 để thủy phân sụn cá đuối (*Dasyatis kuhlii*) và sụn cá nhám khô (*Carcharhinus sorrah*). Kết quả nghiên cứu của các tác giả này cho thấy sử dụng chế phẩm enzyme protease từ *B. subtilis* B26 cho kết quả thu nhận CS khả quan hơn. Tuy nhiên thời gian thủy phân kéo dài và chưa xác định được cấu trúc của CS [23, 26]. Nhóm tác giả trên đã xác định được điều kiện thủy phân tối ưu của enzym protease từ *B. subtilis* B26 trên cơ chất sụn cá là tỷ lệ sụn cá khô: tỷ lệ 0,4ml (0,17 UI/ml) enzyme/1g xương sụn cá, thời gian thủy phân là 12 giờ, pH 8,5 và nhiệt độ 50⁰C. Thời gian nuôi cấy chủng B26 cho hoạt tính enzyme cao nhất là 72 giờ [26].

Vũ Thị Thanh Tâm - Trường Đại học Nha Trang (2012) do Võ Hoài Bắc hướng dẫn đã tiến hành nghiên cứu thu nhận chondroitin sulfate từ nguyên liệu thủy sản bằng

phương pháp sinh học sử dụng protease từ chủng *B. subtilis* B26 để thủy phân sụn cá đuối và cá nhám khô cho kết quả tương tự [34].

Từ các phân tích ở trên cho thấy ở Việt Nam và trên thế giới đã có một số nghiên cứu thu nhận chondroitin sulfate từ sụn động vật trong đó có sụn cá. Tuy vậy, đa số các công trình nghiên cứu theo hướng sử dụng tác nhân hóa học để tác động vào sụn động vật nhằm thu nhận CS ứng dụng trong thực phẩm hoặc mỹ phẩm hay dược phẩm. Việc sử dụng tác nhân hóa học có nhược điểm là gây ô nhiễm môi trường và CS sẽ bị phân hủy gốc sulphate hoặc bị phân cắt ngắn cấu trúc dẫn đến hoạt tính CS bị thay đổi. Hiện đã có một vài nghiên cứu đề cập đến việc sử dụng enzyme protease trong thủy phân sụn cá hoặc sụn cá khô và nghiên cứu chỉ bước đầu, cách tiếp cận vẫn theo hướng thủy phân sau đó kết tủa thu riêng chondroitin sulfate và chưa có định hướng ứng dụng rõ ràng. Hiện chưa có một nghiên cứu nào sử dụng protease để thủy phân sụn cá mập tươi và thu nhận dịch thủy phân chứa chondroitin sulfate. Mặt khác, việc thủy phân sau đó kết tủa thu riêng CS có nhược điểm là các chất tự nhiên có giá trị sinh học có trong sụn cá sẽ bị loại bỏ dẫn đến lãng phí nguồn lợi tự nhiên. Để khắc phục các nhược điểm trên, luận án định hướng tiến hành nghiên cứu sử dụng enzyme protease thương mại trong thủy phân sụn cá mập để thu dịch thủy phân chứa chondroitin sulfate và các chất từ sụn cá mập, định hướng ứng dụng làm thực phẩm chức năng. Việc sử dụng các chất tự nhiên có sẵn trong sụn cá mập dẫn tới hiệu quả hỗ trợ điều trị các bệnh lý xương khớp của dịch thủy phân sẽ tốt hơn.

1.4. CÁC NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT SẤY PHUN TRONG THỰC PHẨM

Sấy phun thực phẩm là quá trình làm bốc hơi nước ra khỏi vật liệu sấy ở dạng lỏng dưới tác dụng của nhiệt độ. Trong quá trình sấy phun thực phẩm, nước được tách khỏi thực phẩm nhờ sự khuếch tán do:

- + Chênh lệch độ ẩm giữa bề mặt thực phẩm lỏng và bên trong vật liệu.
- + Chênh lệch áp suất hơi riêng phần của nước tại bề mặt thực phẩm và môi trường xung quanh.

Nguyên liệu của quá trình sấy phun thường là các chất ở dạng chất lỏng hòa tan, nhũ tương hoặc huyền phù đã được cô đặc trước ($40 \div 60\%$ ẩm) được phun thành những giọt mịn, rơi vào dòng không khí nóng cùng chiều hoặc ngược chiều tạo ra nhiệt độ

buồng sấy ($70 \div 300^{\circ}\text{C}$) để làm khô nguyên liệu. Kết quả hơi nước được bốc hơi nhanh chóng. Các hạt sản phẩm được tách ra khỏi tác nhân sấy dưới dạng bột mịn nhờ một hệ thống thu hồi riêng [15, 22, 37, 40, 72, 73, 78, 87, 90, 91, 99].

Trên thế giới có rất nhiều công trình nghiên cứu về sấy phun thực phẩm và các công trình nghiên cứu sấy phun thực phẩm trên thế giới chủ yếu tập trung về việc sấy phun các dịch chiết từ thực vật như dịch cà chua, rau quả hay dịch chiết caroten từ thực vật do kỹ thuật sấy phun giúp bảo tồn các chất có hoạt tính sinh học có trong dịch chiết [15, 22, 37, 40, 59, 78, 87, 90, 91].

Ở Việt Nam cũng có các công trình nghiên cứu sấy phun tiêu biểu như:

Vũ Thị Hằng và cộng sự (2015) đã tiến hành nghiên cứu sấy phun dịch chiết từ gấc ở nhiệt độ sấy phun 60°C cho thấy bột gấc thu được vẫn giữ nguyên màu đỏ giống như tự nhiên. Tuy nhiên hạn chế nghiên cứu này là độ ẩm của bột gấc còn cao và bột gấc thu được dễ bị hút ẩm và mốc khi bảo quản [33].

Phan Tại Huân, Phạm Đức Toàn, Kha Chấn Tuyên (2014) tiến hành sấy phun tạo vi nang dầu gấc ở nhiệt độ khí đầu vào là 154°C và nhiệt độ khí đầu ra là 80°C cho thấy sản phẩm vi nang dầu gấc thu được có màu sắc tốt và sản phẩm giúp bảo quản các chất dễ bị oxi hóa có trong dầu gấc như: β -carotene, lycopene, ... Tuy vậy, hạn chế lớn nhất của nghiên cứu này là hiệu suất sấy phun chỉ đạt 53% [22].

Năm 2019, Ngọc Ánh, Mạc Thị Hà Thanh đã tiến hành nghiên cứu sấy phun tạo sản phẩm bột nhàu cho thấy khi sấy phun ở nhiệt độ khí đầu vào 160°C sẽ tạo ra sản phẩm bột nhàu có màu sắc đẹp và sản phẩm vẫn giữ được giá trị dinh dưỡng và hàm lượng vitamin C, polyphenol tổng số, hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học. Tuy nhiên hạn chế của nghiên cứu này là sản phẩm có độ ẩm vẫn còn cao [1].

Ngoài ra còn rất nhiều công trình nghiên cứu sử dụng trong sấy phun các dịch chiết chứa các chất có hoạt tính sinh học khác.

Từ các phân tích ở trên cho thấy sấy phun là kỹ thuật chủ yếu được sử dụng trong nghiên cứu sấy phun thực phẩm do bảo tồn được màu sắc và các chất có hoạt tính sinh học cũng như vitamin. Do vậy, luận án định hướng sử dụng kỹ thuật sấy phun để sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU

2.1.1. Sụn cá mập

Cá mập (*C. dussumieri* (Muller & Henle, 1839)) được thu mua nguyên con tại cảng cá Vĩnh Lương - Nha Trang - Khánh Hòa. Cá tươi có trọng lượng trung bình $40 \div 60\text{kg/con}$. 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, xay nhỏ, đóng túi 2kg/túi, cấp đông và bảo quản đông ở -20°C để dùng trong suốt quá trình nghiên cứu.



Hình 2.1. Hình ảnh sụn cá mập trước và sau khi xử lý

2.1.2. Enzyme protease

2.1.2.1. Neutrase:

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

2.1.2.2. 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 $6,0 \div 8,0$; nhiệt độ thích hợp $30 \div 65^{\circ}\text{C}$, hoạt

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

2.1.2.3. 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 *A. oryzae*, hoạt độ là 500 LAPU (Leucine Aminopeptidase Units)/g, điều kiện hoạt động thích hợp là $50 \div 55^{\circ}\text{C}$, pH = $5,0 \div 7,0$.

2.1.2.4. 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 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 $82,5^{\circ}\text{C}$. Papain tinh khiết có nhiệt độ thích hợp 50°C , khoảng pH thích hợp $4,5 \div 8,5$, pH thích hợp là 7, dễ bị biến tính ở pH < 4,5 và ở pH > 12.

2.1.3. Chất mang

* **Maltodextrin:** maltodextrin dùng làm chất mang trong quá trình sấy phun là sản phẩm tinh khiết do Nhật Bản sản xuất. Maltodextrin là dạng bột mịn, màu trắng, không mùi, tan hoàn toàn trong nước, độ ẩm là 6,12%, chỉ số DE là $17 \div 20$.

* **Gum arabic:** gum arabic thực phẩm do Trung Quốc sản xuất. Gum arabic tan tốt trong nước, không tan trong chất béo, có độ nhớt thấp, có thể hòa tan đến nồng độ dung dịch 55%. Gum arabic hoàn toàn có thể hòa tan trong nước lạnh trong khi các loại gum khác không thể hoặc bị tạo huyền phù ở dạng keo hoặc hòa tan không hoàn toàn và chỉ số pH tự nhiên là 3,9 – 4,9.

* **Saccharose:** Sản phẩm của Nhật, dạng bột mịn, màu trắng, không mùi, tan hoàn toàn trong nước, độ ẩm là 4 – 5%, chỉ số DE là 22 - 25.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Các phương pháp nghiên cứu protease và chondroitin sulfate

2.2.1.1. Xác định hoạt độ protease theo phương pháp Anson [50, 52, 60, 62, 68]

Nguyên tắc của phương pháp là 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 bằng phản ứng màu với thuốc thử Folin - Ciocalteu. Dựa vào đồ thị chuẩn tyrosine để định lượng tương ứng với lượng sản phẩm tạo thành dưới tác dụng của enzyme.

2.2.1.2. Phương pháp định lượng hàm lượng chondroitin sulfate

Định lượng CS bằng phương pháp so màu theo Farndale và cộng sự [56].

Nguyên lý: dựa trên sự thay đổi trong quang phổ hấp thụ của DMMB (1,9 Dimethylmethylen) khi tác dụng với chondroitin sulfate ở bước sóng 525nm. Dựa vào đường chuẩn 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 .

- Chuẩn bị mẫu

+ Pha xanh methylen: cân chính xác 15 mg xanh methylen, hòa tan trong 75 ml nước cất và định mức bằng nước cất đến 100 ml trong bình định mức 100 ml lắc đều trong 5 phút. Sau đó, chuyển 25 ml dịch trên vào bình định mức 100 ml và định mức bằng nước cất đến 100 ml. Thu được dịch xanh methylene có nồng độ 37,5 $\mu\text{g/ml}$.

+ Chuẩn bị dung dịch CS chuẩn: cân chính xác 100 mg CS chuẩn 92,42%, hòa tan trong nước cất và định mức lên 100 ml. Sau đó, chuyển 5 ml dịch trên vào bình định mức 100 ml định mức lên 100 ml và lắc đều. Thu được dịch CS chuẩn có nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$.

+ Chuẩn bị mẫu kiểm tra hàm lượng CS: dịch thu được sau thủy phân, lấy 5ml chuyển vào bình định mức 100 ml và định mức đến 100ml.

- Cách tiến hành

Chuẩn bị 3 bình định mức 50 ml, gồm mẫu trống, mẫu chuẩn và mẫu kiểm tra hàm lượng CS. Cho vào mỗi bình 10 ml xanh methylen, thêm 2 ml dịch thủy phân vào mẫu kiểm tra hàm lượng CS, 2 ml dung dịch CS chuẩn vào mẫu chuẩn và mẫu trống là 2 ml nước cất. Sau đó, định mức lên 50 ml, lắc đều trong vòng 30 phút và so màu ở bước sóng 525nm.

- **Tính kết quả:** hàm lượng CS được tính như sau:

$$\text{CS} = \frac{\text{OD}_b - \text{OD}_t}{\text{OD}_b - \text{OD}_{st}} \times G_t \times P$$

Trong đó:

OD_b : Độ hấp thụ của mẫu trống.

OD_t : Độ hấp thụ của mẫu kiểm tra hàm lượng CS.

OD_{st}: Độ hấp thụ của mẫu CS chuẩn.

G_t: Khối lượng CS chuẩn sử dụng (mg).

P: Phần trăm độ tinh khiết của CS tiêu chuẩn (92,42%).

CS: Lượng CS trong mẫu.

2.2.1.3. Phương pháp đánh giá hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate và bột đậm

*** Hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate trong quá trình thủy phân:** hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate trong quá trình thủy phân (H_c) được tính bằng tỷ lệ phần trăm (%) giữa tổng lượng chondroitin thu được trong dịch thủy phân sụn cá mập so với tổng lượng chondroitin sulfate có trong nguyên liệu sụn cá mập.

$$H_C = \frac{m_{cd}}{m_{cn}} \times 100\%$$

Trong đó: H_c: hiệu suất thu nhận chondroitin sulfate.

m_{cd}: tổng lượng chondroitin có dịch thủy phân sụn cá mập thu được.

m_{cn}: tổng lượng chondroitin có trong nguyên liệu sụn cá mập dùng trong quá trình thủy phân.

*** Hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate trong quá trình sấy phun:** hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate trong quá trình sấy phun (H_{csấy}) được tính bằng tỷ lệ phần trăm (%) giữa tổng lượng chondroitin có trong bột đậm thu được sau sấy so với tổng lượng chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân sụn cá mập.

$$H_{Csấy} = \frac{m_{cbột}}{m_{cd}} \times 100\%$$

Trong đó: H_{csấy}: hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate trong quá trình sấy phun.

m_{cbột}: tổng lượng chondroitin có trong bột đậm thu được.

m_{cd}: tổng lượng chondroitin có trong dịch thủy phân sụn cá mập dùng trong sấy phun.

*** Hiệu suất thu hồi bột đậm của quá trình sấy phun:** hiệu suất thu hồi bột đậm sau quá trình sấy phun (H_{bd}) được tính bằng tỷ lệ phần trăm (%) giữa tổng lượng chất khô có trong bột đậm thu được sau sấy so với tổng lượng chất khô có trong dịch thủy phân sụn cá mập trước sấy.

$$H_{bđ} = \frac{m_{bột}}{m_{dd}} \times 100\%$$

Trong đó: $H_{bsấy}$: hiệu suất thu hồi bột đậm sau quá trình sấy phun.

$m_{bột}$: tổng lượng chất khô có trong bột đậm thu được sau sấy.

m_{dd} : tổng lượng chất khô có trong dịch thủy phân sụn cá mập trước sấy.

2.2.2. Các phương pháp phân tích hóa học

* Định lượng protein hòa tan theo phương pháp Lowry [66]

Nguyên tắc của phương pháp là các acid 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.

* Định lượng N_{TS} theo phương pháp Kjeldahl: theo TCVN 8133-1:2009 [25].

* Định lượng N_{aa} theo phương pháp Sorensen [3].

* Định lượng N_{NH_3} theo phương pháp chưng cất lôi cuốn theo hơi nước [3, 25, 66].

* Định lượng lipid theo phương pháp Soxhlett [3, 25].

* Xác định hàm lượng nước: theo phương pháp sấy đến khối lượng không đổi ở 105°C theo TCVN 1867:2001 [3, 25].

* Xác định hàm lượng tro: hàm lượng tro được xác định bằng phương pháp nung đến khối lượng không đổi ở 600°C theo TCVN 5611 - 1991 [3, 25].

* Xác định thành phần ion kim loại bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử trên máy ASS (HTNT) Jarrell – Ash Model AA – IEWT (Nhật Bản) theo AOAC999.11:2011.

* **Định lượng peptid theo phương pháp dựa vào đường chuẩn tyrosine** [13, 30, 31]. 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 Na_2CO_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 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:

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

* Xác định thành phần và hàm lượng acid amin bằng phương pháp sắc ký lỏng theo AOAC 994.12 (2012) [3, 25].

* Xác định năng lượng dinh dưỡng: theo CAC/GL-2/1985 (Rev.1-1993) FAO [26]

2.2.3. Các phương pháp phân tích cấu trúc

* **Phổ hồng ngoại (IR):** phương pháp đo quang phổ hồng ngoại (IR) - nguyên tắc của phương pháp này là dựa trên sự hấp thụ năng lượng bức xạ trong vùng hồng ngoại của phân tử do sự thay đổi trạng thái năng lượng chuyển động quay và chuyển động dao động từ trạng thái năng lượng cơ bản đến năng lượng trạng thái kích thích. Tần số hấp thụ hồng ngoại là những thông tin hữu ích cho việc nghiên cứu chi tiết cấu trúc phân tử. Phổ hồng ngoại được đo trên máy NICOLET IMPACT 410 FTIR spectrometer tại Viện Hóa hữu cơ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

* **Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR):** Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo ở 70°C với dung môi D₂O, với kỹ thuật đo khử tín hiệu của H₂O trên máy 500MHz BRUKER AVANCE tại Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

* **Xác định tính chất nhiệt bằng DSC:** Tính chất nhiệt của mẫu bột đậm được xác định bằng thiết bị phân tích nhiệt quét vi sai bù năng lượng DSC-60, Shimadzu - Nhật Bản. Khoảng nhiệt độ đo từ 30 ÷ 600°C.

2.2.4. Phương pháp định lượng vi sinh vật

Xác định hàm lượng vi sinh vật bằng phương pháp đếm khuẩn lạc.

* **Xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí:** TCVN 4884: 2005

* **Xác định tổng số bào tử nấm men, nấm mốc:** TCVN 4993: 1989

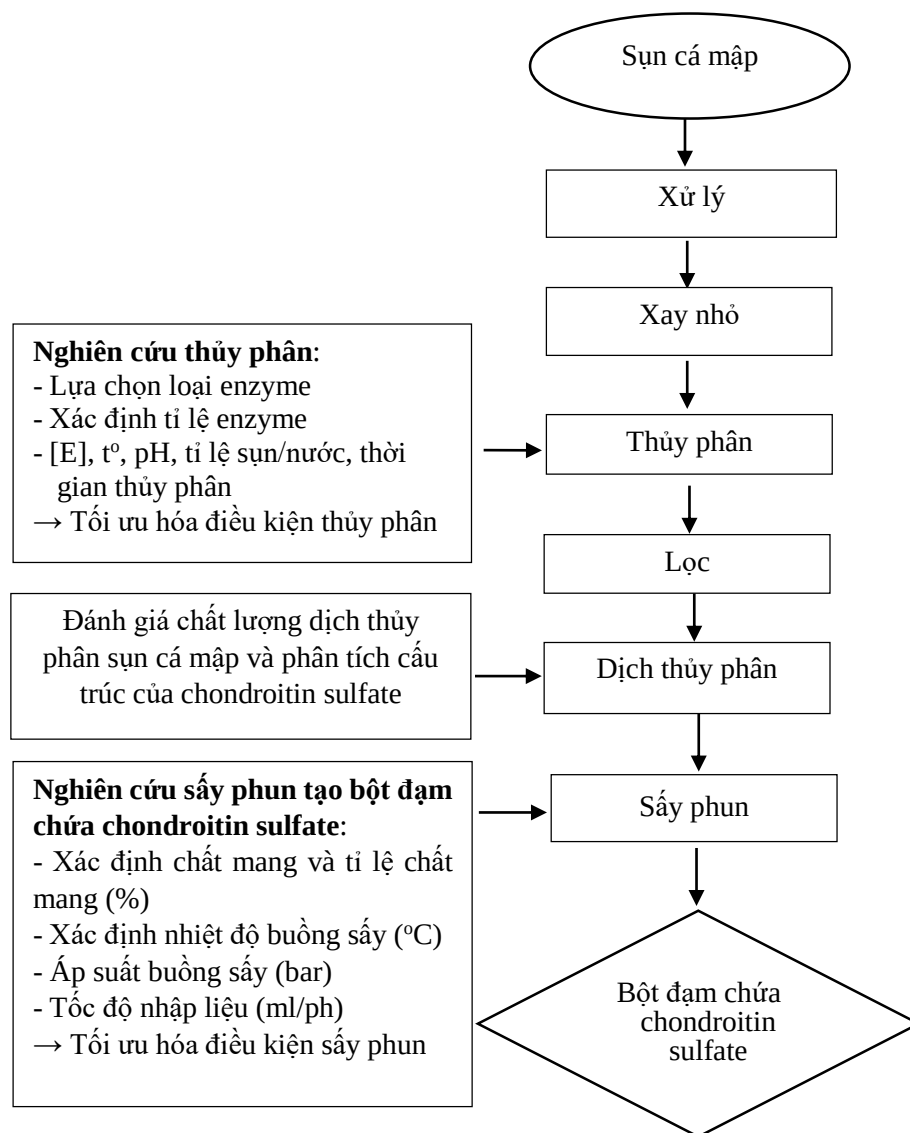
* **Xác định *Coliforms*:** TCVN 4882: 2007

* **Xác định *Salmonella*:** TCVN 4829:2005

2.3. PHƯƠNG PHÁP BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM

2.3.1. Phương pháp tiếp cận các nội dung nghiên cứu

Toàn bộ quá trình nghiên cứu luận án được thực hiện theo sơ đồ hình 2.2.



Hình 2.2. Sơ đồ cách tiếp cận các nội dung nghiên cứu

Luận án sử dụng sụn cá mập trắng (*C. dussumieri*) làm nguyên liệu cho quá trình nghiên cứu. Cá mập trắng được thu mua nguyên con tại cảng cá Vĩnh Lương - Nha Trang - Khánh Hòa. Sau thu mua, thu toàn bộ vây cá, sụn cá để vận chuyển về phòng thí nghiệm. Tại phòng thí nghiệm, tiến hành xử lý loại bỏ thịt, mô liên kết, làm sạch, xay nhỏ, đóng túi 2kg/túi, cấp đông và bảo quản đông ở -20°C để dùng trong suốt quá trình nghiên cứu.

Nội dung đầu tiên của luận án là nghiên cứu thủy phân sụn cá mập bằng enzyme

protease. Mục tiêu của nội dung này là xác định được quy trình thủy phân sụn cá mập bằng enzyme protease và sản xuất được dịch thủy phân sụn cá mập. Để hoàn thành nội dung này, luận án tiến hành nghiên cứu lựa chọn loại enzyme protease thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập trong số các enzyme protease thương mại: alcalase, papain, neutrase, flavourzym. Trong quá trình thí nghiệm, lấy mẫu thủy phân để đánh giá: hàm lượng protein hòa tan, hàm lượng peptid, hàm lượng Naa, hàm lượng chondroitin sulfate, hàm lượng N_{NH_3} tạo thành theo thời gian thủy phân. Kết quả đánh giá mẫu thủy phân về hàm lượng protein hòa tan, hàm lượng peptid, hàm lượng Naa, hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành cao trong quá trình thủy phân và hàm lượng N_{NH_3} tạo thành không cao trong quá trình thủy phân là cơ sở để lựa chọn loại enzyme protease dùng cho quá trình thủy phân. Sau khi lựa chọn được loại enzyme protease thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập, luận án tiếp tục tiến hành nghiên cứu: xác định nồng độ enzyme, nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân, pH, tỉ lệ sụn/nước, thời gian thủy phân và cuối cùng là tối ưu hóa quá trình thủy phân sụn cá mập bằng enzyme protease đã chọn. Kết quả đánh giá mẫu thủy phân về hàm lượng protein hòa tan, hàm lượng peptid, hàm lượng Naa, hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành cao trong quá trình thủy phân và hàm lượng N_{NH_3} tạo thành không cao trong quá trình thủy phân là cơ sở để lựa chọn các thông số thích hợp cho quá trình thủy phân. Từ đó tiến hành đề xuất quy trình thủy phân sụn cá mập bằng enzyme protease.

Nội dung thứ 2 của luận án là đánh giá chất lượng dịch thủy phân sụn cá mập và xác định cấu trúc chondroitin sulfate. Để thực hiện nội dung này, luận án tiến hành thử nghiệm thủy phân sụn cá mập theo quy trình và tiến hành vô hoạt enzyme, lọc để thu dịch thủy phân sụn cá mập. Dịch lọc thu được dùng để phân tích, đánh giá chất lượng và kết tủa thu chondroitin sulfate dùng trong phân tích cấu trúc, thành phần của chondroitin sulfate.

Nội dung thứ 3 của luận án là Nghiên cứu sấy phun tạo bột đậm thủy phân chứa chondroitin sulfate. Để thực hiện nội dung nghiên cứu này, luận án phải tiến hành thủy phân sụn cá mập theo quy trình đề xuất và thu dịch thủy phân dùng trong nghiên cứu sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate. Trước tiên, luận án tiến hành nghiên cứu lựa chọn loại chất mang dùng cho quá trình sấy phun trong số 3 loại chất mang

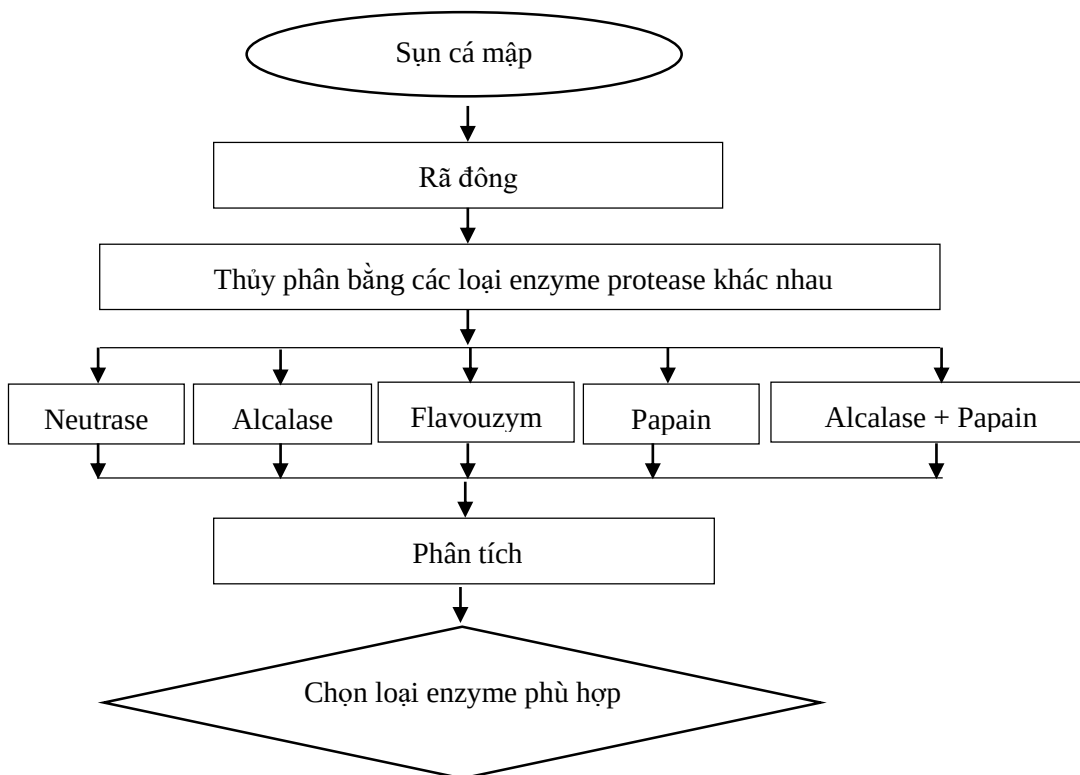
(maltodextrin, gum arabic và saccharose). Trong quá trình sấy phun sẽ tiến hành lấy mẫu đánh giá hiệu suất thu chondroitin sulfate và hiệu suất thu bột đậm làm cơ sở lựa chọn chất mang phù hợp. Tiếp theo, luận án tiếp tục nghiên cứu xác định tỉ lệ chất mang sử dụng trong sấy phun, xác định nhiệt độ buồng sấy ($^{\circ}\text{C}$), xác định áp suất buồng sấy (bar) và tốc độ nhập liệu (ml/ph) làm cơ sở cho quá trình tối ưu hóa điều kiện sấy phun. Kết xác định hiệu suất thu chondroitin sulfate và hiệu suất thu bột đậm cao là cơ sở xác định điều kiện tối ưu cho quá trình sấy phun. Bột đậm thu được sẽ được lấy mẫu để phân tích, đánh giá chất lượng làm cơ sở xác định khả năng sử dụng bột đậm chứa chondroitin sulfate theo định hướng làm thực phẩm chức năng.

2.3.2. Bố trí thí nghiệm xác định các thông số của quá trình nghiên cứu

2.3.2.1. Xác định các thông số thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập bằng enzyme protease

* Xác định loại enzyme protease thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập

Mục đích của thí nghiệm là lựa chọn được loại enzyme protease thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập. Tiến hành bố trí thí nghiệm theo hình 2.3.

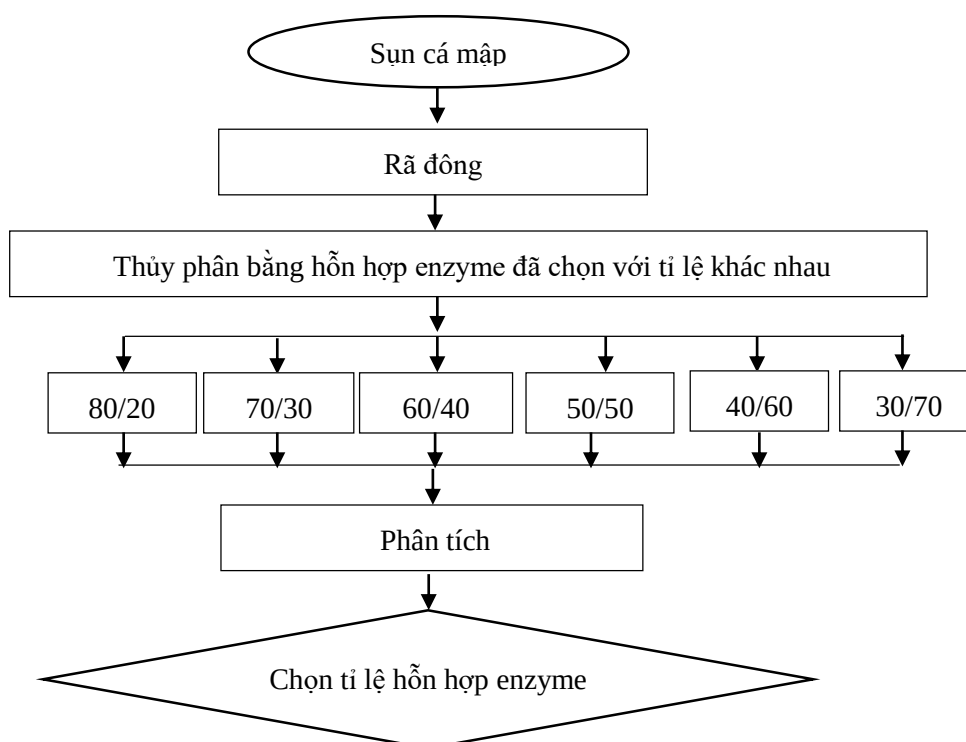


Hình 2.3. Sơ đồ thí nghiệm lựa chọn loại enzyme protease thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập

Từ sơ đồ thí nghiệm trình bày ở hình 2.3, luận án sẽ tiến hành 5 thí nghiệm thủy phân hỗn hợp sụn cá mập bằng các loại 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 2kg hỗn hợp sụn cá mập, tỷ lệ enzyme sử dụng là 0,2% và lượng nước bổ sung là 2 lít, pH thủy phân là pH tự nhiên của hỗn hợp sụn cá mập (pH 6,8) và nhiệt độ thủy phân 50°C. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ, 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 loại enzyme phù hợp cho quá trình thủy phân dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.

***Xác định tỷ lệ giữa các enzyme đã chọn dùng cho quá trình thủy phân**

Mục đích của thí nghiệm là lựa chọn được tỉ lệ giữa các protease thích hợp trong hỗn hợp enzyme protease để thủy phân sụn cá mập. Tiến hành bố trí thí nghiệm như hình 2.4.



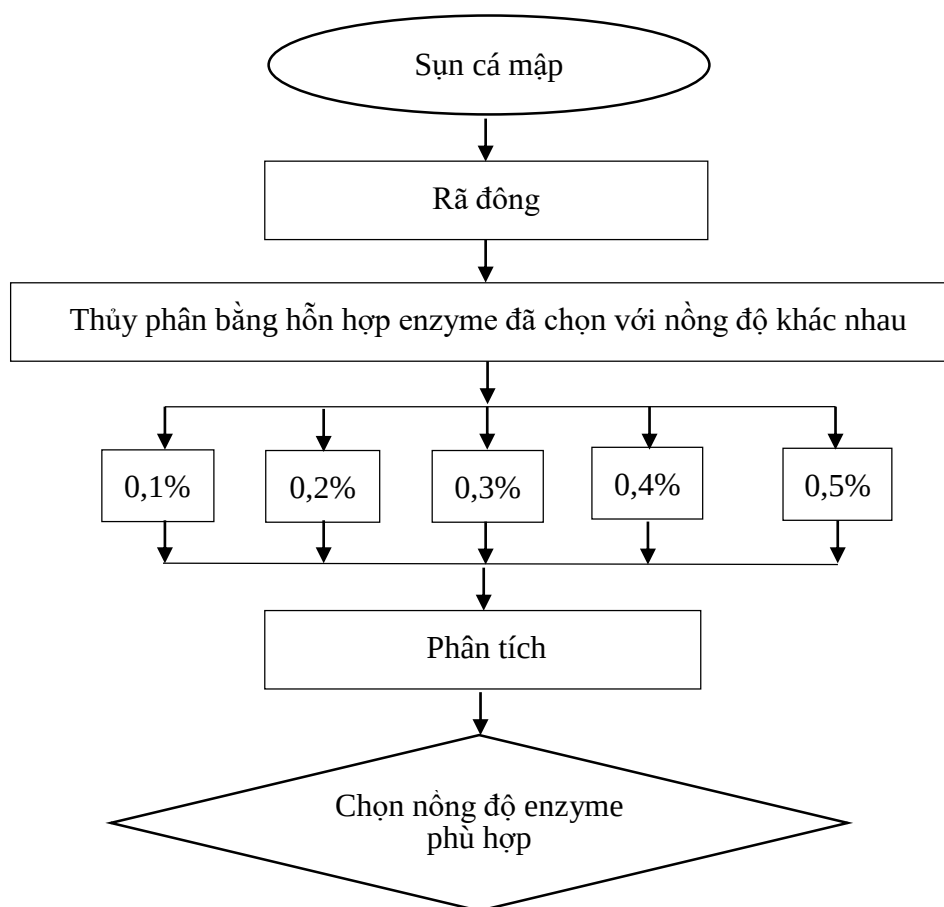
Hình 2.4. Sơ đồ thí nghiệm lựa chọn tỷ lệ hỗn hợp enzyme thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập

Từ sơ đồ trên, tiến hành 6 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp

enzyme protease đã chọn với tỷ lệ phối trộn 2 enzyme khác nhau lần lượt là: mẫu 1: 80/20, mẫu 2: 70/30, mẫu 3: 60/40, mẫu 4: 50/50, mẫu 5: 40/60 và mẫu 6: 30/70. Các mẫu thủy phân đều sử dụng 2kg hỗn hợp sụn cá mập, nồng độ hỗn hợp enzyme sử dụng là 0,2% và lượng nước bổ sung là 2 lít, pH thủy phân tự nhiên của hỗn hợp sụn cá mập (pH 6,8) và nhiệt độ thủy phân 50⁰C. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ thủy phân, tiến hành lấy mẫu dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa, N_{NH3} và hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành. Kết quả đánh giá là cơ sở để lựa chọn tỷ lệ giữa các enzyme đã chọn thích hợp cho quá trình thủy phân dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.

*** Xác định nồng độ hỗn hợp enzyme thích hợp cho quá trình thủy phân**

Mục đích của thí nghiệm là lựa chọn được nồng độ thích hợp của hỗn hợp enzyme protease dùng cho quá trình thủy phân sụn cá mập. Để hoàn thành nội dung này, tiến hành bố trí thí nghiệm như hình 2.5.

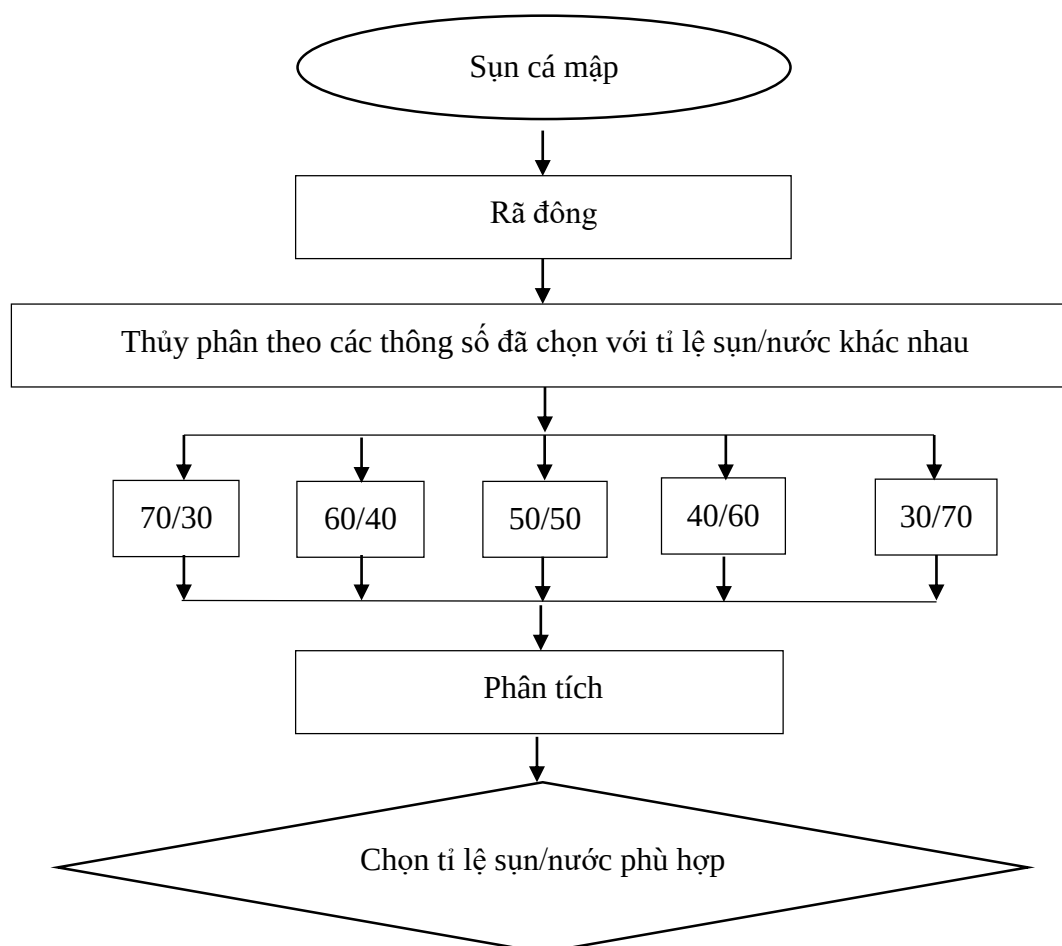


Hình 2.5. Sơ đồ thí nghiệm xác định nồng độ hỗn hợp enzyme protease thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập

Từ sơ đồ bố trí thí nghiệm trình bày ở hình 2.5, tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme đã chọn 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, 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 50⁰C. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ, tiến hành lấy mẫu dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa, N_{NH3} và hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành. Kết quả đánh giá là cơ sở để lựa chọn nồng độ hỗn hợp enzyme phù hợp cho quá trình thủy phân dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.

*** Xác định tỉ lệ nước/nguyên liệu thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập**

Mục đích của thí nghiệm là xác định được tỉ lệ nước/nguyên liệu thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập. Tiến hành bố trí thí nghiệm theo hình 2.6.

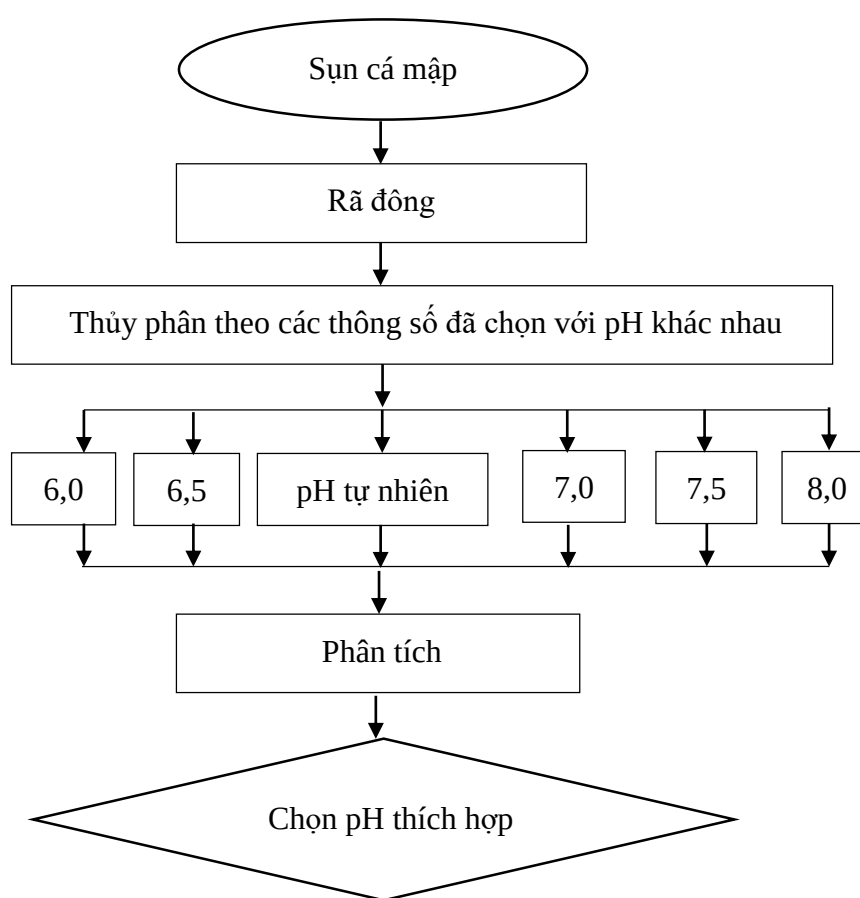


Hình 2.6. Sơ đồ thí nghiệm xác định tỉ lệ nước bổ sung thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập

Từ sơ đồ thí nghiệm trình bày ở hình 2.6, tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập với các thông số đã chọn, tỉ lệ nước bổ sung khác nhau lần lượt mẫu 1: 70/30, mẫu 2: 60/40, ..., mẫu 5: 30/70. Các mẫu thủy phân đều sử dụng 2kg hỗn hợp sụn cá mập, thủy phân ở pH tự nhiên của hỗn hợp sụn cá mập (pH 6,8) và nhiệt độ thủy phân 50°C. Kết quả phân tích sự thay đổi của các thông số của quá trình thủy phân là cơ sở để lựa chọn tỉ lệ sụn/nước thích hợp cho thủy phân sụn cá mập.

*** Xác định pH thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập**

Mục đích của thí nghiệm là lựa chọn được pH thích hợp cho thủy phân sụn cá mập. Tiến hành thí nghiệm theo hình 2.7.



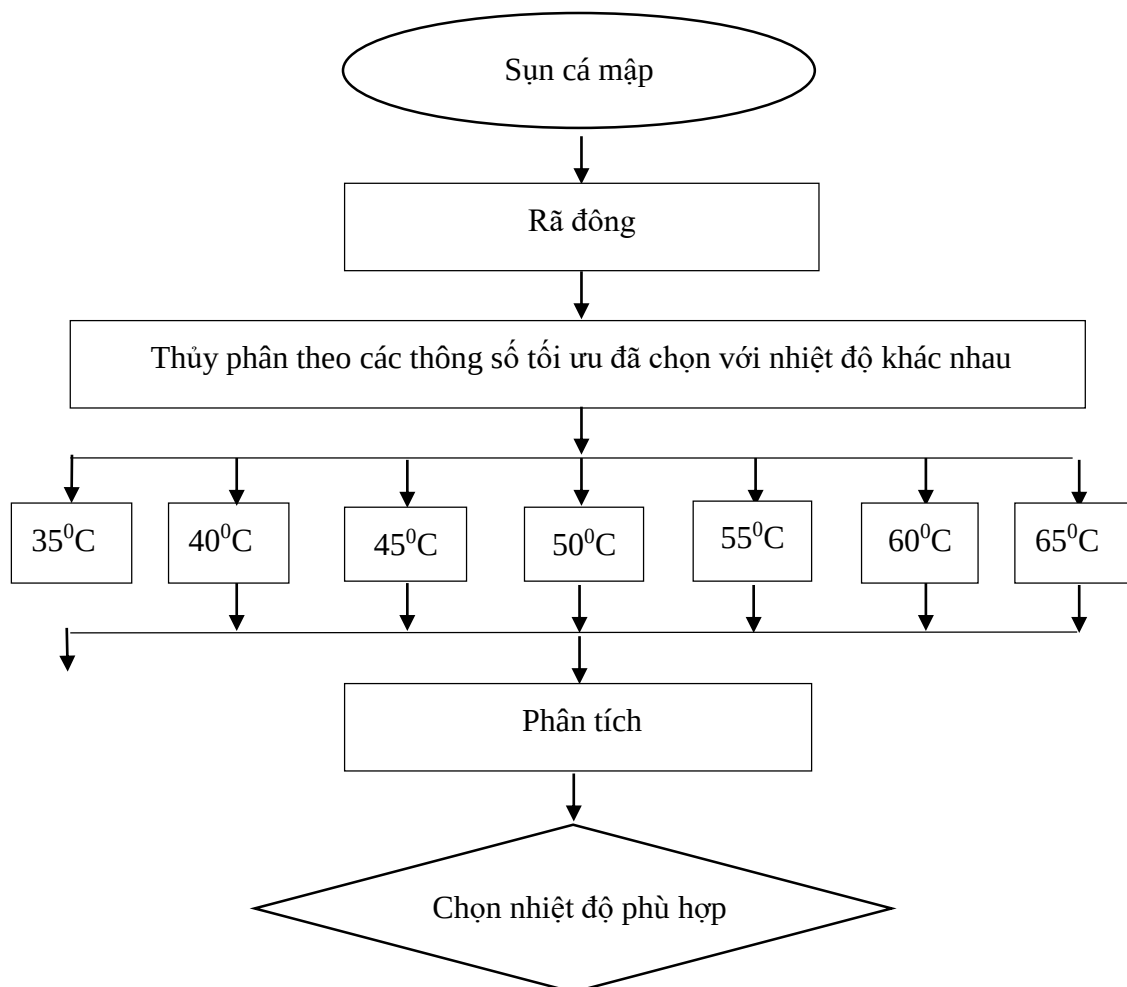
Hình 2.7. Sơ đồ thí nghiệm xác định pH thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập

Từ sơ đồ thí nghiệm trình bày ở hình 2.7, tiến hành 6 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập với pH khác nhau: mẫu 1: 6,0, mẫu 2: 6,5, ..., mẫu 5: 8,0. Các mẫu thủy phân đều sử dụng 2kg hỗn hợp sụn cá mập, với các thông số đã chọn ở trên. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ, tiến hành lấy mẫu dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa, N_{NH_3} và hàm lượng

chondroitin sulfate tạo thành. Kết quả đánh giá cao là cơ sở để lựa chọn pH thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.

*** Xác định nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập**

Mục đích của thí nghiệm là xác định được nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập. Tiến hành thí nghiệm theo hình 2.8.



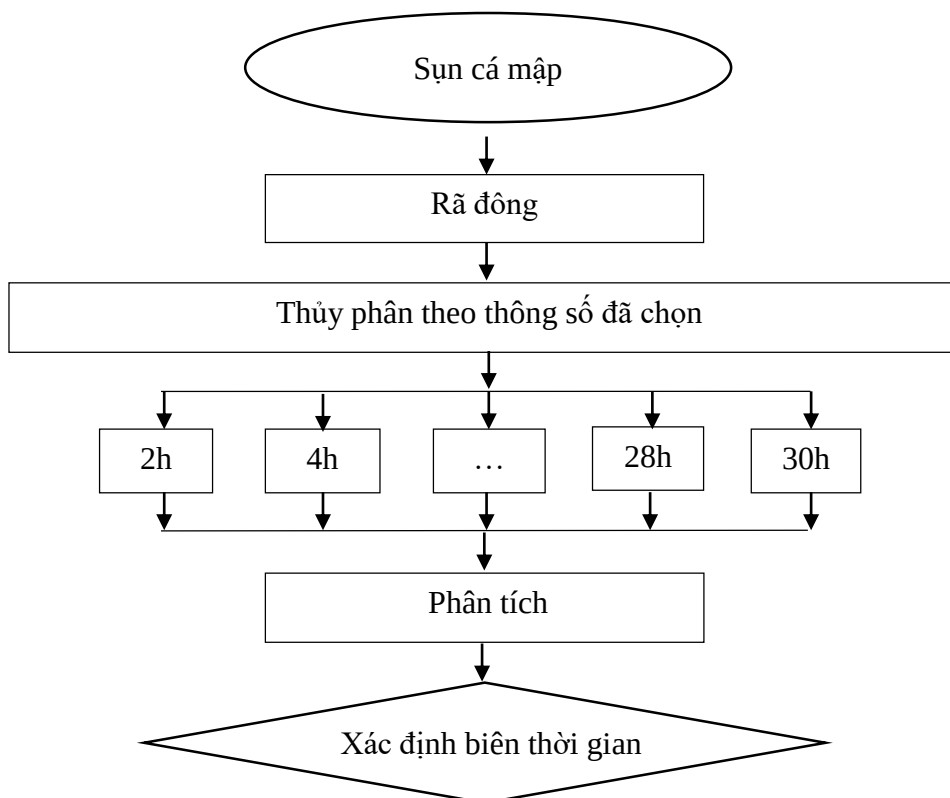
Hình 2.8. Sơ đồ thí nghiệm xác định nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập

Tiến hành 7 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập theo sơ đồ trên với nhiệt độ thủy phân khác nhau: mẫu 1: 40°C, mẫu 2: 45°C, ..., mẫu 7: 65°C. Các mẫu thủy phân đều sử dụng 2kg hỗn hợp sụn cá mập, thủy phân theo các thông số đã chọn. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ, tiến hành lấy mẫu dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng protein hòa tan, peptid, N_{aa} , N_{NH_3} và hàm lượng chondroitin

sulfate tạo thành. Kết quả đánh giá là cơ sở để lựa chọn nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.

*** Xác định thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập**

Mục đích của thí nghiệm là xác định được biên thời gian thích hợp cho quá thủy phân sụn cá mập bằng enzyme protease. Tiến hành thí nghiệm theo sơ đồ ở hình 2.9.



Hình 2.9. Sơ đồ thí nghiệm xác định biên thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập

Tiến hành thí nghiệm thủy phân sụn cá mập theo sơ đồ bố trí thí nghiệm trình bày ở hình 2.9. Các thí nghiệm đều sử dụng 2kg hỗn hợp sụn cá mập thủy phân theo các thông số đã chọn. Trong suốt quá trình thủy phân định kỳ lấy mẫu sau các khoảng thời gian thủy phân 2 giờ để đánh giá hàm lượng protein hòa tan, peptid, N_{aa} , N_{NH_3} và hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành. Kết quả đánh giá là cơ sở để lựa chọn thông số biên thời gian thích hợp cho quá trình tối ưu hóa thủy phân sụn cá mập bằng enzyme protease đã lựa chọn.

*** Tối ưu hóa quá trình thủy phân sụn cá mập bằng enzyme protease [9]**

Sau khi thu được các thông số biên của quá trình nghiên cứu ở trên, luận án tiến

hành xây dựng ma trận thực nghiệm và thí nghiệm tối ưu hóa. Để khảo sát vùng tối ưu, sử dụng quy hoạch bậc hai tâm xoay cho 3 yếu tố và mỗi yếu tố tiến hành tại 5 mức. Quy hoạch thực nghiệm gồm 15 thí nghiệm. Tính toán hệ số hồi quy với hàm mục tiêu là hiệu suất thu hồi dịch thủy phân với các biến lần lượt là: X_1 = Nồng độ enzyme (%), X_2 = Nhiệt độ thủy phân ($^{\circ}\text{C}$), X_3 = Thời gian thủy phân (giờ). Thí nghiệm sử dụng RSM trong phần mềm JMP10 để bố trí và tối ưu hóa các nhân tố thí nghiệm. Mỗi nhân tố được khảo sát với 5 mức độ ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$) được tính toán từ việc chạy phần mềm.

Bảng 2.1. Mã hóa biến nồng độ enzyme, nhiệt độ, thời gian thủy phân và các mức độ khảo sát

Các yếu tố	Mức tiến hành				
	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
X_1 = Nồng độ enzyme (%)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
X_2 = Nhiệt độ thủy phân ($^{\circ}\text{C}$)	40	45	50	55	60
X_3 = Thời gian thủy phân (giờ)	16	18	20	22	24

Ghi chú: $\alpha = 2$, giá trị cận trên (+1) và cận dưới (-1) của biến độc lập, $(\text{Biến ảo min} + \text{Biến ảo max})/2$ là giá trị trung bình của cận trên và cận dưới.

* **Phân tích số liệu:** Thí nghiệm được thực hiện theo thiết kế như ở bảng 2.1. Phép phân tích phương sai được sử dụng để phân tích ảnh hưởng của các yếu tố trong thí nghiệm, ảnh hưởng tương tác của chúng lên hàm mục tiêu. Sau khi loại bỏ những yếu tố ảnh hưởng không đáng kể tới hàm mục tiêu với độ khác biệt nhỏ nhất (LSD) ở mức ý nghĩa 95%. Mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của các biến độc lập đối với biến phụ thuộc có dạng hàm đa thức bậc hai ở dạng tổng quát như sau:

$$Y_k = B_0 + \sum_{j=1}^3 B_j X_j + \sum_{i,j=1}^3 B_{ij} X_i X_j + \sum_{j=1}^3 B_{jj} X_j^2$$

Trong đó:

Y_k : Biến phụ thuộc ($k = 1 - 3$)

$X_{i,j}$: Nhân tố mã hóa của biến độc lập ảnh hưởng đến Y_k

B_0 : Hệ số hồi qui bậc 0

B_j : Hệ số hồi qui bậc 1 mô tả ảnh hưởng của biến X_j đến Y_k

B_{ij} : Hệ số ảnh hưởng đồng thời của biến X_i và X_j đến Y_k

B_{jj} : Hệ số hồi qui bậc hai mô tả ảnh hưởng của biến X_j^2 đến Y_k

*** Đánh giá mô hình**

Mô hình và phương trình hồi qui được kiểm tra mức độ phù hợp với thực nghiệm bằng kiểm định Fisher của mô hình (với giá trị $P_{\text{value}} < \alpha = 0,05$) và sự thiếu phù hợp (Lack of fit). Nếu giá trị Pvalue nhỏ hơn giá trị α và càng nhỏ thì mô hình càng phù hợp (giá trị α thường lấy 0,05 - tức là 5%). Hệ số Lack of fit phải lớn hơn giá trị α (lớn hơn 0,05) thì mô hình đó mới phù hợp, giá trị Lack of fit càng lớn thì mức độ phù hợp của mô hình càng tăng. Ngoài ra còn có một số các thông số đánh giá khác như hệ số tương quan (Correlation coefficient) giữa các kết quả dự đoán của mô hình (Y') với các kết quả thực nghiệm (Y), hệ số xác định (Coefficient of Determination) và độ lệch chuẩn tương đối CV% (Coefficient of Variation). Cuối cùng, thực hiện việc phân tích tại điểm tối ưu với các điều kiện nồng độ enzyme, nhiệt độ thủy phân, thời gian thủy phân trong mẫu tìm thấy và so sánh với kết quả dự đoán để kiểm tra sự chính xác của mô hình dự đoán.

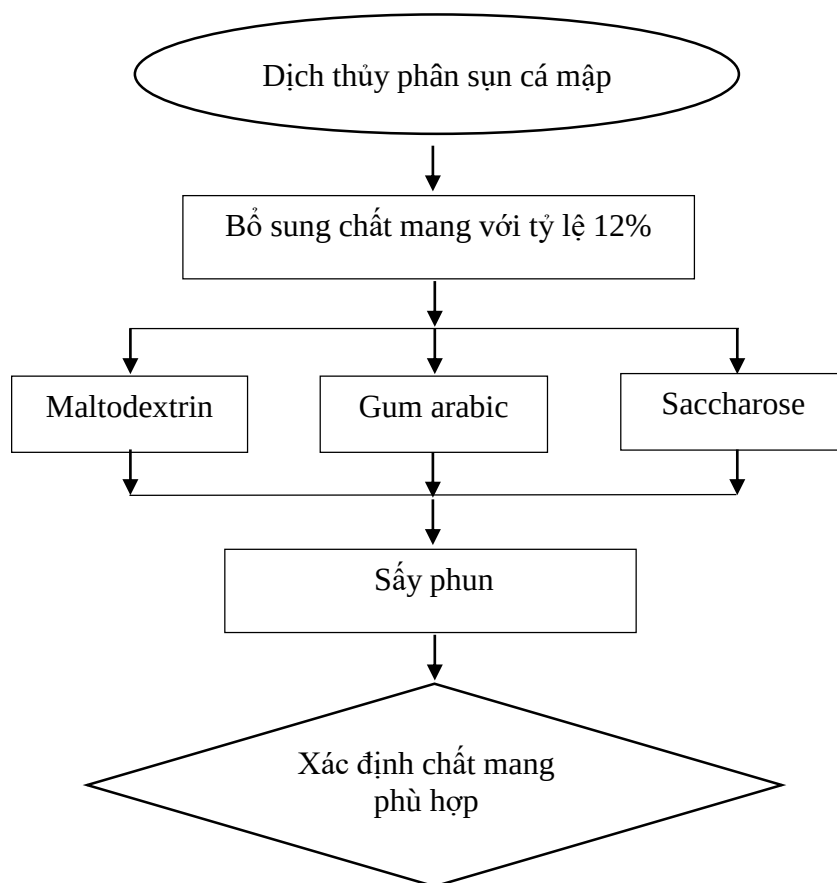
2.3.2.2. Xác định các thông số thích hợp cho quá trình sấy phun tạo bột đậm thủy phân chứa chondroitin sulfate.

*** Xác định loại chất mang sử dụng cho quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate.**

Mục đích của thí nghiệm là xác định được loại chất mang thích hợp cho quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate. Tiến hành thí nghiệm theo sơ đồ trình bày ở hình 2.10.

Từ sơ đồ bố trí thí nghiệm trình bày ở hình 2.10, tiến hành 3 mẫu thí nghiệm sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate ở các điều kiện cố định đã chọn dựa theo các thông số tham khảo từ các nghiên cứu sấy phun trước đây: nhiệt độ buồng sấy là 80°C, áp suất buồng sấy 2,5bar; tốc độ nhập liệu 12ml/phút. Trong thí nghiệm này, thông số thay đổi là loại chất mang: Maltodextrin, Gum arabic và Sacharose với tỷ lệ sử dụng là

2%. Sau khi sấy phun thu bột đậm, tiến hành lấy mẫu đánh giá hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate, bột đậm và hàm lượng nitơ tổng số của sản phẩm. Kết quả đánh giá là cơ sở lựa chọn chất mang bổ sung thích hợp cho các lần nghiên cứu tiếp theo.



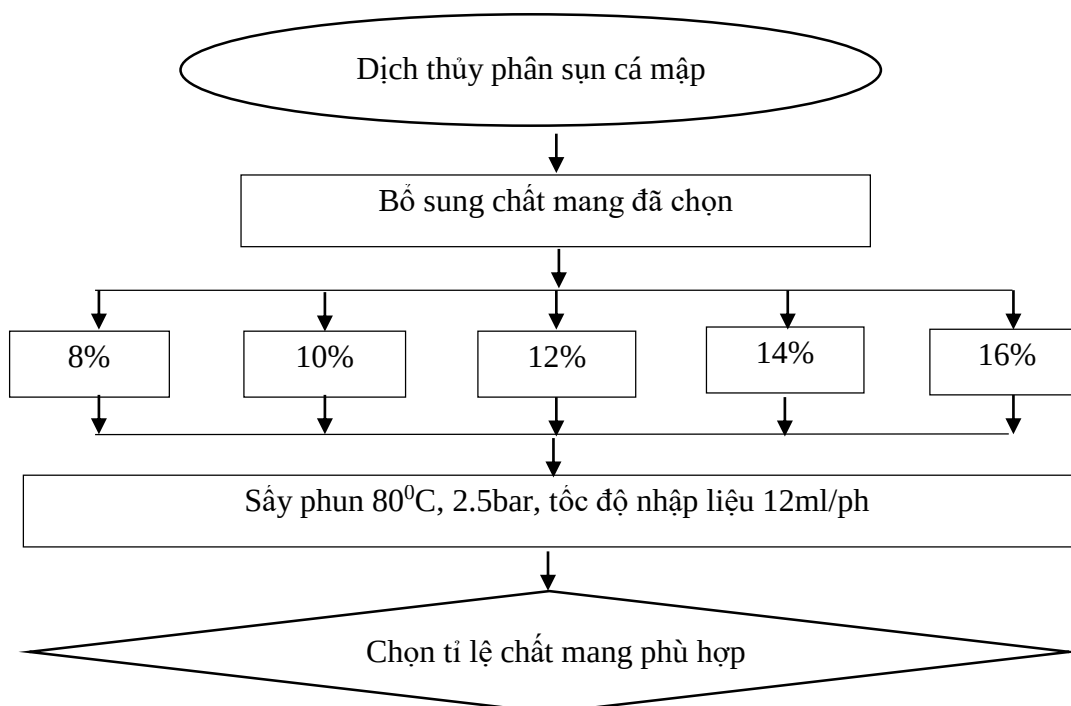
Hình 2.10. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định loại chất mang phù hợp

*** Xác định tỷ lệ chất mang sử dụng cho quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate**

Mục đích của thí nghiệm là xác định được tỷ lệ chất mang sử dụng cho quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate. Tiến hành bố trí thí nghiệm theo sơ đồ trình bày ở hình 2.11.

Từ sơ đồ thí nghiệm trình bày ở hình 2.11, tiến hành 5 mẫu thí nghiệm sấy phun dịch đậm thủy phân từ sụn cá mập theo các thông số: nhiệt độ buồng sấy 80°C, áp suất buồng sấy 2,5bar; tốc độ nhập liệu 12ml/phút và chất mang đã lựa chọn ở trên với tỷ lệ sử dụng trong quá trình sấy thay đổi lần lượt là 8%; 10%; 12%; 14 % và 16%. Sau sấy phun, lấy mẫu sản phẩm, đánh giá hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate và hiệu suất thi

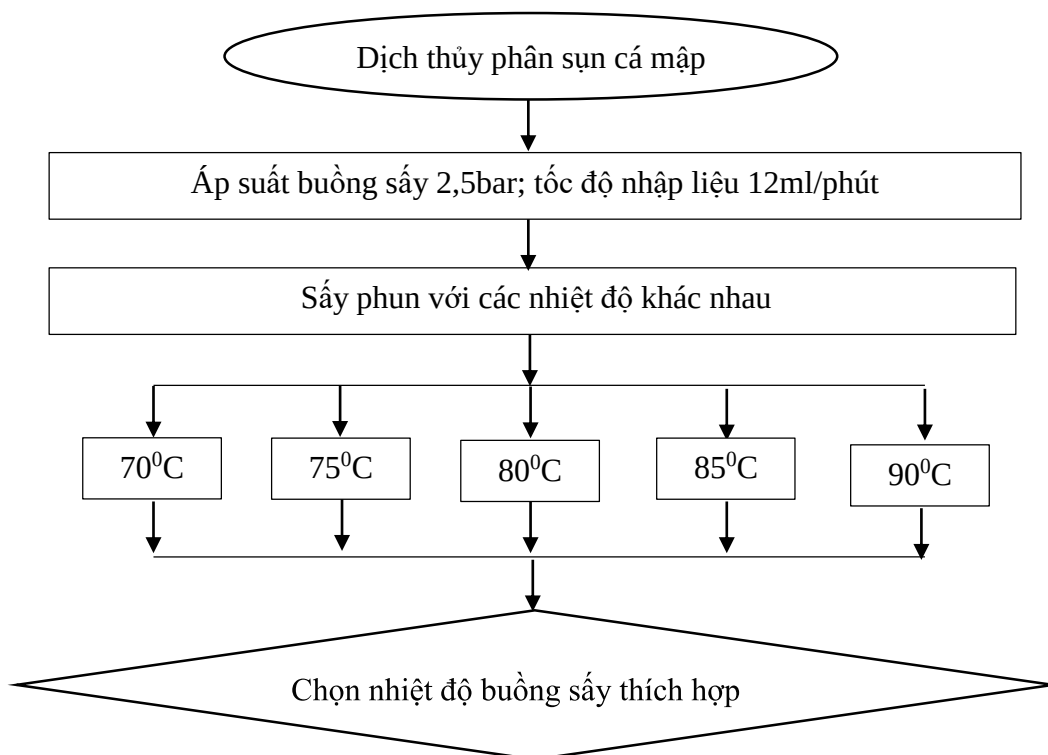
hồi bột đậm. Kết quả phân tích cao là cơ sở lựa chọn tỷ lệ chất mang bổ sung thích hợp dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2.11. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định tỉ lệ chất mang bổ sung

*** Xác định nhiệt độ buồng sấy**

Mục đích của thí nghiệm là xác định được nhiệt độ buồng sấy cho quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate. Tiến hành bố trí thí nghiệm theo sơ đồ trình bày ở hình 2.12.

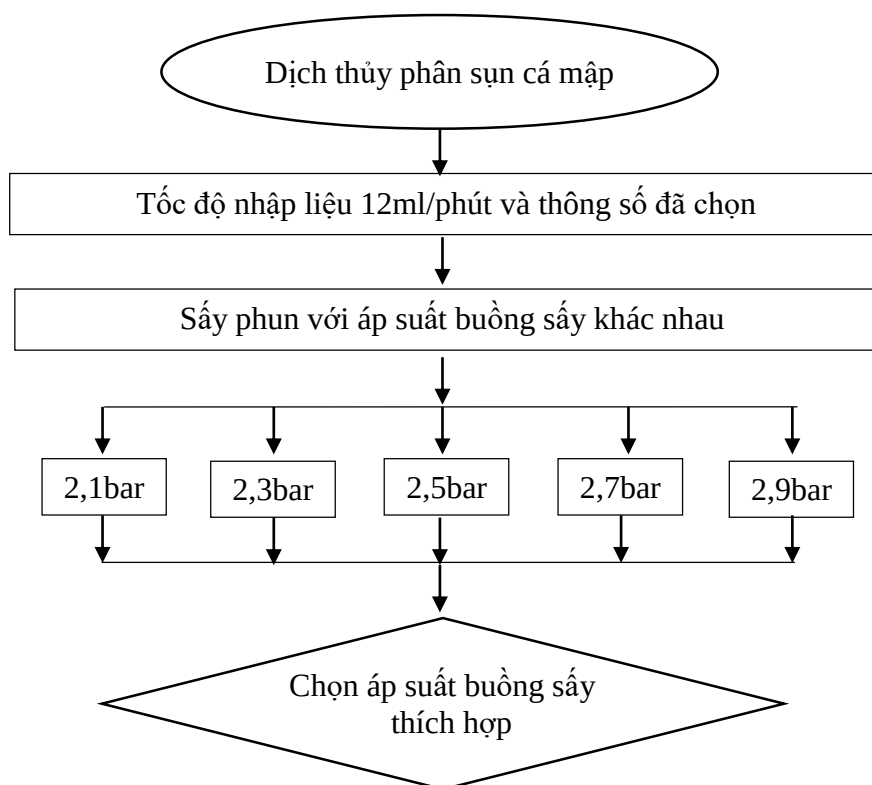


Hình 2.12. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định nhiệt độ buồng sấy thích hợp

Từ sơ đồ trên, tiến hành 5 mẫu thí nghiệm sấy phun dịch đậm thủy phân từ sụn cá mập theo các thông số: áp suất buồng sấy 2,5bar; tốc độ nhập liệu 12ml/phút, tỷ lệ chất mang bổ sung đã lựa chọn ở trên và nhiệt độ buồng sấy thay đổi như sau: 70°C, 75°C, 80°C, 85°C và 90°C. Sau sấy phun, lấy mẫu sản phẩm, đánh giá hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate, bột đậm và độ ẩm. Kết quả đánh giá cao là cơ sở lựa chọn ra nhiệt độ buồng sấy phù hợp dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.

*** Xác định áp suất buồng sấy**

Mục đích của thí nghiệm là xác định được áp suất buồng sấy thích hợp cho quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate. Tiến hành bố trí thí nghiệm theo sơ đồ trình bày ở hình 2.13.

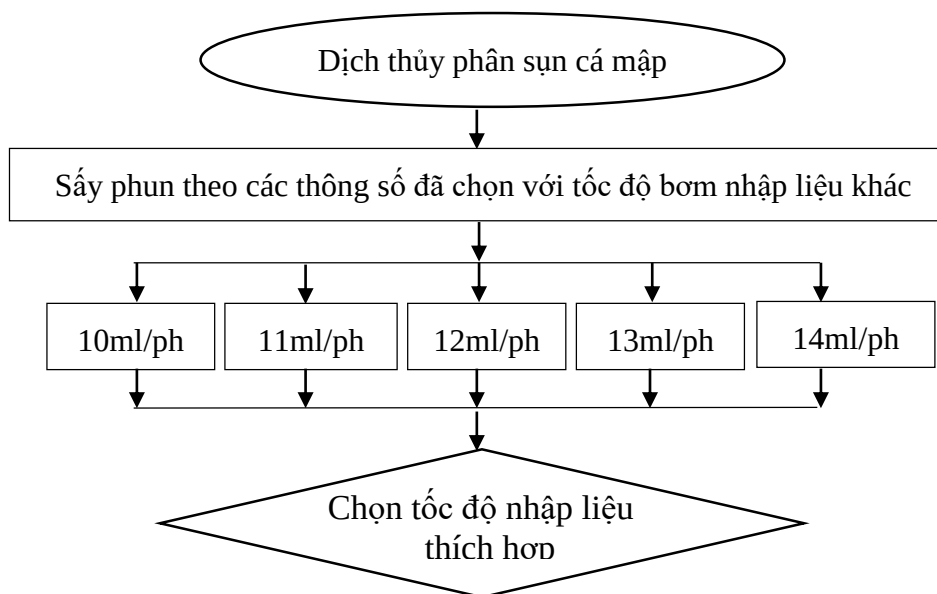


Hình 2.13. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định áp suất buồng sấy thích hợp

Từ sơ đồ thí nghiệm trình bày ở hình 2.13, tiến hành 5 mẫu thí nghiệm sấy phun dịch đậm thủy phân từ sụn cá mập theo các thông số đã lựa chọn ở trên, tốc độ nhập liệu: 12ml/phút với áp suất buồng sấy thay đổi như sau: 2,1bar; 2,3bar; 2,5bar; 2,7bar và 2,9bar. Sau sấy phun, lấy mẫu sản phẩm, đánh giá hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate, bột đậm và độ ẩm. Kết quả đánh giá cao là cơ sở lựa chọn ra áp suất buồng sấy phù hợp dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.

*** Xác định tốc độ nhập liệu**

Mục đích của thí nghiệm là xác định được tốc độ nhập liệu thích hợp cho quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate. Tiến hành bố trí thí nghiệm theo sơ đồ trình bày ở hình 2.14



Hình 2.14. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định tốc độ nhập liệu thích hợp

Từ sơ đồ trên, tiến hành 5 mẫu thí nghiệm sấy phun dịch thủy phân sụn cá mập theo các thông số đã lựa chọn ở trên, tốc độ bơm nhập liệu thay đổi như sau: 10ml/phút, 11ml/phút, 12ml/phút, 13ml/phút và 14ml/phút. Sau sấy phun, lấy mẫu sản phẩm, đánh giá hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate, bột đậm và độ ẩm. Kết quả đánh giá cao là cơ sở lựa chọn tốc độ bơm nhập liệu phù hợp dùng trong các nghiên cứu tiếp theo.

*** Tối ưu hóa quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate [9]**

Sau khi nghiên cứu lựa chọn được các thông số biên cho các biến lựa chọn để tối ưu hóa, luận án tiến hành xây dựng ma trận thực nghiệm và thí nghiệm tối ưu hóa. Để khảo sát vùng tối ưu, sử dụng quy hoạch bậc hai tâm xoay cho 3 yếu tố và mỗi yếu tố tiến hành tại 5 mức. Số lần thí nghiệm được xác định như sau: $N = 2^3 + 2 \cdot 3 + 6 = 20$ thí nghiệm. Quy hoạch thực nghiệm gồm 20 thí nghiệm. Tính toán hệ số hồi quy với hàm mục tiêu là hiệu suất thu hồi bột đậm với các biến lần lượt là: X_4 = Nhiệt độ không khí buồng sấy ($^{\circ}\text{C}$), X_5 = Tỷ lệ maltodextrin bổ sung (%), X_6 = Tốc độ nhập liệu (ml/phút). Thí nghiệm sử dụng RSM trong phần mềm Statgraphic XV để bố trí và tối ưu hóa các nhân tố thí nghiệm. Mỗi nhân tố được khảo sát với 5 mức độ ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$) được tính toán từ việc chạy phần mềm và kết quả được trình bày ở bảng 2.2.

Bảng 2.2. Mã hóa biến nhiệt độ buồng sấy, tỷ lệ maltodextrin bổ sung, tốc độ nhập liệu và các mức độ khảo sát

Các yếu tố	Mức tiến hành
------------	---------------

	-α	-1	0	1	+α
X_4 = Nhiệt độ buồng sấy ($^{\circ}\text{C}$)	70	75	80	85	90
X_5 = Tỷ lệ maltodextrin bổ sung (%)	10	11	12	13	14
X_6 = Tốc độ nhập liệu (ml/phút).	10	11	12	13	14

Ghi chú: $\alpha = 2$, giá trị cận trên (+1) và cận dưới (-1) của biến độc lập, ($\text{Biến ảo min} + \text{Biến ảo max}$)/2 là giá trị trung bình của cận trên và cận dưới.

Phân tích số liệu: Thí nghiệm được thực hiện theo thiết kế như ở Bảng 2.2, thu thập số liệu và sử dụng phần mềm để phân tích (ANOVA) với độ khác biệt nhỏ nhất (LSD) ở mức ý nghĩa 95%. Mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của các biến độc lập đối với biến phụ thuộc có dạng hàm đa thức bậc hai ở dạng tổng quát như sau:

$$Y_k = B_0 + \sum_{j=1}^3 B_j X_j + \sum_{i,j=1}^3 B_{ij} X_i X_j + \sum_{j=1}^3 B_{jj} X_j^2$$

Trong đó:

Y_k : Biến phụ thuộc ($k = 1 - 3$)

$X_{i,j}$: Nhân tố mã hóa của biến độc lập ảnh hưởng đến Y_k

B_0 : Hệ số hồi qui bậc 0

B_j : Hệ số hồi qui bậc 1 mô tả ảnh hưởng của biến X_j đến Y_k

B_{ij} : Hệ số ảnh hưởng đồng thời của biến X_i và X_j đến Y_k

B_{jj} : Hệ số hồi qui bậc hai mô tả ảnh hưởng của biến X_j^2 đến Y_k

Kiểm định sự có nghĩa của hệ số hồi quy và kiểm định sự tương thích của mô hình. Chế độ tối ưu được xác định bằng phương pháp tối ưu hóa đa mục tiêu - phương pháp hàm mong đợi. Tính toán và xử lý kết quả bằng phần mềm máy tính Design - Expert 8.0.

2.4. HÓA CHẤT VÀ CÁC THIẾT BỊ THÍ NGHIỆM CHỦ YẾU ĐÃ SỬ DỤNG

2.4.1. Hóa chất

Các loại hóa chất tinh khiết: Folin-Ciocalteu, FeSO_4 , acid ascorbic ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), acid gallic ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$), vanillin ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$), Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , CH_3COOK , Glucose, Sucrose, Fructose, ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-acid), Quercetin, Potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), Resorcinol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$), Thiure ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$), do Merck

- Đức hoặc Sigma - Đức hoặc Mỹ cung cấp. Các loại hoá chất chuẩn: albumin, hemoglobin, tyrosine, sephadex G-75 do Merck (Đức) cung cấp.

2.4.2. Các thiết bị chủ yếu đã sử dụng trong luận án

Sử dụng các thiết bị hiện có tại phòng thí nghiệm - Trung tâm Thực hành Thí nghiệm - Trường Đại học Nha Trang và phòng thí nghiệm - Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. HCM: Cân điện tử Satorius (Đức) loại 2200g và 220g độ chính xác 10^{-6} (g), Máy ly tâm lạnh: Rotina (CHLB Đức), Máy ly tâm lạnh tốc độ cao HERMLE Z36HK (Đức), Máy so màu: Spectronic + 20D (Mỹ), Cecil 1011 (Anh) và UV-VIS DR6000 - Hach (Mỹ), Máy quang phổ hấp thụ nguyên tử ASS (HTNT) Jarrell - Ash Model AA-IEWT (Nhật Bản), Máy đo pH: pHM 83 Autocal pH meter (Đan Mạch), Bể ổn nhiệt MEMMERT WNB14/22 (Đức), Hệ thống phân tích hàm lượng nitơ/protein theo phương pháp Dumas (Đức), Nồi thủy phân dung tích 30 lít (Việt Nam), hệ thống sấy phun MOBILE MINOR (Đan Mạch).

2.5. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU

Xử lý số liệu nghiên cứu theo phương pháp thống kê sinh học. Mỗi thí nghiệm đều tiến hành 3 lần, mỗi lần 3 mẫu và kết quả là trung bình cộng của các lần thí nghiệm. Số liệu được xử lý và trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ SD. Thiết kế thí nghiệm tối ưu quá trình thủy phân sụn cá mập bằng phần mềm JMP 10. Mô hình Box – Behnken dùng trong tối ưu hóa nhằm thu nhận dịch thủy phân có hiệu suất thu chondroitin sulfate cao. So sánh sự khác biệt giữa các biến được xử lý bằng phần mềm Minitab 18.0. Phân tích ANOVA để đánh giá sự khác nhau của giá trị ở mức có ý nghĩa ($p < 0,05$).

CHƯƠNG III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. NGHIÊN CỨU THỦY PHÂN SỤN CÁ MẬP (*C. DUSSUMIERI*) BẰNG ENZYME PROTEASE

3.1.1. Phân tích thành phần cơ bản của sụn cá mập trắng

Tiến hành lấy mẫu hỗn hợp sụn cá mập cá mập trắng để phân tích một số chỉ tiêu hóa học tại Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc gia. Kết quả được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả phân tích một số chỉ tiêu hóa học cơ bản của sụn cá mập trắng

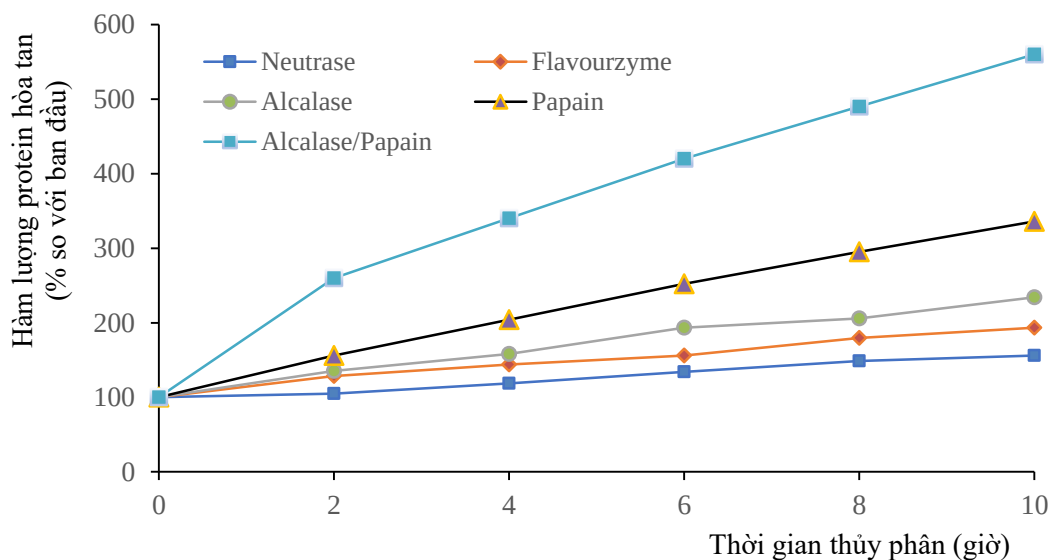
STT	Chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả
1	Hàm lượng nitơ axit amin	g/kg	20,13
2	Hàm lượng nitơ tổng số	g/100g	2,64
3	Hàm lượng protein thô	g/100g	16,50
4	Hàm lượng canxi	%	4,15
5	Hàm lượng đường tổng số	mg/kg	583,33
6	Hàm lượng tro tổng số	g/100g	4,22
7	Độ ẩm	%	80,71
8	Hàm lượng chondroitin sulphate	mg/g	41,77

Từ kết quả phân tích ở bảng 3.1 cho thấy hỗn hợp sụn cá mập trắng có hàm lượng chondroitin sulfate khá cao tới 41,77mg/g. Do vậy, sụn cá mập trắng rất thích hợp làm nguyên liệu cho quá trình thủy phân để thu dịch thủy phân chứa chondroitin sulfate với hàm lượng cao.

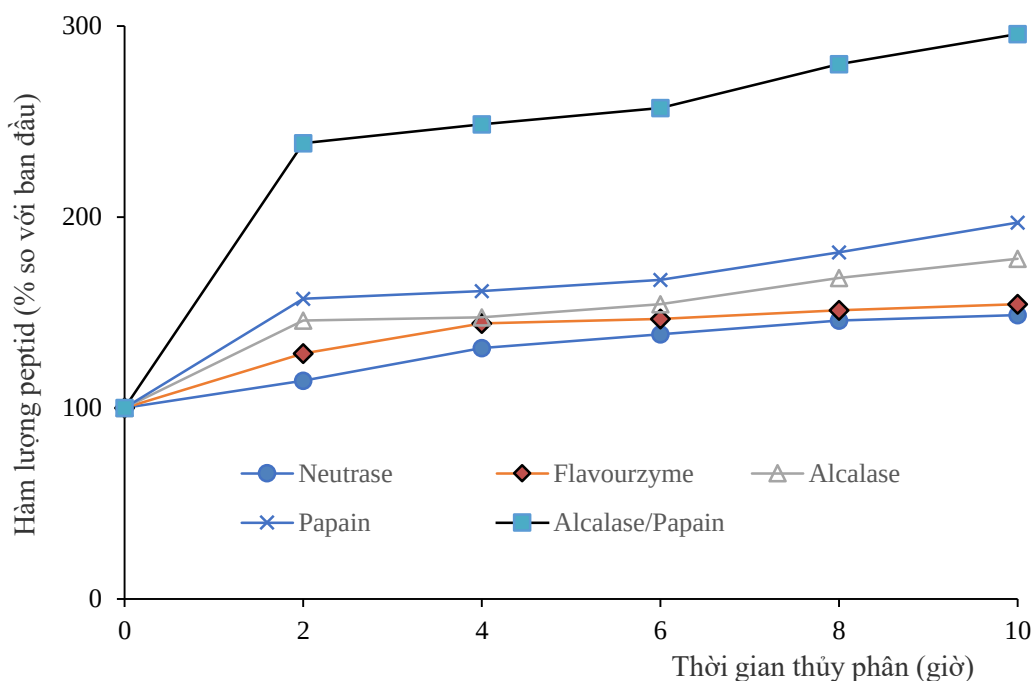
3.1.2. Xác định loại enzyme protease thích hợp cho quá trình thủy phân

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân hỗn hợp sụn cá mập (*C. dussumieri*) 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 2kg hỗn hợp sụn cá mập, tỷ lệ enzyme sử dụng là 0,2% và lượng nước bổ sung là 2 lít, pH thủy phân là pH tự nhiên của hỗn

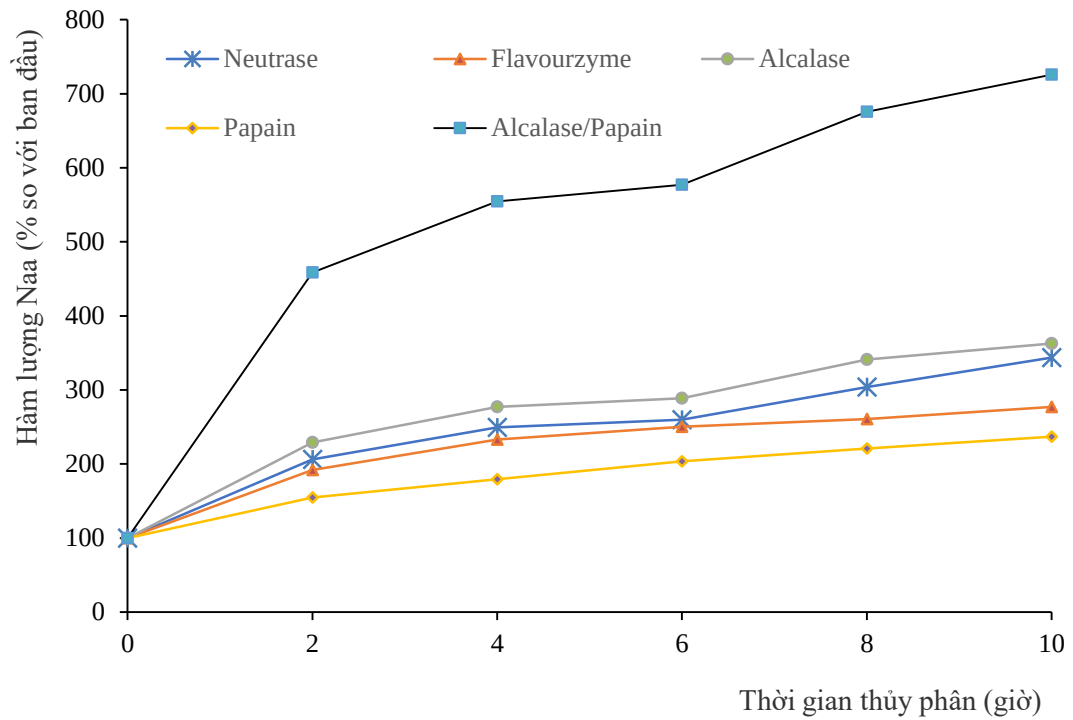
hợp sụn cá mập (pH 6,8) và nhiệt độ thủy phân 50°C. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ, tiến hành lấy mẫu dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng protein hòa tan, hàm lượng peptid, hàm lượng N_{aa} , hàm lượng chondroitin sulfate và hàm lượng N_{NH_3} . Kết quả đánh giá được thể hiện trên các hình 3.1 ÷ 3.5.



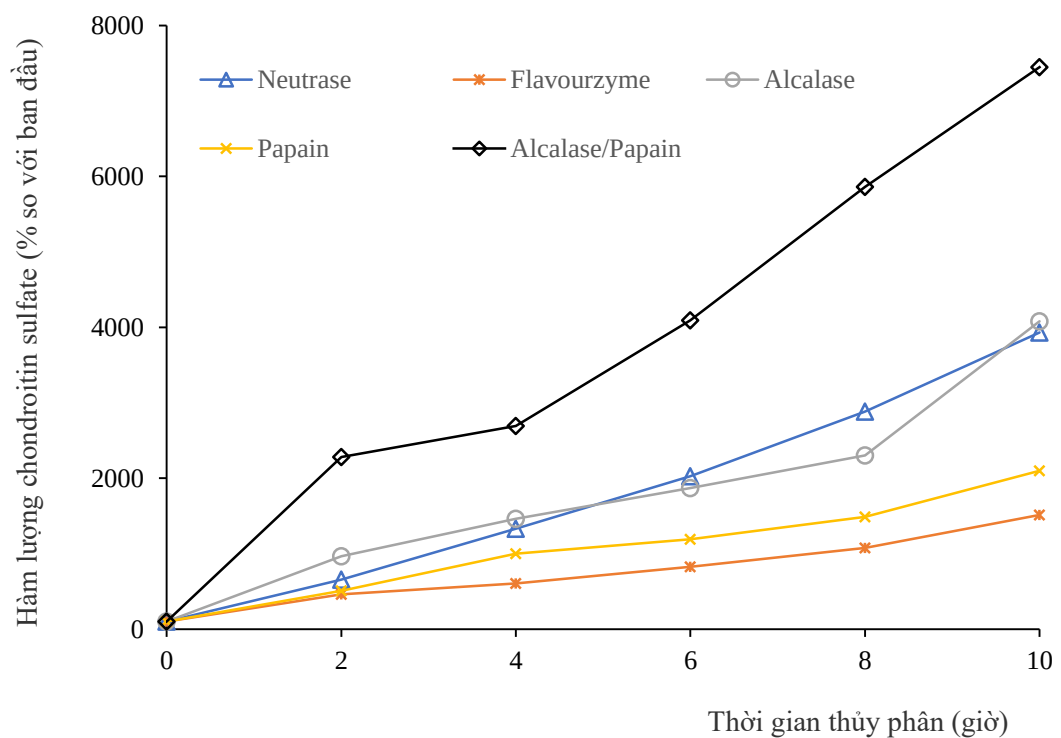
Hình 3.1. Sự thay đổi của hàm lượng protein theo thời gian thủy phân và loại enzyme protease



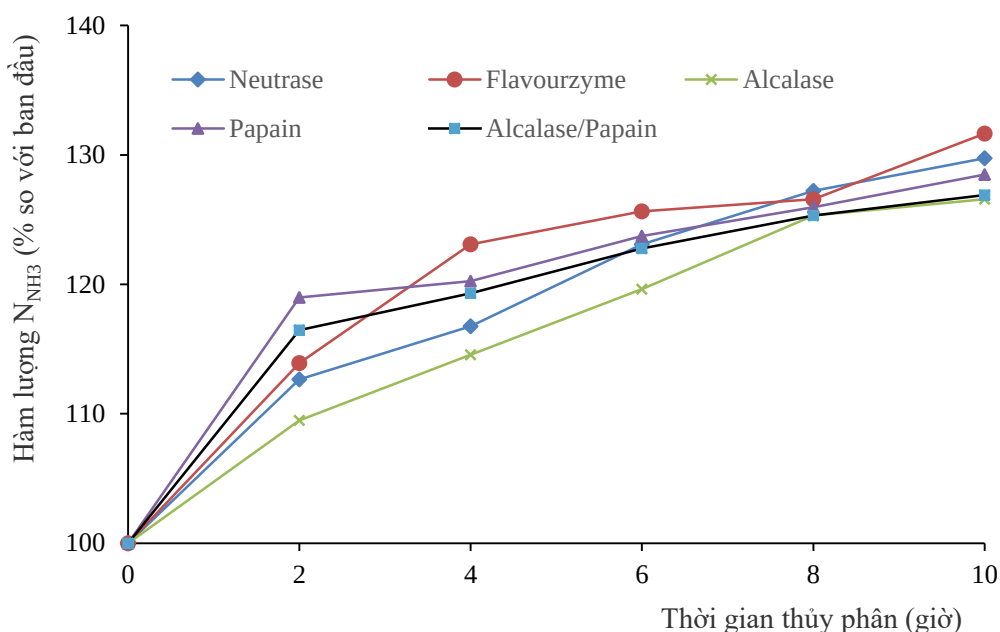
Hình 3.2. Sự thay đổi của hàm lượng peptid theo thời gian thủy phân và loại enzyme protease



Hình 3.3. Sự thay đổi của hàm lượng Naa theo thời gian thủy phân và loại enzyme protease



Hình 3.4. Sự thay đổi của hàm lượng chondroitin sulfate theo thời gian thủy phân và loại enzyme protease



Hình 3.5. Sự thay đổi của hàm lượng N_{NH_3} theo thời gian thủy phân và loại enzyme protease

Từ các kết quả phân tích trình bày ở các hình 3.1 ÷ 3.4 cho thấy:

*** Về hàm lượng protein**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.1 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 enzyme protease sử dụng trong thí nghiệm. Trong đó, hàm lượng protein hòa tan của mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain có mức độ tăng nhanh theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn so với các mẫu thủy phân khác. Cụ thể, ở giai đoạn sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng protein của mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain cao gấp 2,6 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,67 lần, 1,92 lần, 2,02 lần và 2,19 lần so với hàm lượng protein hòa tan tạo thành ở mẫu thủy phân bằng enzyme papain, alcalase, flavourzyme và neutrase. Ở thời điểm sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng protein của mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain cao gấp tới 5,6 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,67 lần, 2,39 lần, 2,89 lần và 3,58 lần so với hàm lượng protein hòa tan tạo thành ở mẫu thủy phân bằng enzyme papain, alcalase, flavourzyme và neutrase. Kết quả này cho thấy hỗn hợp enzyme alcalase - papain có khả năng thủy phân hỗn hợp sụn cá mập mạnh mẽ hơn so với các enzyme papain, alcalase, flavourzyme

và neutrase. Kết quả còn cho thấy papain và alcalase khi hoạt động một mình cũng có khả năng thủy phân hỗn hợp sụn cá mập tốt hơn các enzyme flavourzyme và neutrase.

Kết quả này có thể lý giải: cấu trúc mô sụn nói chung và sụn cá mập nói riêng, bên ngoài được bao bằng các protein mô liên kết, không tan như elastin và bên trong là các protein không tan chứa các acid amin mạch bên có cực và kỵ nước [23]. Theo Lê Ngọc Tú, elastin là protein chỉ bị thủy phân bởi papain [4, 6, 7]. 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 [13, 23, 31]. Do vậy, hàm lượng protein hòa tan trong nước sẽ tăng theo thời gian tác động của enzyme protease vào khối mô động vật [4÷6, 11÷13, 16, 17, 23, 18, 30, 31]. 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 enzyme alcalase - papain để thủy phân sụn cá mập 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 enzyme protease khác đã sử dụng.

*** Về hàm lượng peptid**

Kết quả phân tích ở hình 3.2 cho thấy cũng 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 enzyme protease sử dụng. Trong đó, hàm lượng peptid của mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain tăng nhanh theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn so với các mẫu thủy phân khác. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng peptid của mẫu thủy phân sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain cao gấp 2,39 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,52 lần, 1,64 lần, 1,86 lần và 2,09 lần so với hàm lượng peptid tạo thành ở mẫu thủy phân bằng enzyme papain, alcalase, flavourzyme và neutrase. Tương tự như vậy, sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng peptid của mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain cao gấp tới 2,96 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,5 lần, 1,66 lần, 1,93 lần và 1,99 lần so với hàm lượng peptid tạo

thành ở mẫu thủy phân sụn cá mập bằng enzyme papain, alcalase, flavourzyme và neutrase. Mặt khác, kết quả ở trên còn cho thấy papain và alcalase có khả năng thủy phân protein sụn cá mập tốt hơn các enzyme flavourzyme và neutrase. Từ các phân tích ở trên cũng cho thấy hỗn hợp enzyme alcalase - papain có khả năng thủy phân protein của sụn cá mập mạnh mẽ hơn so với các enzyme papain, alcalase, flavourzyme và neutrase khi sử dụng một mình.

Kết quả nghiên cứu của luận án 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 enzyme alcalase - bromelin cho rằng sử dụng hỗn hợp enzyme protease alcalase - bromelin để thủy phân protein moi biển sẽ cho hiệu quả thủy phân tốt hơn sử dụng một enzyme protease đơn và quá trình thủy phân phụ thuộc vào tỷ lệ phối trộn giữa các enzyme thành phần [32].

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 enzyme alcalase - papain để thủy phân sụn cá mập sẽ tạo ra thành hàm lượng peptid trong dung dịch tăng mạnh theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn các enzyme protease khác đã sử dụng.

*** Về hàm lượng Naa**

Kết quả phân tích ở hình 3.3 cho thấy 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 enzyme protease sử dụng. Hàm lượng acid amin thể hiện qua chỉ số hàm lượng Naa của mẫu thủy phân bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain tăng nhanh theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn nhiều so với các mẫu thủy phân sụn cá mập bằng các enzyme protease khác. Sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng Naa của mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain cao gấp tới 7,26 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 2,0 lần, 2,11 lần, 2,61 lần và 3,06 lần so với hàm lượng Naa tạo thành ở mẫu thủy phân sụn cá mập bằng enzyme papain, alcalase, flavourzyme và neutrase. Kết quả này cũng cho thấy hỗn hợp enzyme alcalase - papain có khả năng thủy phân protein của sụn cá mập thành acid amin mạnh mẽ hơn so với các enzyme papain, alcalase, flavourzyme và neutrase. Kết quả cũng cho thấy papain và alcalase cũng có khả năng

thủy phân protein của sụn cá mập thành acid amin tốt hơn các enzyme flavourzyme và neutrase.

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

*** Về hàm lượng chondroitin sulfate**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.4 cho thấy 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 enzyme protease. Trong đó, hàm lượng chondroitin sulfate của mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain tạo thành tăng nhanh theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn so với các mẫu thủy phân bằng các enzyme protease khác. Cụ thể, sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng chondroitin sulfate của mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain cao gấp tới 74,45 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,83 lần, 1,89 lần, 3,55 lần và 4,92 lần so với hàm lượng chondroitin sulphate tạo thành ở mẫu thủy phân sụn cá mập bằng enzyme papain, alcalase, flavourzyme và neutrase. Kết quả này một lần nữa cho thấy hỗn hợp enzyme alcalase - papain có khả năng thủy phân sụn cá mập giải phóng chondroitin sulfate mạnh mẽ hơn so với các enzyme papain, alcalase, flavourzyme và neutrase.

Kết quả này có thể được lý giải: trong cấu trúc của mô sụn chondroitin sulphate thường gắn kết với protein bằng liên kết o-glycosid tạo thành một proteoglycan (PG) (glucoprotein) [23, 81, 84] nằm phía trong của mô sụn. Dưới tác động của enzyme protease, cấu trúc mô sụn bị phá vỡ giải phóng ra chondroitin sulfate hòa tan trong nước. Do vậy, hàm lượng chondroitin sulphate tạo thành ở mẫu thủy phân sụn cá mập bằng enzyme tăng theo thời gian thủy phân.

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

*** Về hàm lượng N_{NH_3}**

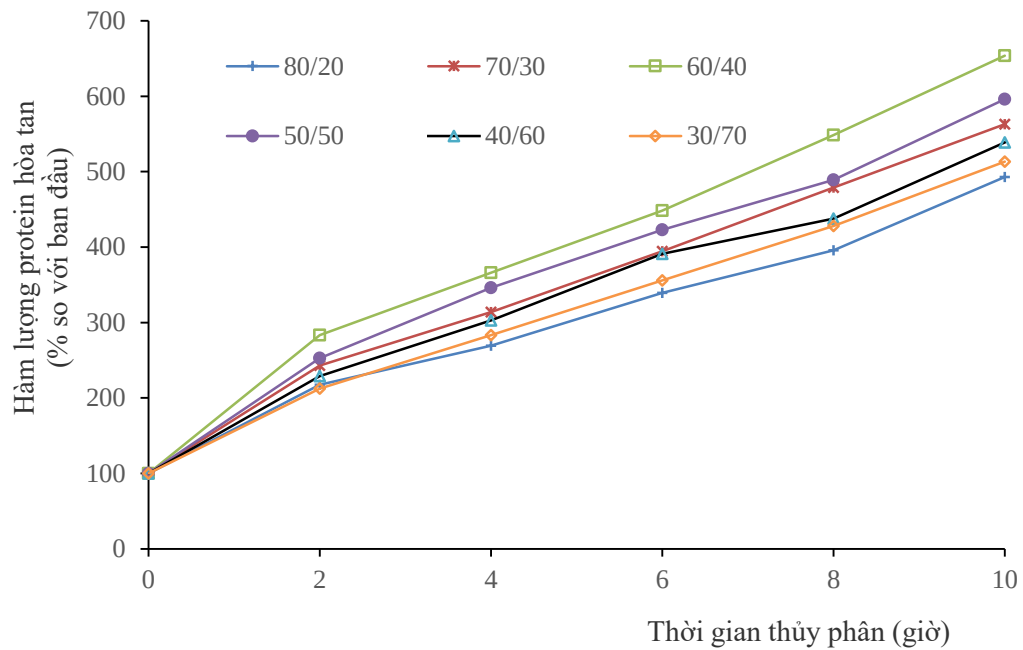
Từ kết quả phân tích ở hình 3.5 cho thấy hàm lượng N_{NH_3} tạo thành trong các mẫu

thủy phân theo thời gian đều tăng nhưng mức độ tăng chậm và khác nhau không nhiều. Cụ thể, sau 10 giờ thủy phân, các mẫu thủy phân sụn cá mập bằng enzyme: neutrase, alcalase, flavourzyme, papain và hỗn hợp enzyme alcalase - papain có hàm lượng N_{NH_3} cao tương ứng so với ban đầu là 1,3 lần, 1,27 lần, 1,32 lần, 1,29 lần và 1,27 lần so với hàm lượng N_{NH_3} ban đầu. Kết quả này cho thấy các mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain, enzyme alcalase và papain có hàm lượng N_{NH_3} tạo thành thấp hơn chút ít so với các mẫu thủy phân khác nhưng mức độ chênh lệch không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê. Kết quả nghiên cứu của luận án khi so sánh với các nghiên cứu thủy phân thịt cá bằng enzyme protease của Vũ Ngọc Bội, Lê Minh Châu, Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Thị Dự, Trần Cảnh Đình, Đặng Văn Hợp và một số tác giả khác [2, 5, 11÷13, 23, 24, 30÷32, 46] 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.

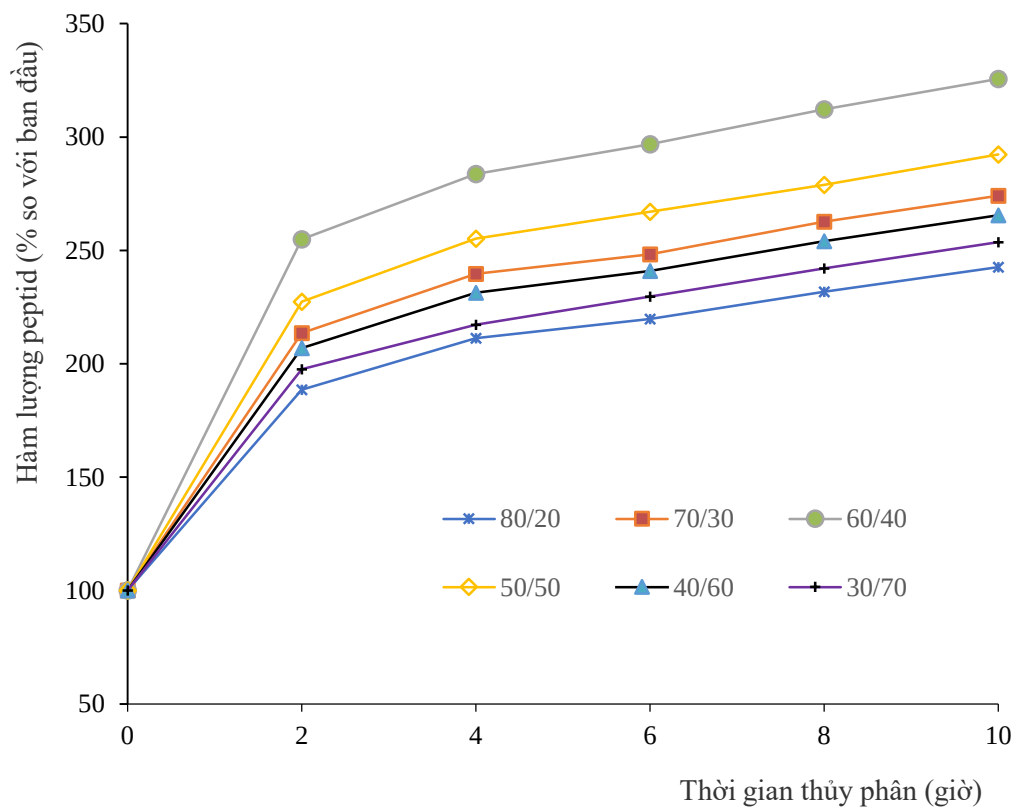
*Từ tất cả những phân tích ở trên cho thấy sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain trong quá trình thủy phân sụn cá mập sẽ tạo thành dịch thủy phân có hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa và chondroitin sulfate tạo thành theo thời gian thủy phân cao hơn các enzyme protease khác đã sử dụng như neutrase, alcalase, flavourzyme, papain. Mặt khác, hàm lượng N_{NH_3} tạo thành trong các mẫu thủy phân sụn cá mập 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 mập (*C. dussumieri*) để thu dịch thủy phân chứa chondroitin sulfate và các thành phần khác.*

3.1.3. Xác định tỷ lệ enzyme alcalase/papain thích hợp cho quá trình thủy phân

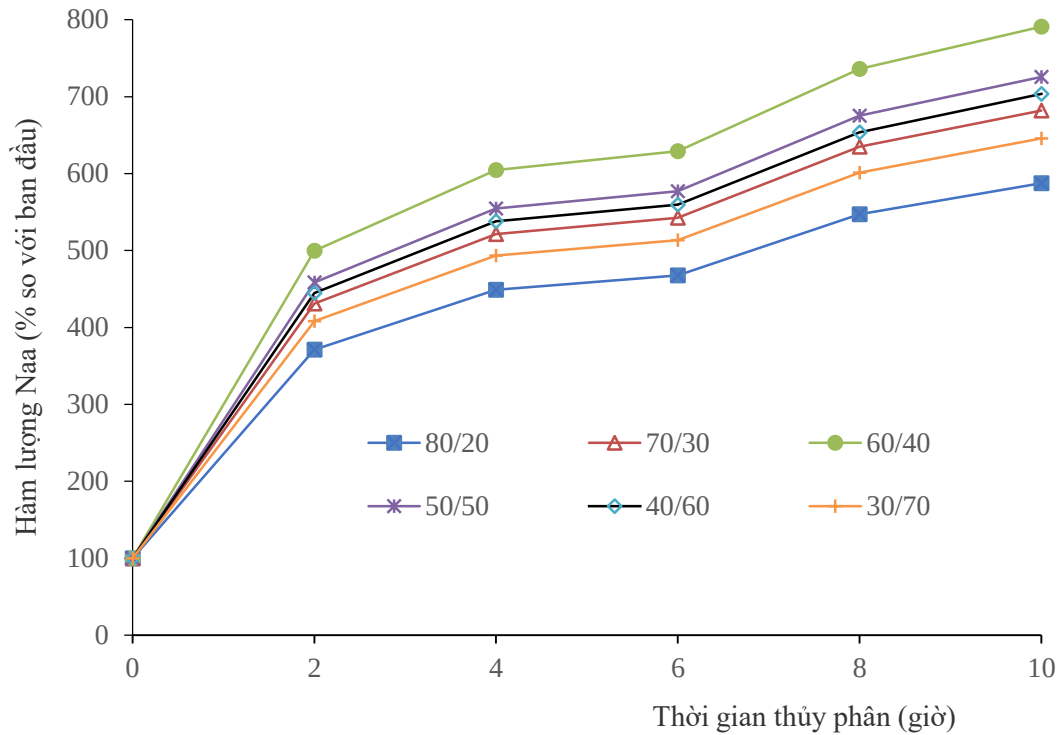
Tiến hành 6 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập (*C. dussumieri*) bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain với tỷ lệ alcalase/papain tính theo tỷ lệ trên 1 đơn vị hoạt độ khác nhau: mẫu 1: thủy phân bằng hỗn hợp enzyme alcalase và papain theo tỷ lệ 80/20, mẫu 2: 70/30, mẫu 3: 60/40, mẫu 4: 50/50, mẫu 5: 40/60 và mẫu 6: 30/70. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ, lấy mẫu dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng protein hòa tan, hàm lượng peptid, hàm lượng N_{aa} , hàm lượng chondroitin sulfate và hàm lượng N_{NH_3} tạo thành. Kết quả trình bày ở các hình 3.6 ÷ 3.10.



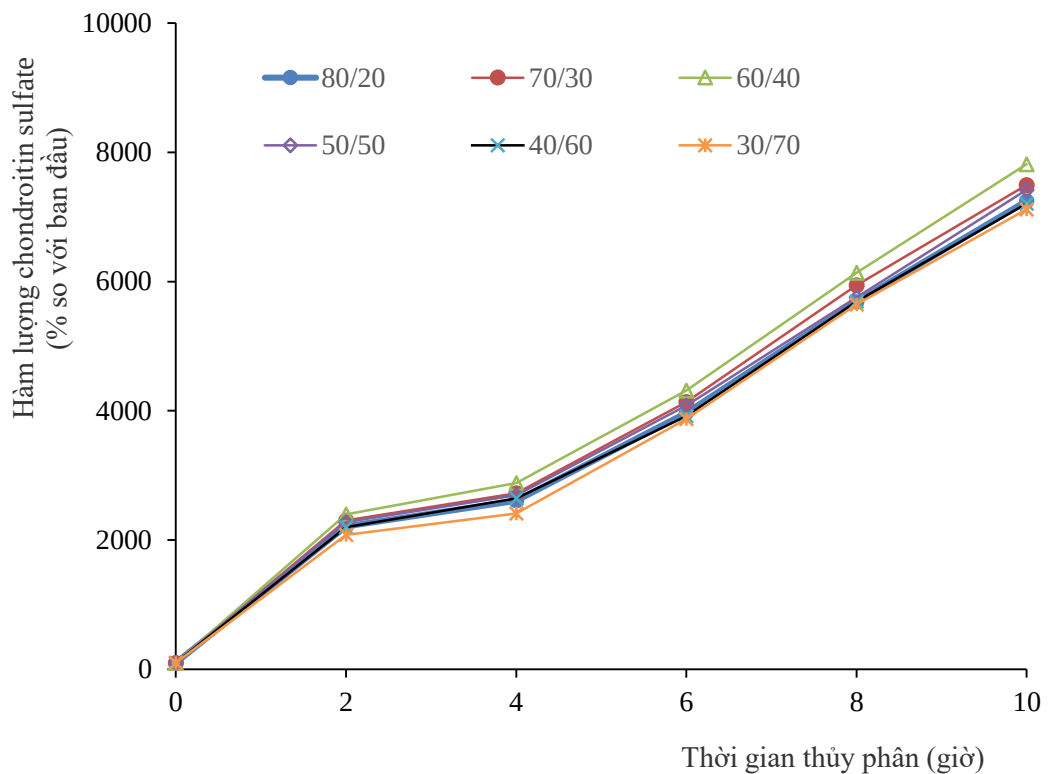
Hình 3.6. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và tỷ lệ alcalase/papain đến hàm lượng protein tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập



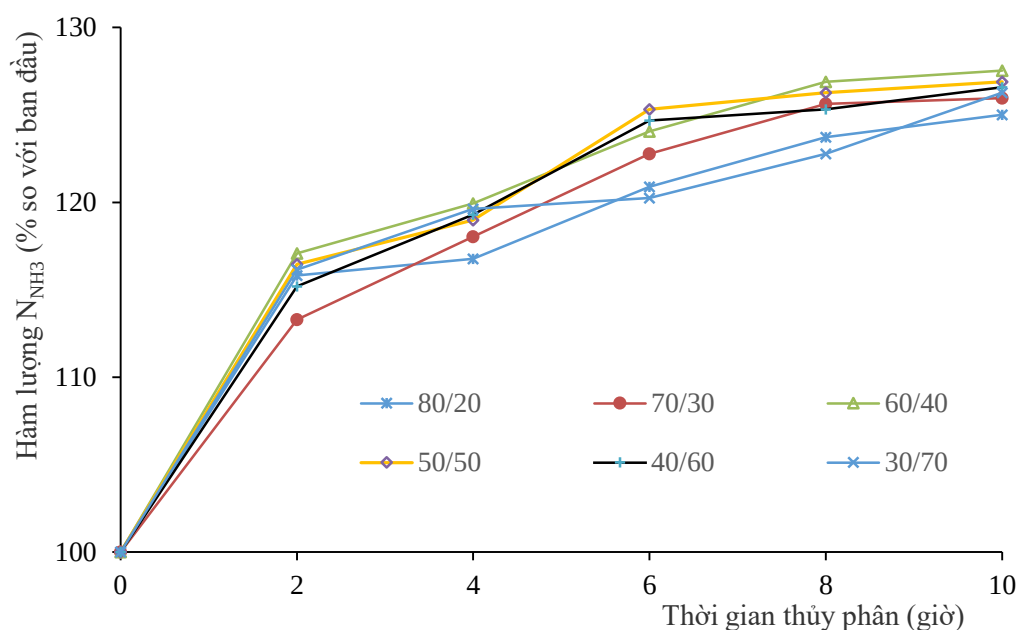
Hình 3.7. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và tỷ lệ alcalase/papain đến hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.8. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và tỷ lệ alcalase/papain đến hàm lượng Naa tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.9. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và tỷ lệ alcalase/papain đến hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.10. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân và tỷ lệ alcalase/papain đến hàm lượng N_{NH_3} tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập

Từ các kết quả trình bày ở các hình 3.6 ÷ 3.10 cho thấy:

*** Về hàm lượng protein**

Kết quả phân tích ở hình 3.6 cho thấy 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 nhưng mức độ tăng khác nhau tùy thuộc vào tỷ lệ alcalase/papain sử dụng trong thí nghiệm. Cụ thể, ở giai đoạn sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với tỷ lệ alcalase/papain bằng 60/40 cao gấp 2,84 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,30 lần, 1,16 lần, 1,12 lần, 1,24 lần và 1,33 lần so với hàm lượng protein hòa tan tạo thành ở mẫu thủy phân bằng enzyme hỗn hợp alcalase - papain theo tỷ lệ 80/20, 70/30, 50/50, 40/60 và 30/70. Ở thời điểm sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain với tỷ lệ alcalase/papain bằng 60/40 cao gấp 6,54 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,33 lần, 1,16 lần, 1,10 lần, 1,21 lần và 1,27 lần so với hàm lượng protein hòa tan tạo thành ở mẫu thủy phân bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain với tỷ lệ alcalase/papain tương ứng là 80/20, 70/30, 50/50, 40/60 và 30/70. Kết quả này cho thấy hỗn hợp enzyme alcalase -

papain với tỷ lệ alcalase/papain bằng 60/40 có khả năng thủy phân sụn cá mập tốt hơn so với thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain với tỷ lệ alcalase/papain lớn hơn hoặc nhỏ hơn 60/40.

Từ những phân tích ở trên cho thấy sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain với tỷ lệ alcalase/papain bằng 60/40 để thủy phân sụn cá mập sẽ tạo ra dịch thủy phân có chứa hàm lượng protein hòa tan cao hơn khi sử dụng hỗn hợp alcalase - papain với tỷ lệ alcalase/papain khác với tỷ lệ 60/40.

*** Về hàm lượng peptid**

Kết quả phân tích ở hình 3.7 cho thấy cũng giống như quy luật về sự thay đổi của hàm lượng protein, 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 tỷ lệ giữa enzyme alcalase/papain. Trong đó, hàm lượng peptid của mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain với tỷ lệ enzyme alcalase/papain là 60/40 luôn tăng nhanh hơn theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn so với các mẫu thủy phân khác. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng peptid của mẫu thủy phân sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase-papain theo tỷ lệ 60/40 cao gấp 2,55 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,35 lần, 1,19 lần, 1,12 lần, 1,23 lần và 1,28 lần so với hàm lượng peptid tạo thành ở mẫu thủy phân hỗn hợp sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với tỷ lệ tương ứng là 80/20, 50/50, 40/60 và 30/70. Tương tự như vậy, sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng peptid của mẫu thủy phân sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase-papain theo tỷ lệ 60/40 cao gấp 3,26 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,34 lần, 1,19 lần, 1,11 lần, 1,23 lần và 1,28 lần so với hàm lượng peptid tạo thành ở mẫu thủy phân hỗn hợp sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với tỷ lệ tương ứng là 80/20, 50/50, 40/60 và 30/70.

Từ các phân tích ở trên cho thấy khi xét theo khía cạnh hàm lượng peptid tạo thành cao trong dịch thủy phân thì sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain với tỷ lệ alcalase so với papain là 60/40 là phù hợp.

*** Về hàm lượng Naa**

Kết quả phân tích ở hình 3.8 cho thấy gần 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 tùy thuộc vào tỷ lệ giữa enzyme alcalase/papain. Trong đó, hàm lượng Naa của mẫu thủy phân hỗn hợp sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain với tỷ lệ enzyme alcalase/papain là 60/40 luôn tăng nhanh hơn theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn so với các mẫu thủy phân khác. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng Naa của mẫu thủy phân sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase-papain theo tỷ lệ 60/40 cao gấp 4,30 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,35 lần, 1,15 lần, 1,09 lần, 1,12 lần và 1,23 lần so với hàm lượng Naa tạo thành ở mẫu thủy phân hỗn hợp sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với tỷ lệ tương ứng là 80/20, 50/50, 40/60 và 30/70. Tương tự như vậy, sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng Naa của mẫu thủy phân sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase-papain theo tỷ lệ 60/40 cao gấp 7,91 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,34 lần, 1,16 lần, 1,09 lần, 1,12 lần và 1,22 lần so với hàm lượng Naa tạo thành ở mẫu thủy phân hỗn hợp sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với tỷ lệ tương ứng là 80/20, 50/50, 40/60 và 30/70.

Từ những phân tích ở trên cho thấy sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain để thủy phân sụn cá mập với tỷ lệ alcalase/papain là 60/40 thì hàm lượng nitơ acid amin tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập cao nhất so với các mẫu thí nghiệm khác.

*** Về hàm lượng chondroitin sulfate**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.9 cho thấy theo thời gian thủy phân hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân đều tăng và tùy thuộc vào tỷ lệ giữa enzyme alcalase/papain. Trong đó, hàm lượng chondroitin sulfate của mẫu thủy phân hỗn hợp sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain với tỷ lệ enzyme alcalase/papain là 60/40 cũng luôn tăng nhanh hơn theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn so với các mẫu thủy phân khác. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng chondroitin sulfate của mẫu thủy phân sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase-papain theo tỷ lệ 60/40 cao gấp 23,94 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,08 lần, 1,04 lần, 1,05 lần, 1,09 lần và 1,15 lần so với hàm lượng chondroitin sulphate tạo thành ở mẫu thủy phân hỗn hợp sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với tỷ lệ tương ứng là 80/20, 50/50, 40/60 và 30/70. Tương tự như vậy, sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng chondroitin sulfate của mẫu thủy phân sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase-papain theo tỷ lệ 60/40 cao gấp

78,17 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 1,07 lần, 1,04 lần, 1,05 lần, 1,08 lần và 1,10 lần so với hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành ở mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với tỷ lệ alcalase/papain tương ứng là 80/20, 50/50, 40/60 và 30/70.

Từ những phân tích ở trên cho thấy khi xét theo khía cạnh hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành cao thì sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain để thủy phân sụn cá mập với tỷ lệ alcalase/papain 60/40 là phù hợp.

*** Về hàm lượng N_{NH_3}**

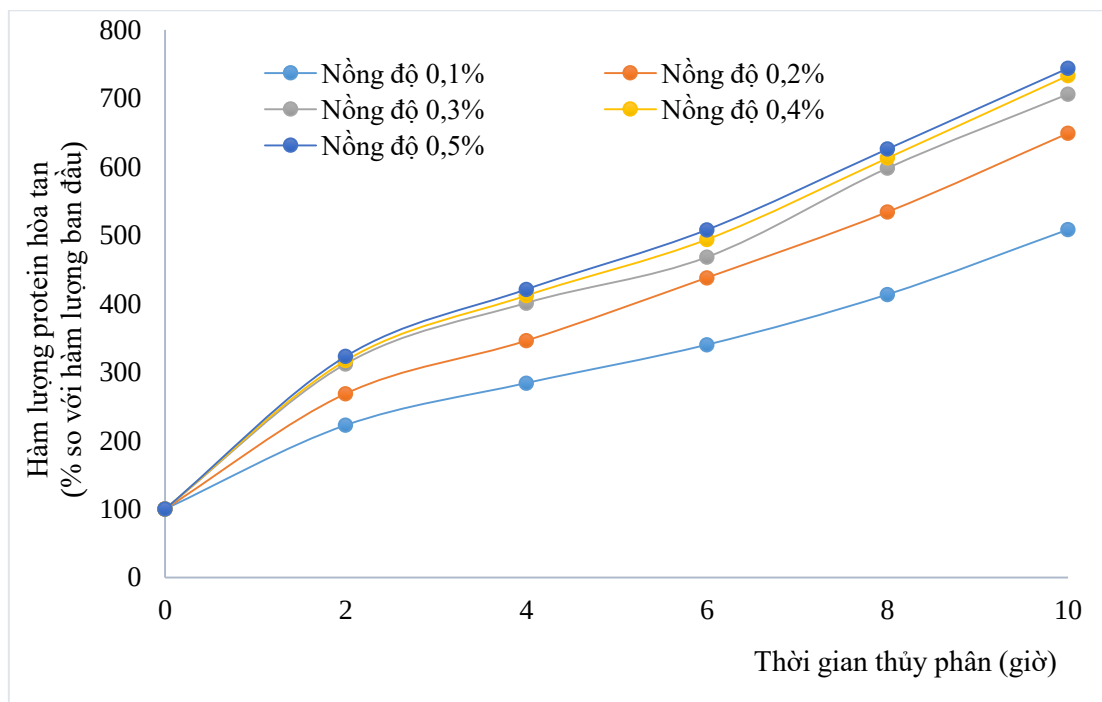
Kết quả phân tích ở hình 3.10 cho thấy hàm lượng N_{NH_3} tạo thành trong các mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain đều tăng theo thời gian thủy phân nhưng mức độ tăng chậm và khác nhau không đáng kể. Cụ thể, sau 10 giờ thủy phân, các mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain với tỷ lệ alcalase/papain khác nhau: 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, 40/60 và 30/70 đều có hàm lượng N_{NH_3} tăng trong khoảng từ $1,25 \div 1,26$ 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.

*Từ tất cả những phân tích ở trên cho thấy sử dụng tổ hợp enzyme alcalase - papain thủy phân sụn cá mập với tỷ lệ alcalase/papain sử dụng là 60/40 thì dịch thủy phân có hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa và chondroitin sulfate tạo thành theo thời gian thủy phân cao hơn khi sử dụng tổ hợp enzyme alcalase - papain với tỷ lệ alcalase/papain khác 60/40 để thủy phân sụn cá mập. Mặt khác, hàm lượng N_{NH_3} tạo thành trong các mẫu thủy phân sụn cá mập lại thấp. Kết quả này cho phép lựa chọn tỷ lệ giữa enzyme alcalase và papain trong hỗn hợp alcalase - papain là 60/40 dùng cho quá trình thủy phân sụn cá mập (*C. dussumieri*) với mục tiêu thu dịch thủy phân có hàm lượng chondroitin sulfate cao.*

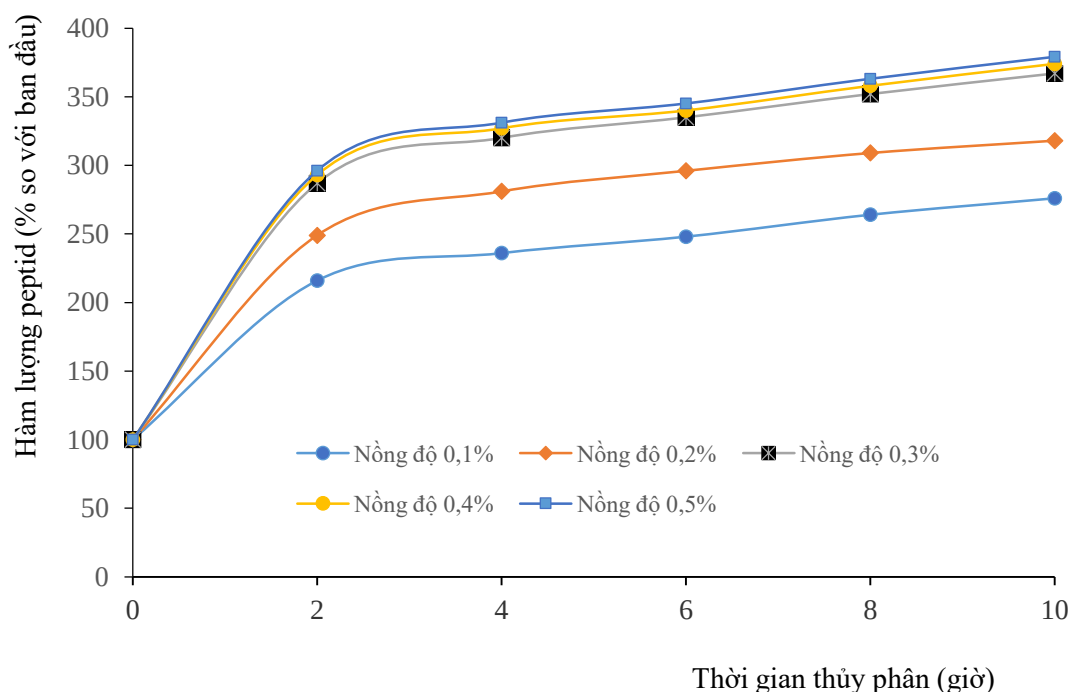
3.1.4. Xác định nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain thích hợp cho quá trình thủy phân

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain (tỷ lệ alcalase/papain trong hỗn hợp là 60/40) với nồng độ hỗn hợp sử dụng khác nhau trong khoảng $0,1\% \div 0,5\%$, bước nhảy là $0,1\%$. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2giờ, 4giờ, 6giờ, 8giờ và 10 giờ, tiến hành lấy mẫu dịch thủy phân để đánh giá hàm

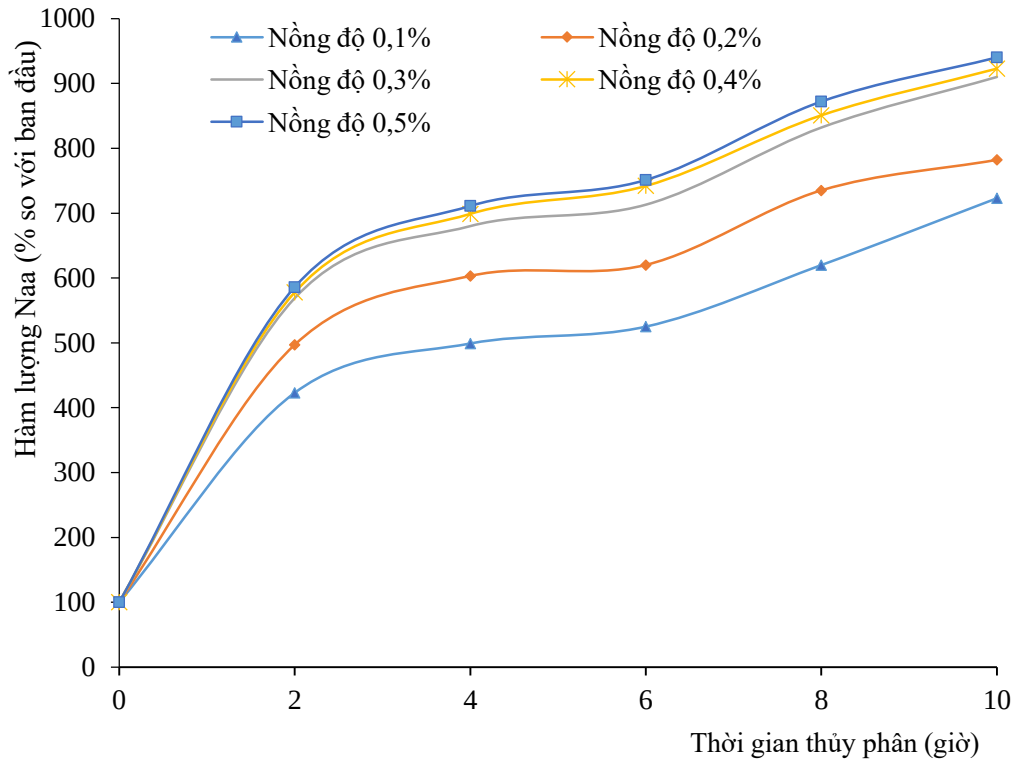
lượng protein hòa tan, hàm lượng peptid, hàm lượng N_{aa} , hàm lượng chondroitin sulfate và hàm lượng N_{NH_3} . Kết quả đánh giá được thể hiện trên các hình 3.11 ÷ 3.15.



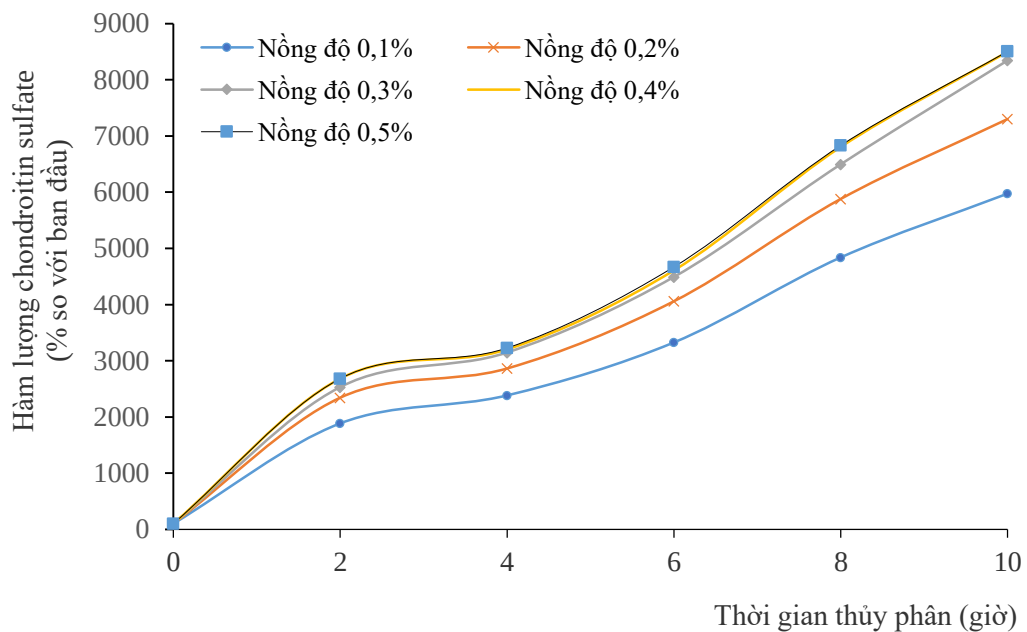
Hình 3.11. Ảnh hưởng của nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain và thời gian thủy phân đến hàm lượng protein tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập



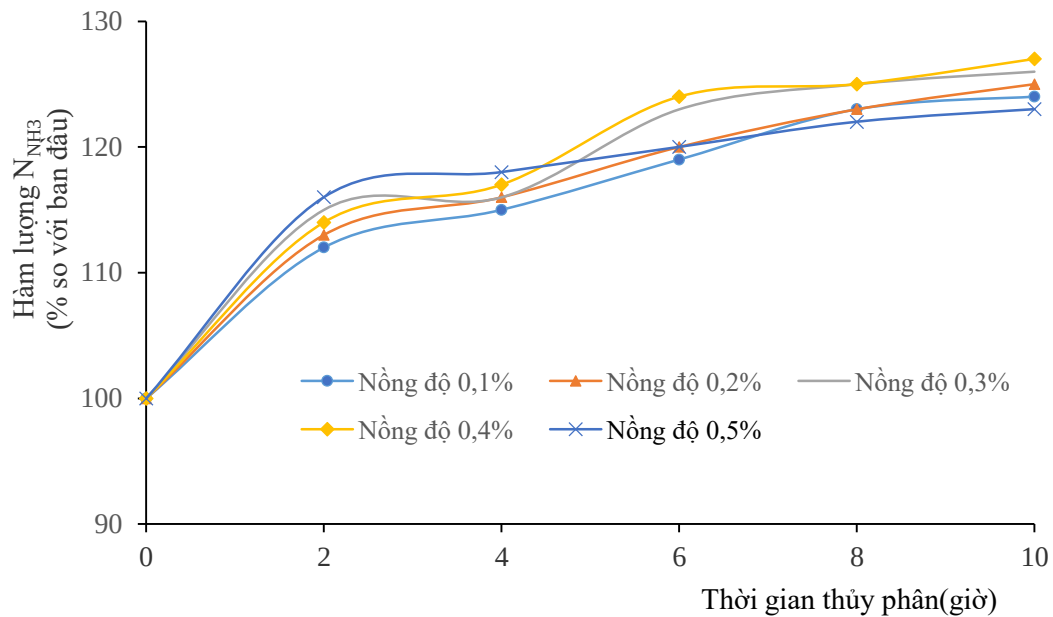
Hình 3.12. Ảnh hưởng của nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain và thời gian thủy phân đến hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân



Hình 3.13. 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



Hình 3.14. Ảnh hưởng của nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain và thời gian thủy phân đến hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.15. 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 sụn cá mập

Từ kết quả đánh giá trình bày ở các hình 3.11 ÷ 3.15 cho thấy:

*** Về hàm lượng protein**

Kết quả phân tích ở hình 3.11 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 của hỗn hợp enzyme protease và tăng theo thời gian thủy phân nhưng mức độ tăng khác nhau tùy thuộc vào nồng độ hỗn hợp enzyme sử dụng. 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% tương ứng là 4,45 mg/g, 5,37mg/g, 6,24mg/g, 6,34mg/g và 6,46mg/g, 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 bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở nồng độ sử dụng 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% và 0,5% là 10,16mg/g, 12,98mg/g, 14,12mg/g, 14,67mg/g và 14,89mg/g, 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 luận án cũng có những nét tương đồng với một số nghiên cứu đã công bố trước đây. Cụ thể, năm 2003 và 2004, Vũ Ngọc Bội khi nghiên cứu về quá trình thủy phân protein cá mòi và cá cơm bằng enzyme protease *B. subtilis* S5 cho thấy nồng độ enzyme protease *B. subtilis* S5 thích hợp cho quá trình thủy phân cơ thịt cá mòi trong sản xuất bột đậm thủy phân là 0,3% và nồng độ enzyme protease từ *B. subtilis* S5 thích hợp cho quá trình thủy phân cá cơm trong sản xuất nước mắm là 0,2% [30, 31]. Năm 2010, Trần Cảnh Đình tiến hành thủy phân hỗn hợp sụn cá mập khô bằng enzyme protease cho rằng nồng độ enzyme protease thích hợp là 0,2% [23].

Từ những phân tích ở trên cho thấy sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở nồng độ 0,3% là phù hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập.

*** Về hàm lượng peptid**

Kết quả phân tích ở hình 3.12 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, 0,01748mg/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 0,019327mg/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 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 và 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 về hàm lượng peptid cho thấy nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập là 0,3%.

*** Về hàm lượng Naa**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.13 cũng cho thấy hàm lượng Naa 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 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 5,21243mg/g, 6,12456mg/g, 7,00673mg/g, 7,11911mg/g và 7,21414mg/g, 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 8,28690mg/g, 9,62671mg/g, 11,08536mg/g, 11,36078mg/g và 11,56613mg/g, 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 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 cho thấy khi xét theo hàm lượng nitor acid amin tạo thành cao thì sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain để thủy phân sụn cá mập ở nồng độ enzyme 0,3% là phù hợp.

*** Về hàm lượng chondroitin sulfate**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.14 cho thấy hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp alcalase-papain cũng 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 sulfate 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 sulfate 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 sulfate 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 sulfate 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 sulfate 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 và 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 sulfate 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 hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành cao thì nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập là 0,3%.

*** Về hàm lượng N_{NH_3}**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.15 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.

Từ tất cả những phân tích ở trên cho thấy để tạo thành dịch thủy phân có hàm lượng protein hòa tan, hàm lượng peptid, hàm lượng nitor acid amin, hàm lượng chondroitin sulfate cao thì nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập là 0,3%.

3.1.5. Xác định tỷ lệ nước bổ sung thích hợp cho quá trình thủy phân

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm như bố trí thí nghiệm ở trên, mỗi mẫu thủy phân đều sử dụng 2kg sụn cá mập, tỷ lệ alcalase/papain trong hỗn hợp 60/40, nồng độ hỗn hợp enzyme sử dụng là 0.3%, thủy phân ở pH tự nhiên (pH 6,8), nhiệt độ thủy phân 50°C nhưng tỉ lệ sụn/nước bổ sung khác nhau lần lượt mẫu 1: 70/30, mẫu 2: 60/40, mẫu 3: 50/50, mẫu 4: 40/60 và mẫu 5: 30/70. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2giờ, 4giờ, 6giờ, 8giờ và 10 giờ, tiến hành lấy mẫu dịch thủy phân để đánh giá hàm lượng protein hòa tan, hàm lượng peptid, hàm lượng N_{aa} , hàm lượng chondroitin sulfate và hàm lượng N_{NH_3} . Kết quả đánh giá được thể hiện trên các hình 3.16 ÷ 3.20.

Từ kết quả phân tích trình bày ở các hình 3.16 ÷ 3.20 cho thấy:

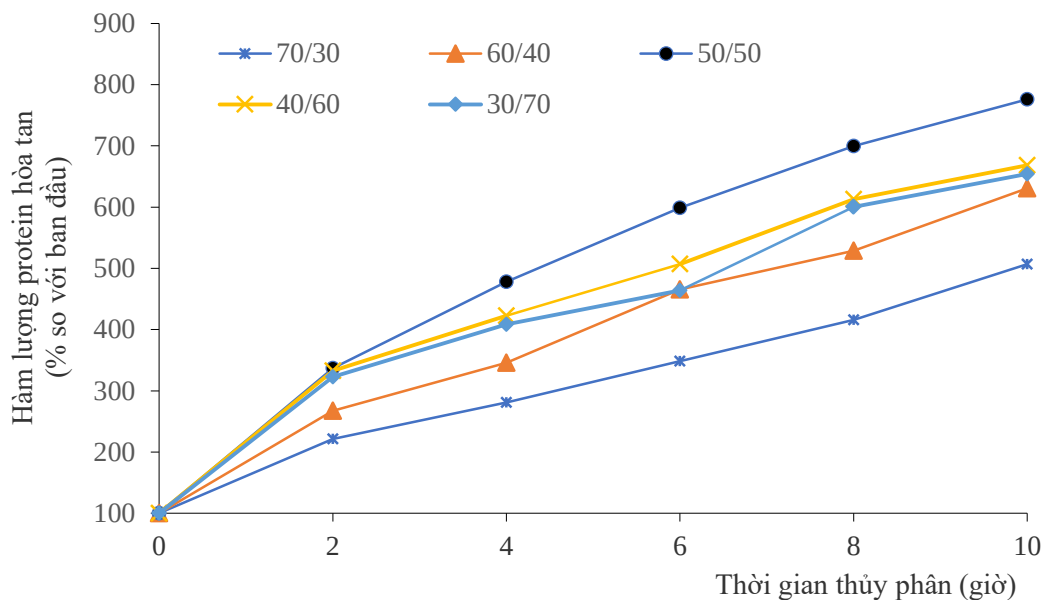
*** Về hàm lượng protein hòa tan**

Kết quả phân tích ở hình 3.16 cho thấy theo thời gian thủy phân hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân sụn cá mập với tỉ lệ sụn/nước là: 70/30, 60/40, 50/50, 40/60 và 30/70 đều tăng theo sự tăng tỉ lệ sụn/nước và thời gian thủy phân

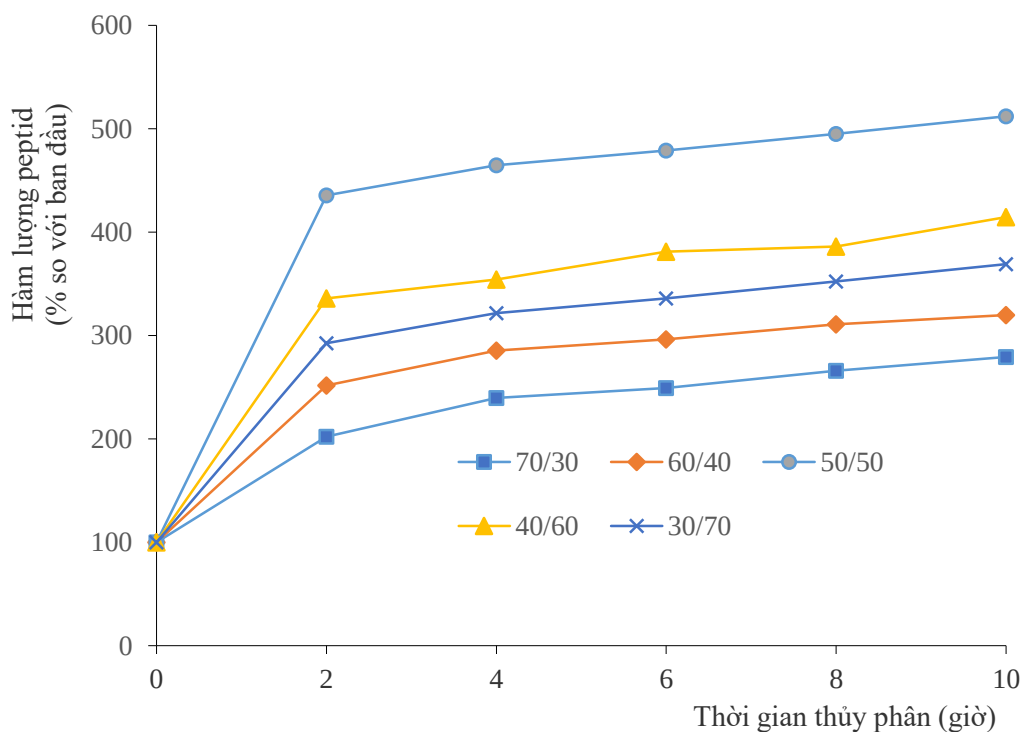
nhưng mức độ tăng khác nhau tùy thuộc vào tỉ lệ sụn/nước. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với tỉ lệ sụn/nước là: 70/30, 60/40, 50/50, 40/60 và 30/70 là 4,43mg/g; 5,35mg/g; 6,74mg/g; 6,66mg/g và 6,46mg/g, cao gấp 2,21 lần; 2,81 lần; 3,49 lần; 3,07 lần; và 3,06 lần; so với ban đầu. Sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với tỉ lệ sụn/nước: 70/30, 60/40, 50/50, 40/60 và 30/70 là 10,14mg/g; 12,61mg/g; 15,52mg/g; 13,37mg/g và 13,08mg/g, cao gấp tương ứng so với ban đầu là 3,23 lần; 4,08 lần; 4,68 lần; 5,01 lần và 6,51 lần. Kết quả phân tích cũng cho thấy hàm lượng protein của mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp alcalase-papain với tỉ lệ sụn/nước là 50/50 cao hơn tất cả mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập khác. Kết quả này có thể giải thích: về mặt lý thuyết về động học quá trình thủy phân bằng enzyme protease thì nước cũng là một thành phần tham gia phản ứng thủy phân. Khi tỉ lệ sụn/nước là 30/70 thì tỷ lệ nước bổ sung quá cao dẫn tới cơ chất bị pha loãng do vậy khả năng tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất bị hạn chế nên quá trình thủy phân diễn ra chậm hơn nên hàm lượng protein hòa tan thu được thấp. Khi tỉ lệ sụn/nước cao 70/30 tức tỷ lệ nước bổ sung quá ít tức nồng độ cơ chất quá cao không thích hợp cho phản ứng nên tốc độ phản ứng thủy phân giảm. Khi tỉ lệ sụn/nước là 50/50 tức đủ nước cho quá trình thủy phân nên khả năng tiếp xúc của enzyme và cơ chất tốt nhất nên quá trình thủy phân diễn ra mạnh mẽ nhất. Vì vậy, hàm lượng protein tạo thành trong quá trình thủy phân cao nhất.

Kết quả nghiên cứu của luận án cũng phù hợp với quy luật thủy phân của các nghiên cứu về quá trình thủy phân cơ thịt cá mối trong quá trình sản xuất bột đậm thủy phân và quá trình thủy phân cơ thịt cá cơm bằng protease *B. subtilis* S5 của Vũ Ngọc Bội công bố năm 2004 [30, 31] hay kết quả thủy phân protein moi biển bằng hỗn hợp enzyme protease alcalase và bromelain của Vũ Ngọc Bội, Lê Hương Thủy và cộng sự công bố năm 2015 [32], hay kết quả nghiên cứu thủy phân cơ thịt các trích của Lê Minh Châu, Vũ Ngọc Bội và cộng sự công bố 2017 [5], hay nghiên cứu thủy phân sụn cá mập khô bằng enzyme protease của Trần Cảnh Đình và cộng sự công bố năm 2010 [23], Năm 2000, Đặng Văn Hợp công bố nghiên cứu thủy phân cá cơm trong sản xuất nước mắm bằng enzyme protease *A. oryzae* A4 cũng có quy luật tương tự [2] hoặc nghiên cứu thủy phân protein cá bằng proteinase đầu tôm của Nguyễn Văn Lệ công bố năm 1996 [13].

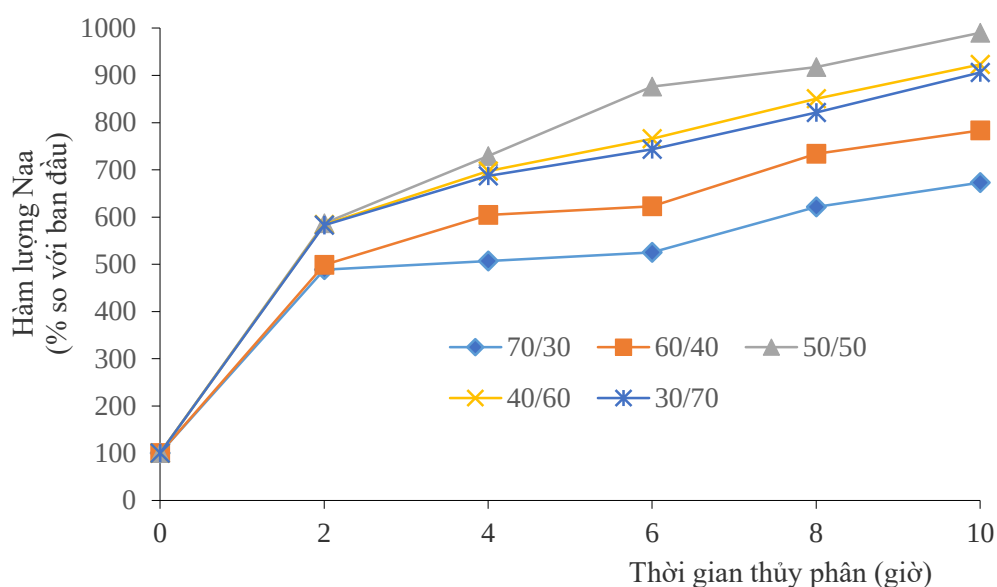
Từ những phân tích ở trên cho thấy sử dụng tỉ lệ sụn/nước bằng 50/50 thì quá trình thủy phân sụn cá mập sẽ tạo ra dịch thủy phân có chứa hàm lượng protein hòa tan cao hơn các mẫu thủy phân với tỉ lệ sụn/nước khác với tỉ lệ 50/50.



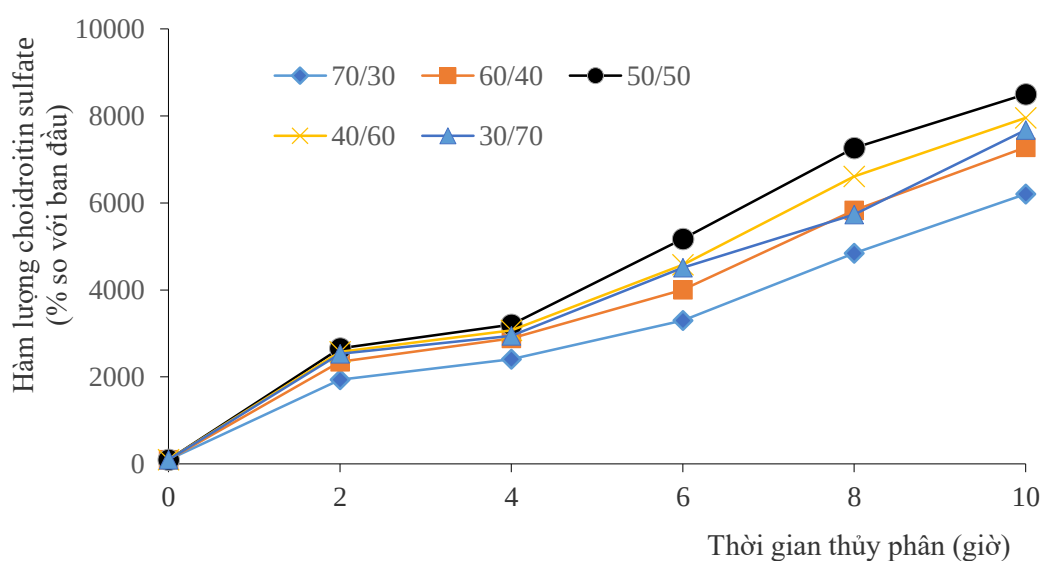
Hình 3.16. Ảnh hưởng của tỉ lệ sụn/nước bổ sung và thời gian thủy phân đến hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.17. Ảnh hưởng của tỉ lệ sụn/nước bổ sung và thời gian thủy phân đến hàm lượng peptid của dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.18. Ảnh hưởng của tỉ lệ sụn/nước bổ sung và thời gian thủy phân đến hàm lượng Naa của dịch thủy phân sụn cá mập



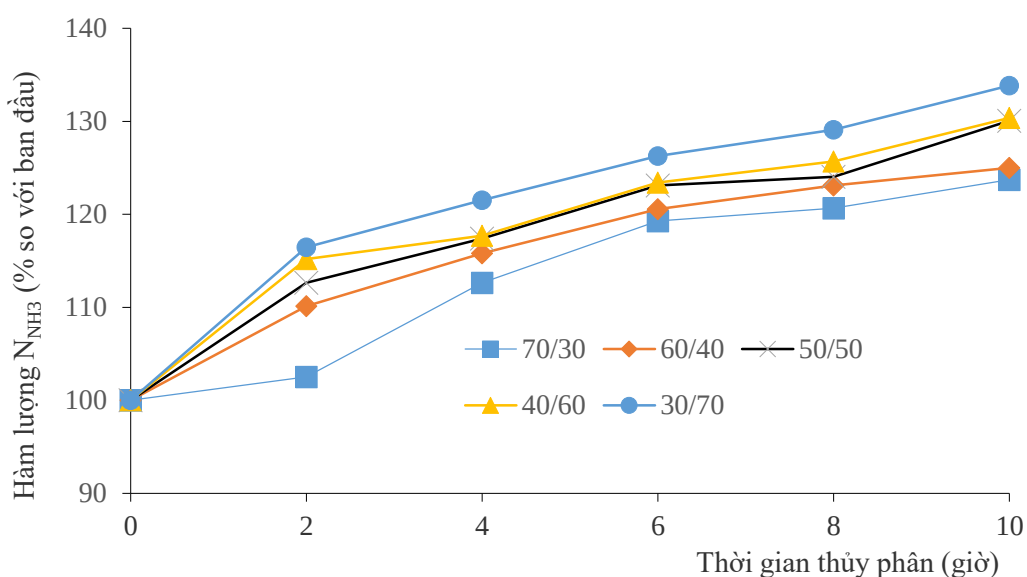
Hình 3.19. Ảnh hưởng của tỉ lệ sụn/nước bổ sung và thời gian thủy phân đến hàm lượng chondroitin sulfate của dịch thủy phân sụn cá mập

*** Về hàm lượng peptid**

Kết quả phân tích ở hình 3.17 cho thấy cũng giống như sự 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 tỷ lệ sụn/nước. Trong đó, hàm lượng peptid của mẫu thủy phân hỗn hợp sụn cá mập với tỉ lệ

sụn/nước 50/50 luôn tăng nhanh hơn theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn so với các mẫu thủy phân khác. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng peptid của mẫu thủy phân sử dụng hỗn hợp enzyme 50/50 cao gấp 4,71 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 2,02 lần, 2,52 lần, 3,36 lần và 3,49 lần so với hàm lượng peptid tạo thành ở mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với tỷ lệ sụn/nước là: 70/30, 60/40, 40/60 và 30/70. Tương tự như vậy, sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng peptid của mẫu thủy phân sử dụng hỗn hợp enzyme 50/50 cao gấp 5,12 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 2,79 lần, 3,20 lần, 4,14 lần và 3,69 lần so với hàm lượng peptid tạo thành ở mẫu thủy phân hỗn hợp sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với tỷ lệ sụn/nước là: 70/30, 60/40, 40/60 và 30/70.

Từ những phân tích ở trên cho thấy khi xét theo hàm lượng peptid tạo thành cao trong dịch thủy phân thì sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain với tỷ lệ sụn nước 50/50 là phù hợp.



Hình 3.20. Ảnh hưởng của tỉ lệ sụn/nước bổ sung và thời gian thủy phân đến hàm lượng N_{NH_3} của dịch thủy phân sụn cá mập

*** Về hàm lượng Naa**

Kết quả phân tích ở hình 3.18 cho thấy gần giống như quy luật về sự thay đổi của hàm lượng protein và peptid trong quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain, theo thời gian thủy phân hàm lượng Naa tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân đều tăng và tùy thuộc vào tỷ lệ giữa sụn/nước. Trong đó, hàm lượng Naa của

mẫu thủy phân hỗn hợp sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain với tỷ lệ sụn/nước là 50/50 luôn tăng nhanh hơn theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn so với các mẫu thủy phân khác. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng Naa của mẫu thủy phân sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase-papain theo tỷ lệ sụn/nước là 50/50 cao gấp 5,87 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 4,89 lần, 4,99 lần, 1,09 lần, 5,84 lần và 5,83 lần so với hàm lượng Naa tạo thành ở mẫu thủy phân hỗn hợp sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với tỷ lệ tương ứng là 70/30, 60/40, 40/60 và 30/70. Tương tự như vậy, sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng Naa của mẫu thủy phân sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase-papain theo tỷ lệ sụn/nước là 50/50 cao gấp 9,89 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 6,73 lần, 7,84 lần, 9,23 lần và 9,06 lần so với hàm lượng Naa tạo thành ở mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với tỷ lệ sụn/nước tương ứng là 70/30, 60/40, 40/60 và 30/70.

Từ những phân tích ở trên cho thấy khi xét theo hàm lượng nitơ acid amin tạo thành cao thì sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain để thủy phân sụn cá mập với tỷ lệ sụn/nước là 50/50 thì hàm lượng nitơ acid amin tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập cao hơn các mẫu thí nghiệm khác trong cùng điều kiện thủy phân.

*** Về hàm lượng chondroitin sulfate**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.20 cho thấy theo thời gian thủy phân hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong tất cả các mẫu thủy phân đều tăng và tùy thuộc vào tỷ lệ giữa sụn/nước bổ sung. Trong đó, hàm lượng chondroitin sulfate của mẫu thủy phân hỗn hợp sụn cá mập với tỉ lệ sụn/ nước bổ sung là 50/50 cũng luôn tăng nhanh hơn theo thời gian thủy phân và tăng cao hơn so với các mẫu thủy phân khác. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng chondroitin sulfate của mẫu thủy phân sử dụng tỷ lệ sụn/nước bổ sung 50/50 cao gấp 26,59 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 19,39 lần, 23,46 lần, 25,79 lần và 25,36 lần so với hàm lượng chondroitin sulphate tạo thành ở mẫu thủy phân hỗn hợp sụn cá mập với tỷ lệ sụn/nước bổ sung tương ứng là 70/30, 60/40, 40/60 và 30/70. Tương tự như vậy, sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng chondroitin sulfate của mẫu thủy phân có tỷ lệ sụn/nước bổ sung 50/50 cao gấp 84,99 lần so với ban đầu và cao gấp tương ứng 62,01 lần, 72,79 lần, 79,54 lần và 76,75 lần so với hàm lượng chondroitin sulphate tạo thành ở mẫu thủy phân hỗn hợp sụn cá mập với tỷ lệ sụn/nước bổ sung

tương ứng là 70/30, 60/40, 40/60 và 30/70.

Từ những phân tích ở trên cho thấy sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain để thủy phân sụn cá mập với tỷ lệ sụn/nước bổ sung là 50/50 thì hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập cao hơn các mẫu thí nghiệm khác trong cùng điều kiện thủy phân.

*** Về hàm lượng N_{NH_3}**

Kết quả phân tích ở hình 3.19 cho thấy hàm lượng N_{NH_3} tạo thành trong các mẫu thủy phân sụn cá mập với tỉ lệ sụn/nước khác nhau đều tăng theo thời gian thủy phân nhưng mức độ tăng chậm và khác nhau không nhiều. Cụ thể, sau 10 giờ thủy phân, các mẫu thủy phân sụn cá mập với tỉ lệ sụn/nước 70/30, 60/40, 50/50, 40/60 và 30/70 đều có hàm lượng N_{NH_3} tăng trong khoảng từ 1,24-1,34 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.

Từ tất cả các phân tích ở trên cho thấy thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain tạo thành dịch thủy phân có hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa, chondroitin sulfate cao nhưng hàm lượng N_{NH_3} tạo thành lại không cao thì tỷ lệ sụn/nước bổ sung 50/50 là thích hợp nhất và được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.6. Xác định pH thích hợp cho quá trình thủy phân

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với 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 tự nhiên (6,8), mẫu 4: pH 7,0, mẫu 5: pH 7,5 và mẫu 6: thủy phân ở pH 8.0. Các mẫu thủy phân đều sử dụng 2kg sụn cá mập, tỷ lệ alcalase/papain trong hỗn hợp 60/40, nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain với nồng độ 0.3%, tỉ lệ nước bổ sung là 50/50 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 để đánh giá hàm lượng protein hòa tan, hàm lượng peptid, hàm lượng Naa, hàm lượng chondroitin sulfate và hàm lượng N_{NH_3} . Kết quả được trình bày ở các hình 3.21 ÷ 3.25.

Từ kết quả phân tích trình bày ở các hình 3.21 ÷ 3.25 cho thấy:

*** Về hàm lượng protein hòa tan**

Kết quả phân tích ở hình 3.21 cho thấy 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 của các mẫu thủy phân cũng khác nhau. 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 pH 6,0; 6,5; 6,8; 7,0; 7,5 và 8,0 là 4,43 mg/g; 7,33mg/g; 7,42mg/g; 7,65mg/g; 6,28mg/g và 5,15mg/g, cao gấp 2,21 lần, 3,66 lần, 3,71 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; 6,8; 7,0; 7,5 và 8,0 là 10,18mg/g; 14,46mg/g; 14,56 mg/g; 14,77mg/g; 14,30mg/g và 12,38mg/g, cao gấp 5,9 lần, 7,13 lần; 7,21 lần, 7,39 lần; 7,15 lần và 6,19 lần so với ban đầu. Kết quả phân tích cũng cho thấy khi thay đổi pH thủy phân trong khoảng 6,0 ÷ 8,0 thì hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong dịch thủy phân cũng thay đổi theo sự thay đổi của pH của dịch thủy phân. Cụ thể, 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 tự nhiên và pH 7. Mặt khác, kết quả phân tích còn cho thấy hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập ở pH = 6,5, pH tự nhiên và pH = 7,0 khác nhau không đáng kể và sự khác biệt không 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 trong khoảng 6,5 đến 7,0 là tương đương nhau và giá trị pH tự nhiên của hỗn hợp sụn cá mập là 6,8 nằm trong khoảng pH từ 6,5 đến 7,0. Do vậy, khi thực hiện quá trình thủy phân ở pH tự nhiên sẽ đảm bảo cho sản phẩm đạt tiêu chuẩn thực phẩm do không sử dụng các hóa chất để điều chỉnh pH - đây chính là lợi lớn đối với quá trình sản xuất thực phẩm.

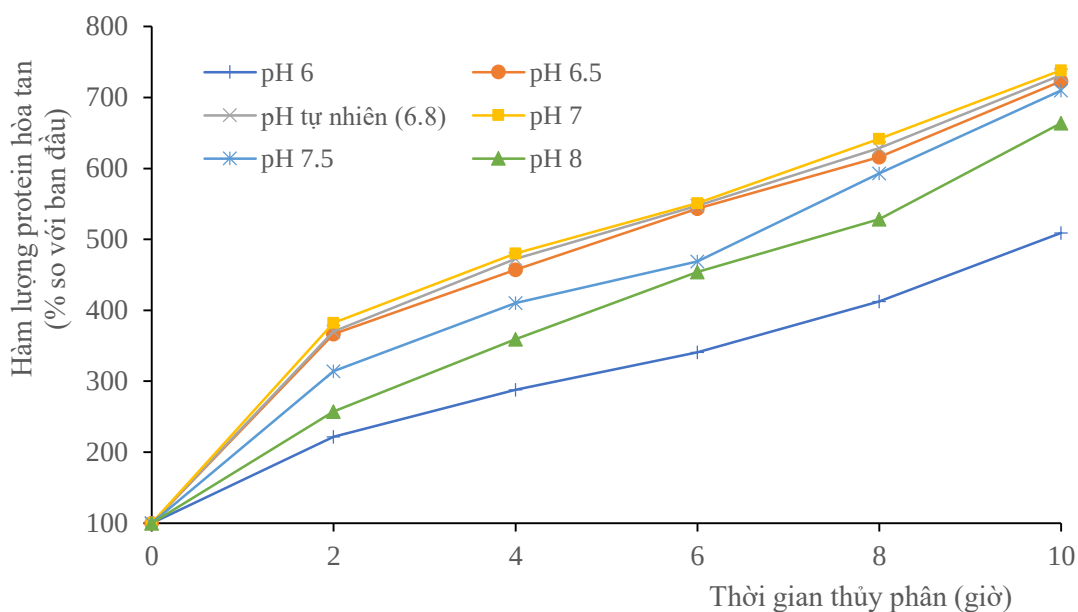
Từ những phân tích ở trên cho thấy pH tự nhiên (pH=6,8) nên được lựa chọn cho quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain.

*** Về hàm lượng peptid**

Kết quả phân tích ở hình 3.22 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 thời gian thủy phân và thay đổi theo pH của quá trình thủy phân nhưng mức độ

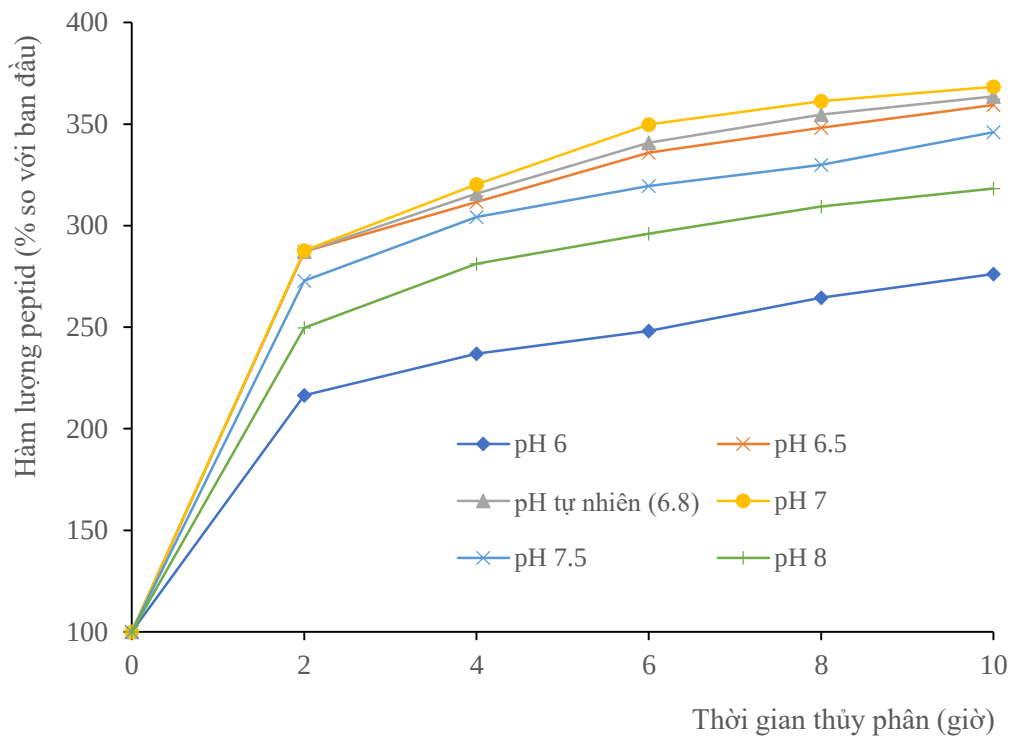
tăng khác nhau tùy thuộc vào pH thủy phân. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng peptid của dịch thủy phân sụn cá mập ở pH thủy phân 6,0; 6,5; 6,8; 7,0; 7,5 và 8,0 là 0,015146mg/ml, 0,020103mg/ml; 0,020124mg/ml, 0,020139mg/ml, 0,019106mg/ml và 0,01748mg/ml, cao gấp tương ứng 2,16 lần; 2,85 lần, 2,87 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 thủy phân 6,0; 6,5; 6,8; 7,0; 7,5 và 8,0 là 0,019327mg/ml; 0,025156mg/ml; 0,025785mg/ml; 0,025348mg/ml; 0,024218mg/ml và 0,022228mg/ml, cao gấp 2,76 lần; 3,59 lần; 3,62 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 tăng theo thời gian thủy phân và mức độ tăng thấp so với khi thủy phân ở pH 6,7; pH tự nhiên và pH 7,0. Kết quả phân tích cũng cho thấy hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân khi thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 6,5, pH tự nhiên và pH 7,0 chênh lệch không nhiều và sự chênh lệch không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cho thấy thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 6,5, pH tự nhiên và pH 7,0 thì hàm lượng peptid tạo thành theo thời gian cũng tương đương nhau.

Từ những phân tích ở trên cho thấy khi xét theo hàm lượng peptid tạo thành cao thì sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain để thủy phân sụn cá mập ở pH tự nhiên (pH=6,8) là phù hợp.

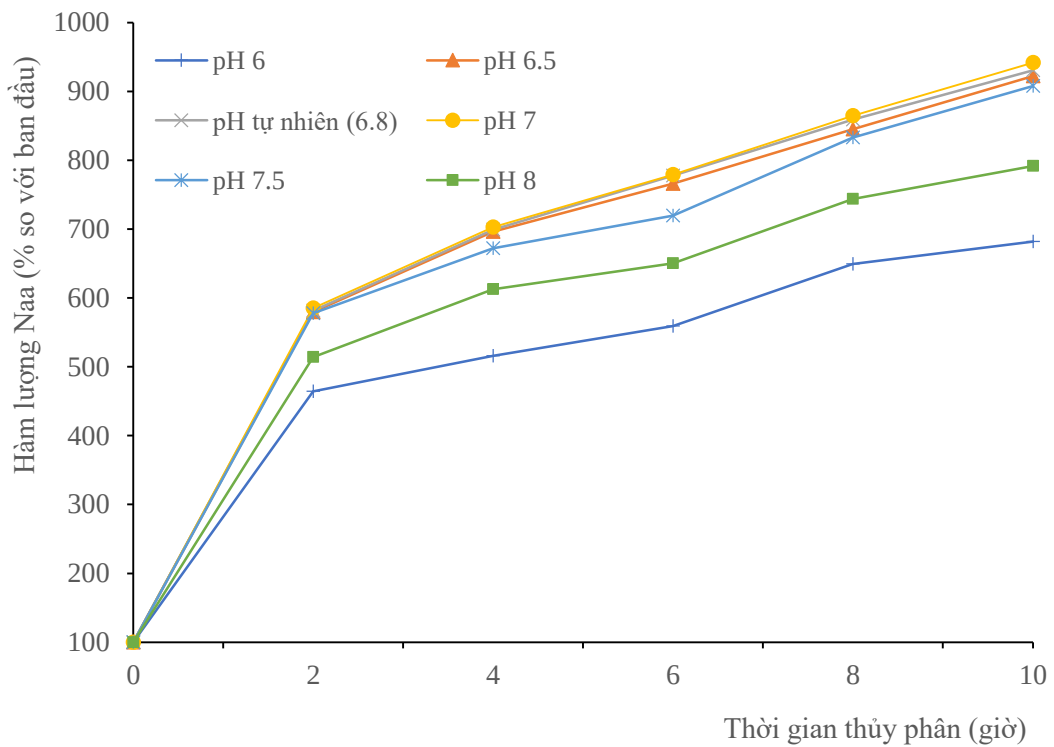


Hình 3.21. Ảnh hưởng của pH và thời gian thủy phân đến hàm lượng protein hòa tan

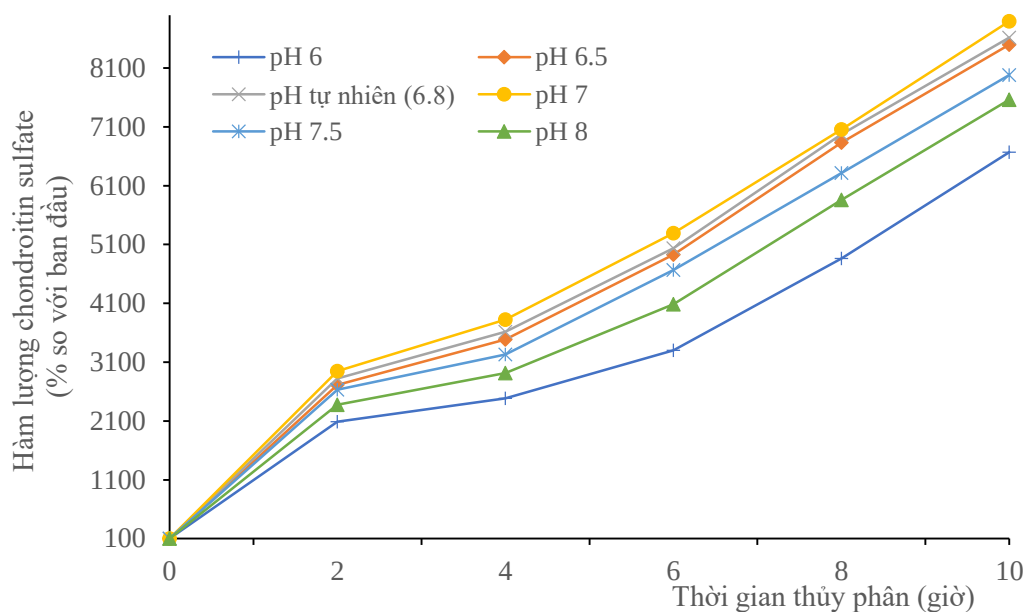
của dịch thủy phân sụn cá mập



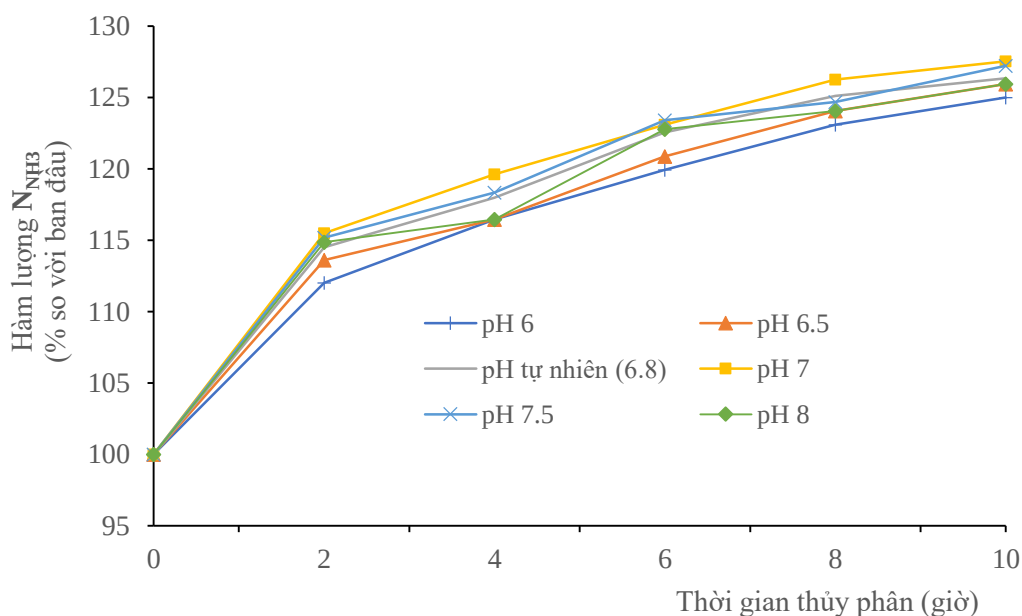
Hình 3.22. Ảnh hưởng của pH và thời gian thủy phân đến hàm lượng peptid của dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.23. Ảnh hưởng của pH và thời gian thủy phân đến hàm lượng Naa của dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.24. Ảnh hưởng của pH và thời gian thủy phân đến hàm lượng chondroitin sulfate của dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.25. Ảnh hưởng của pH và thời gian thủy phân đến hàm lượng N_{NH_3} của dịch thủy phân sụn cá mập

* Về hàm lượng Naa

Kết quả phân tích ở hình 3.23 cho thấy cũng tương tự như quy luật tạo thành protein hòa tan và peptid trong quá trình thủy phân đó là theo thời gian thủy phân hàm lượng Naa 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 mức độ tăng khác nhau tùy thuộc vào giá trị pH

thủy phân. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng Naa của dịch thủy phân sụn cá mập ở pH thủy phân 6,0; 6,5; 6,8; 7,0; 7,5 và 8,0 là 5,71233mg/g; 7,12804mg/g; 7,17604mg/g; 7,20044mg/g; 7,10862mg/g và 6,32125mg/g cao gấp tương ứng 4,64 lần; 5,79 lần; 5,81 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 thủy phân 6,0; 6,5; 6,8; 7,0; 7,5 và 8,0 là 8,38470mg/g; 11,34264mg/g; 11,42153mg/g; 11,58621mg/g; 11,16642mg/g và 9,73874mg/g cao gấp 6,82 lần; 9,22 lần; 9,31 lần; 9,42 lần; 9,08 lần và 7,92 lần so với ban đầu. Kết quả phân tích ở trên cho thấy khi thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở 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, pH tự nhiên và pH 7,0. Mặt khác, kết quả phân tích cũng cho thấy hàm lượng Naa tạo thành trong dịch thủy phân mạnh sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở pH 6,5, pH tự nhiên 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, pH tự nhiên và pH 7,0 thì hàm lượng peptid tạo thành theo thời gian tương đương nhau. Do vậy, việc lựa chọn pH nằm trong khoảng pH 6,5, pH tự nhiên và pH 7,0 để thủy phân sụn cá mập là phù hợp.

Từ phân tích ở trên cho thấy khi xét theo khía cạnh hàm lượng Naa tạo thành cao thì sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain thủy phân sụn cá mập ở pH tự nhiên (pH=6,8) là phù hợp.

*** Về hàm lượng chondroitin sulfate**

Kết quả phân tích ở hình 3.24 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 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; 6,8; 7,0; 7,5 và 8,0 là 8,12116mg/ml; 10,551430mg/ml; 10,981372mg/ml; 11,4578mg/ml; 10,23641mg/ml và 9,234mg/ml; cao gấp tương ứng 20,88 lần; 27,12 lần; 27,87 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; 6,8; 7,0; 7,5 và 8,0 là 25,94367mg/ml; 33,06316mg/ml; 33,68641mg/ml; 34,6048mg/ml; 31,04492mg/ml và 29,4270mg/ml;

cao gấp 66,69 lần; 84,99 lần; 86,97 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 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, pH tự nhiên 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, pH tự nhiên 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, pH tự nhiên 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. Do vậy, việc lựa chọn pH nằm trong khoảng pH 6,5, pH tự nhiên và pH 7,0 để thủy phân sụn cá mập là phù hợp.

Từ những phân tích ở trên cho thấy khi xét theo hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành cao trong quá trình thủy phân thì sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain để thủy phân sụn cá mập ở pH tự nhiên (pH=6,8) sẽ có ưu điểm là hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành cao.

*** Về hàm lượng N_{NH_3}**

Kết quả phân tích ở hình 3.25 cho thấy hàm lượng N_{NH_3} tạo thành trong các mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở 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 mập bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain, các mẫu thủy phân sử dụng enzyme thủy phân với pH: là 6,0; 6,5; 6,8, 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 luận án cũng có những nét tương đồng với một số nghiên cứu đã công bố trước đây. Cụ thể, năm 2000, Đặng Văn Hợp công bố nghiên cứu sử dụng enzyme protease từ *Aspergillus oryzae* A4 trong sản xuất nước mắm cũng cho rằng quá trình thủy phân cá cơm bằng enzyme protease từ *Aspergillus oryzae* A4 ở pH 6,5 là thích hợp [2]. Năm 2003, Vũ Ngọc Bội khi nghiên cứu sử dụng enzyme protease *B. subtilis* S5 để thủy phân protein cá mòi trong sản xuất bột đạm thủy phân cũng cho thấy

quá trình thủy phân thịt cá mồi ở pH tự nhiên có ưu điểm là không phải điều chỉnh pH và hàm lượng acid amin tạo thành trong quá trình thủy phân cao hơn [30]. Năm 2004, Vũ Ngọc Bội công bố nghiên cứu sử dụng enzyme protease *B. subtilis* S5 trong thủy phân cá cơm để sản xuất cho rằng sử dụng enzyme protease *B. subtilis* S5 thủy phân cá cơm ở pH tự nhiên sẽ tận dụng được protease có sẵn trong nguyên liệu nên tốc độ thủy phân nhanh hơn khi thủy phân ở pH acid hoặc pH kiềm [31]. 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 [23].

Từ tất cả những phân tích trên cho thấy sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain trong thủy phân sụn cá mập ở pH tự nhiên sẽ tạo ra dịch thủy phân có hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa, chondroitin sulfate cao hơn và hàm lượng N_{NH_3} tạo tương tự như các mẫu thủy phân khác. Do vậy, pH tự nhiên (6,8) được lựa chọn làm thông số cố định cho quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme protease alcalase - papain.

3.1.7. Xác định nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân

Tiến hành 7 mẫu thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain như bố trí thí nghiệm ở trên nồng độ hỗn hợp enzyme sử dụng là 0,3%, tỉ lệ sụn/nước bổ sung là 50/50, quá trình thủy phân tiến hành pH tự nhiên (6,8) nhưng nhiệt độ thủy phân khác nhau: 35⁰C, 40⁰C, 45⁰C, 50⁰C, 55⁰C, 60⁰C và 65⁰C. Sau các khoảng thời gian: 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ, lấy mẫu đánh giá hàm lượng protein hòa tan, hàm lượng peptid, hàm lượng Naa, hàm lượng chondroitin sulfate và hàm lượng N_{NH_3} . Kết quả được trình bày ở các hình 3.26 ÷ 3.30.

Từ kết quả được trình bày ở các hình 3.26 ÷ 3.30 cho thấy:

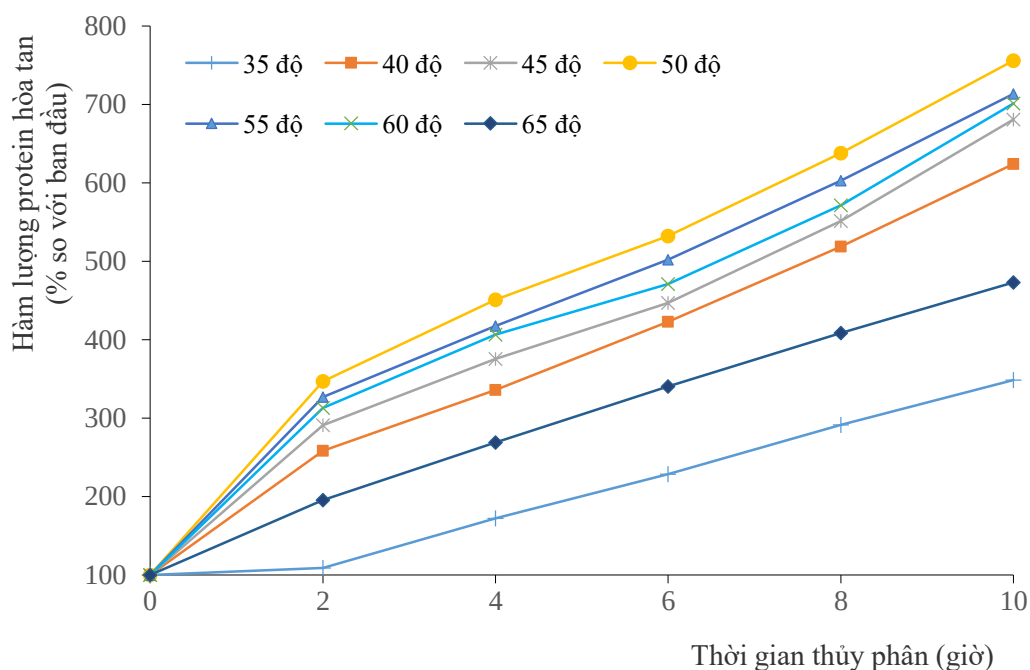
*** Về hàm lượng protein hòa tan**

Kết quả phân tích ở hình 3.26 cho thấy 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 nhưng mức độ tăng khác nhau tùy thuộc vào nhiệt độ thủy phân. 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 nhiệt độ 35⁰C, 40⁰C, 45⁰C, 50⁰C, 55⁰C, 60⁰C và 65⁰C là 2,18mg/g; 4,45mg/g; 5,82mg/g; 6,94mg/g; 6,54mmg/g; 6,26mg/g và 3,91mg/g cao gấp 1,09 lần; 2,59 lần; 2,96 lần; 3,47 lần; 3,27 lần; 3,13 lần và 1,45 lần so với ban đầu. Sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng protein hòa

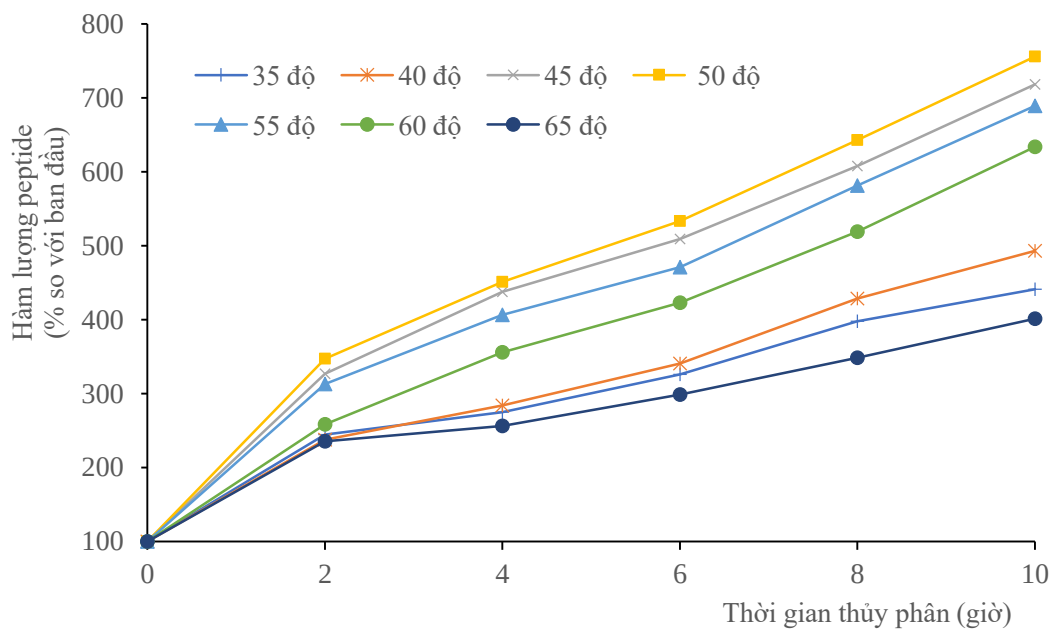
tan của dịch thủy phân sụn cá mập với nhiệt độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain sử dụng 35⁰C, 40⁰C, 45⁰C, 50⁰C, 55⁰C, 60⁰C và 65⁰C là 6,97mg/g; 12,48mg/g, 13,62mg/g; 15,12mg/g; 14,27mg/g; 14,03mmg/g và 9,46g/g, cao gấp tương ứng so với ban đầu là 3,49 lần; 6,14 lần; 6,81 lần; 8,56 lần; 7,14 lần; 7,01 lần và 4,78 lần. Kết quả phân tích cũng cho thấy khi tăng nhiệt độ thủy phân trong khoảng 35⁰C ÷ 50⁰C thì hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain tăng mạnh theo thời gian thủy phân cũng như tăng mạnh theo chiều tăng nhiệt độ thủy phân và đạt mức cao nhất khi nhiệt độ thủy phân là 50⁰C. Tuy vậy, khi tăng nhiệt độ thủy phân > 50⁰C thì hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong dịch thủy phân lại có xu thế giảm và khi tăng nhiệt độ thủy phân lên 65⁰C thì hàm lượng protein hòa tan tạo thành trong dịch thủy phân giảm mạnh. Kết quả này có thể được lý giải: enzyme là protein có hoạt tính sinh học nên không bền với nhiệt. Do vậy, khi enzyme hoạt động ở nhiệt độ cao trong một thời gian dài thì hoạt tính của enzyme giảm và nhiệt độ càng cao hoạt tính của enzyme càng giảm [2, 10, 13, 18, 19, 28, 30, 31]. Năm 1996, Nguyễn Văn Lệ công bố nghiên cứu đặc tính về proteinase từ đầu tôm cũng cho rằng nhiệt độ thích hợp của enzyme này là 50⁰C nhưng hoạt tính của enzyme giảm sau 30 phút xử lý ở nhiệt độ 50⁰C. Do vậy, tác giả đã sử dụng enzyme proteinase từ đầu tôm trong thủy phân cơ thịt cá ở 45⁰C [13]. Năm 2001, Vũ Ngọc Bội công bố nghiên cứu về đặc tính của proteinase ngoại bào của *Bacillus subtilis* cho thấy enzyme này có nhiệt độ thích hợp là 55⁰C nhưng enzyme không bền và hoạt tính giảm sau 15 phút thực hiện quá trình thủy phân ở 55⁰C. Do vậy, tác giả đã sử dụng enzyme proteinase ngoại bào của *Bacillus subtilis* trong thủy phân cơ thịt cá mỗi trong sản xuất bột đậm thủy phân ở 50⁰C [28÷31]. Hỗn hợp enzyme alcalase - papain gồm 2 enzyme protease. Enzyme alcalase có nhiệt độ thích hợp là 55⁰C và enzyme papain có nhiệt độ thích hợp trong khoảng 55⁰C÷80⁰C. Khi tăng nhiệt độ thủy phân lên 55⁰C thì hoạt tính của alcalase sẽ giảm mặc dù papain vẫn hoạt động tốt nhưng quá trình thủy phân sụn cá mập đòi hỏi phải có sự phối hợp hoạt động của cả 2 enzyme này. Papain thì phân cắt mô liên kết còn alcalase thì thủy phân protein ưa nước ở phía trong để tạo ra protein hòa tan. Khi hoạt tính của alcalase bị ảnh hưởng của nhiệt độ >50⁰C sẽ dẫn tới hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân sẽ bị ảnh hưởng.

Từ những phân tích ở trên cho thấy khoảng nhiệt độ thích hợp cho hoạt động thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain là 40⁰C ÷ 60⁰C nhưng khi xét

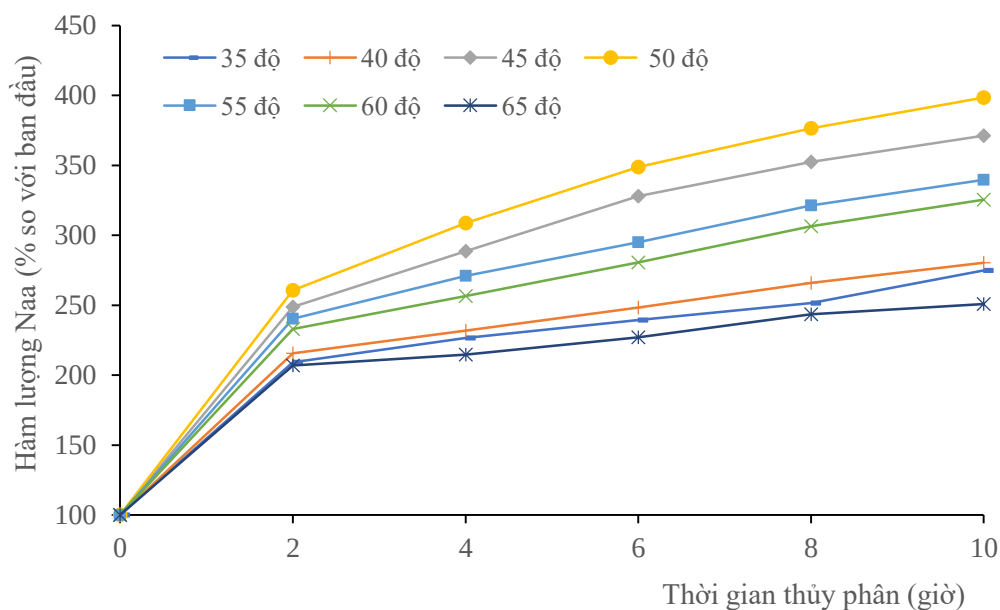
theo hàm lượng protein hòa tan tạo thành cao thì nhiệt độ thủy phân thích hợp nhất để hỗn hợp enzyme alcalase - papain thủy phân sụn cá mập là 50°C .



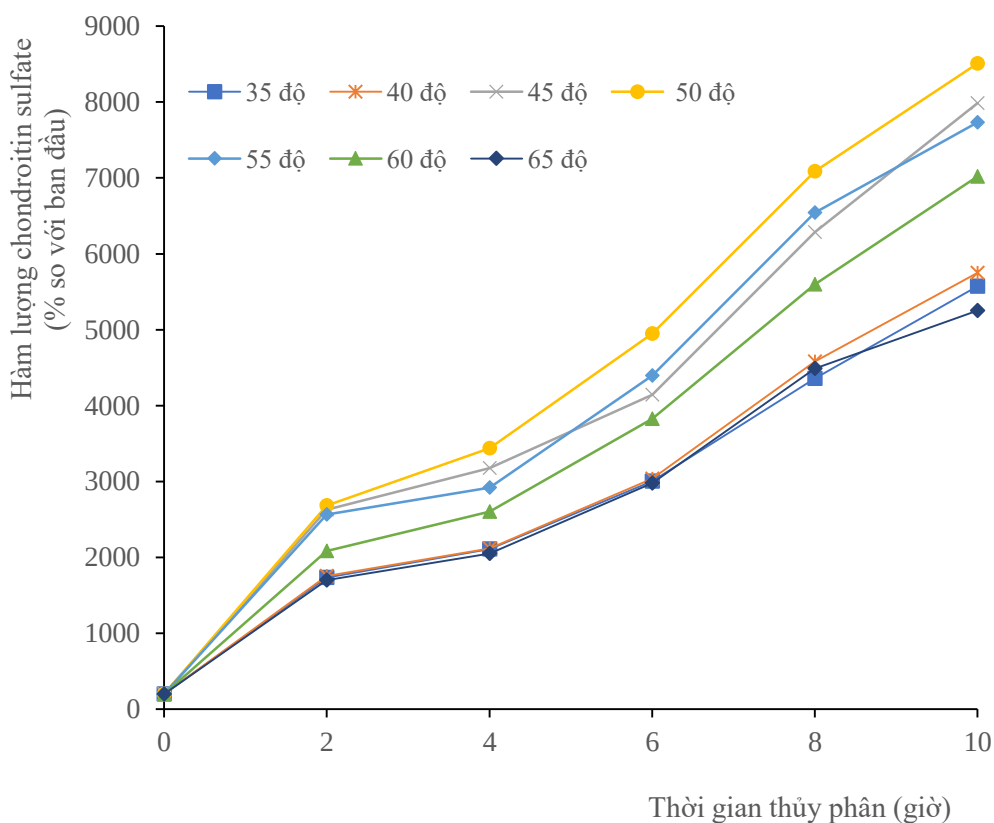
Hình 3.26. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian thủy phân đến hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân sụn cá mập



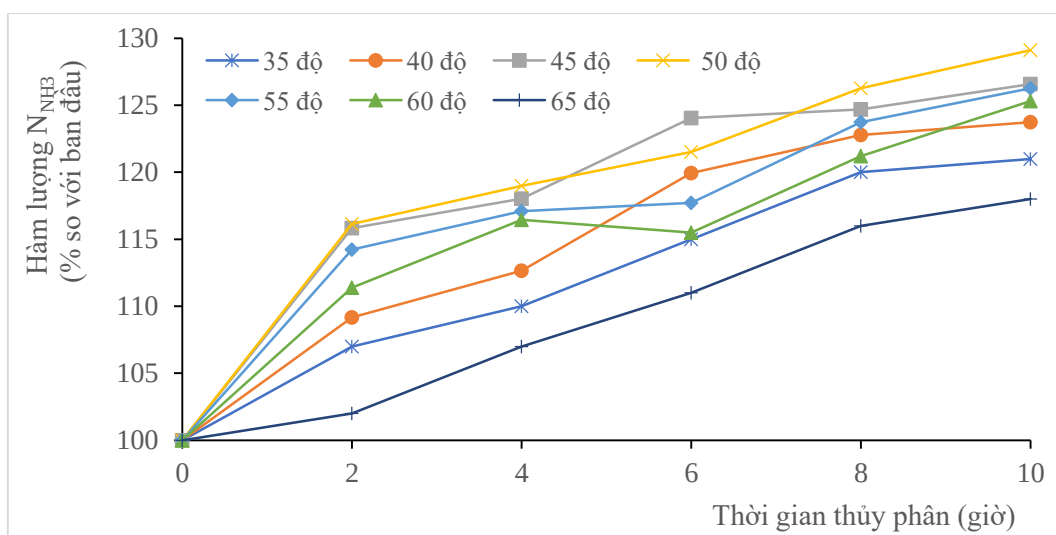
Hình 3.27. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian thủy phân đến hàm lượng peptid của dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.28. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian thủy phân đến hàm lượng Naa của dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.29. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian thủy phân đến hàm lượng chondroitin sulfate của dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.30. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian thủy phân đến hàm lượng N_{NH_3} của dịch thủy phân sụn cá mập

*** Về hàm lượng peptid**

Kết quả phân tích ở hình 3.27 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 thời gian thủy phân và nhiệt độ nhưng mức độ tăng khác nhau tùy thuộc vào nhiệt độ thủy phân. 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 nhiệt độ 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C 60°C và 65°C là 0,014182mg/ml; 0,015088mg/ml; 0,01742mg/ml; 0,018254mg/ml; 0,01682mg/ml; 0,01631mg/ml và 0,014121mg/ml, cao gấp tương ứng 2,03 lần; 2,16 lần; 2,49 lần; 2,61 lần; 2,40 lần; 2,33 lần và 2,11 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 nhiệt độ 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C và 65°C là 0,0183621mg/ml; 0,019622mg/ml; 0,02599mg/ml; 0,027897mg/ml; 0,02378mg/ml; 0,02278mg/ml và 0,01964mg/ml, cao gấp 2,65 lần; 2,75 lần; 3,71 lần; 3,99 lần; 3,40 lần; 3,25 lần và 3,01 lần so với ban đầu. Kết quả này cũng cho thấy khi tăng nhiệt độ thủy phân trong khoảng 35°C÷50°C thì hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân cũng tăng mạnh theo thời gian cũng như tăng mạnh theo chiều tăng nhiệt độ thủy phân và đạt mức cao nhất khi nhiệt độ thủy phân là 50°C. Tuy vậy, khi tăng nhiệt độ thủy phân > 50°C thì hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân có xu thế tăng chậm lại và khi nhiệt độ thủy phân > 60°C thì hàm lượng peptid của dịch thủy phân có xu thế giảm. Mặt

khác, kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy sự khác biệt về hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập ở nhiệt độ khác nhau có ý nghĩa thống kê. Kết quả này có nghĩa là nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng mạnh đến hàm lượng peptid tạo thành trong dịch thủy phân.

Từ các phân tích về hàm lượng peptid ở trên cho thấy nhiệt độ thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain là 50°C.

*** Về hàm lượng Naa**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.28 cho thấy quy luật tạo thành Naa trong các mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp alcalase-papain cũng giống như quy luật tạo thành protein hòa tan và peptid đó là hàm lượng Naa tạo thành trong dịch thủy phân tăng theo thời gian và nhiệt độ thủy phân, nhưng mức độ tăng của các mẫu thí nghiệm khác nhau tùy thuộc vào nhiệt độ thủy phân. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng Naa của dịch thủy phân tương ứng với nhiệt độ 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C và 65°C là 5,41243mg/g; 5,61244mg/g; 7,12544mg/g; 7,31232mg/g; 6,71642mg/g; 6,05429mg/g và 6,01427mg/g, cao gấp tương ứng so với ban đầu là 4,21 lần; 4,56 lần; 5,79 lần; 5,94 lần; 5,46 lần; 4,92 lần và 4,31 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 nhiệt độ 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C và 65°C là 8,97489mg/g, 9,97432mg/g; 11,25067mg/g; 11,46529mg/g; 11,07763mg/g; 10,71623mg/g và 9,71624mg/g, cao gấp 7,15 lần; 8,11 lần; 9,15 lần; 9,32 lần; 9,01 lần; 8,71 lần và 8,34 lần so với ban đầu. Kết quả này cũng cho thấy khi tăng nhiệt độ thủy phân trong khoảng từ 35°C ÷ 50°C thì hàm lượng Naa tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập tăng mạnh theo chiều tăng nhiệt độ và đạt giá trị cao nhất khi nhiệt độ thủy phân là 50°C. Trái lại, khi tăng nhiệt độ > 50°C thì hàm lượng Naa tạo thành trong dịch thủy phân có xu thế tăng chậm lại và tăng không đáng kể so với khi thủy phân ở nhiệt độ 50°C. Khi tiếp tục tăng nhiệt độ thủy phân > 60°C hàm lượng Naa tạo thành trong dịch thủy phân có xu thế giảm thấp hơn hàm lượng Naa tạo thành trong dịch thủy phân ở nhiệt độ 50°C. Kết quả có thể lý giải là ở nhiệt độ cao hoạt tính của hỗn hợp enzyme bị giảm nên quá trình thủy phân bị ảnh hưởng theo.

Từ những phân tích ở trên cho thấy sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain để

thủy phân sụn cá mập ở nhiệt độ 50°C là phù hợp.

*** Về hàm lượng chondroitin sulfate**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.29 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 alcalase-papain đều tăng theo thời gian thủy phân và thay đổi theo nhiệt độ thủy phân. Cụ thể, sau 2 giờ thủy phân, hàm lượng chondroitin sulfate của dịch thủy phân sụn cá mập ở nhiệt độ thủy phân 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, và 65°C là 6,3016mg/ml; 6,83078mg/ml; 10,23267mg/ml; 10,44381mg/ml; 9,97267mg/ml; 8,1070mg/ml và 7,1078mg/ml; cao gấp tương ứng 15,59 lần; 17,56 lần; 26,31 lần; 26,85 lần; 25,64 lần; 20,84 lần và 19,42 lần so với ban đầu. Sau 10 giờ thủy phân, hàm lượng chondroitin sulfate của dịch thủy phân sụn cá mập ở nhiệt độ thủy phân 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C và 65°C là 20,135561mg/ml; 22,365832mg/ml; 31,068940mg/ml; 33,089130mg/ml; 30,068940mg/ml; 27,310000mg/ml và 25,031000mg/ml; cao gấp 52,48 lần; 57,49 lần; 79,87 lần; 85,06 lần; 77,29 lần; 70,20 lần và 65,22 lần so với ban đầu. Kết quả này cũng cho thấy khi tăng nhiệt độ thủy phân trong khoảng 35°C ÷ 50°C thì hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập tăng mạnh theo chiều tăng nhiệt độ và đạt giá trị cao nhất khi nhiệt độ thủy phân là 50°C. Trái lại, khi tăng nhiệt độ > 50°C thì hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong dịch thủy phân có xu thế tăng chậm lại và tăng không đáng kể so với khi thủy phân ở nhiệt độ 50°C. Khi tiếp tục tăng nhiệt độ thủy phân > 60°C hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong dịch thủy phân có xu thế giảm thấp hơn hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong dịch thủy phân ở nhiệt độ 50°C. Kết quả có thể lý giải là ở nhiệt độ cao > 50°C enzyme không bền nên hoạt tính của hỗn hợp enzyme bị giảm vì thế quá trình thủy phân bị ảnh hưởng theo.

Từ những phân tích ở trên khi xét theo hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành cao thì sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain để thủy phân sụn cá mập ở nhiệt độ 50°C là phù hợp.

*** Về hàm lượng N_{NH3}**

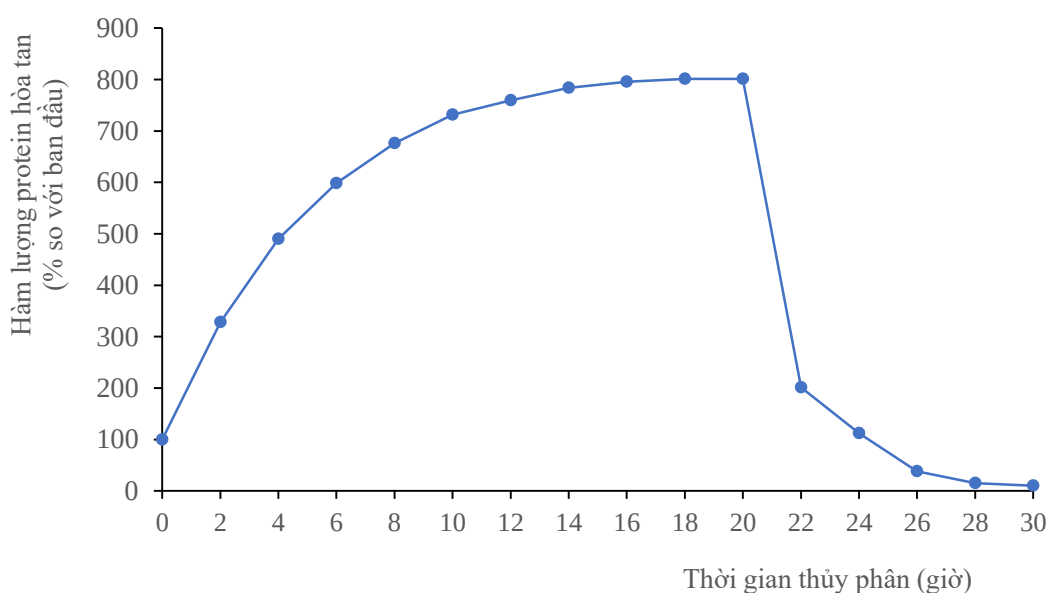
Kết quả phân tích ở hình 3.30 cho thấy hàm lượng N_{NH3} tạo thành trong các mẫu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở nhiệt độ thủy phân khác

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 enzyme alcalase - papain ở nhiệt độ 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C và 65°C, hàm lượng N_{NH_3} của dịch thủy phân tăng trong khoảng từ 1,00 ÷ 1,29 lần so với ban đầu và sự chênh lệch về hàm lượng N_{NH_3} giữa các mẫu thí nghiệm ở cùng một thời không nhiều và không có ý nghĩa thống kê.

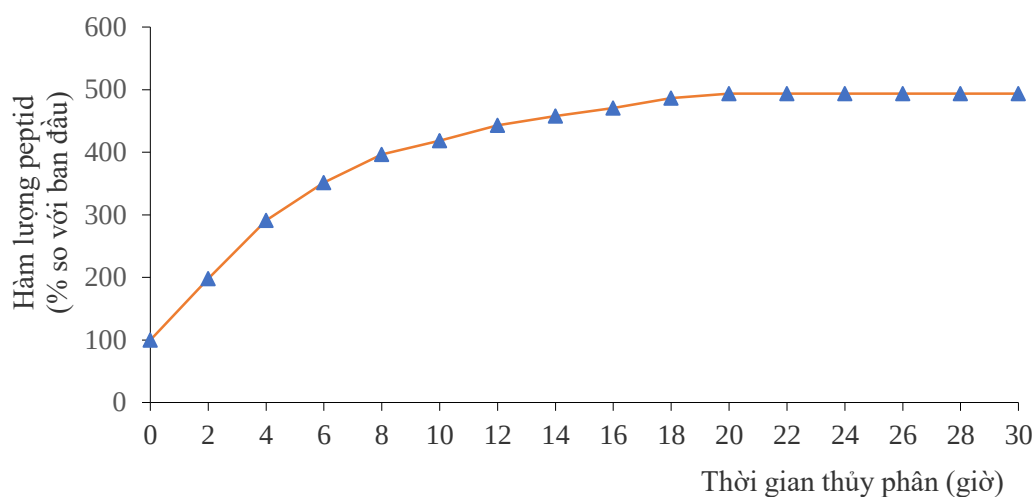
Từ tất cả các phân tích ở trên cho thấy quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở nhiệt độ 50°C sẽ tạo ra dịch thủy phân có hàm lượng protein hòa tan, peptid, Naa và chondroitin sulfate cao nhưng hàm lượng N_{NH_3} tạo thành lại tương đương các mẫu thủy phân khác. Do vậy, nhiệt độ 50°C được lựa chọn làm thông số cố định cho các lần nghiên cứu sau này.

3.1.8. Xác định thời gian thích hợp cho quá trình thủy phân

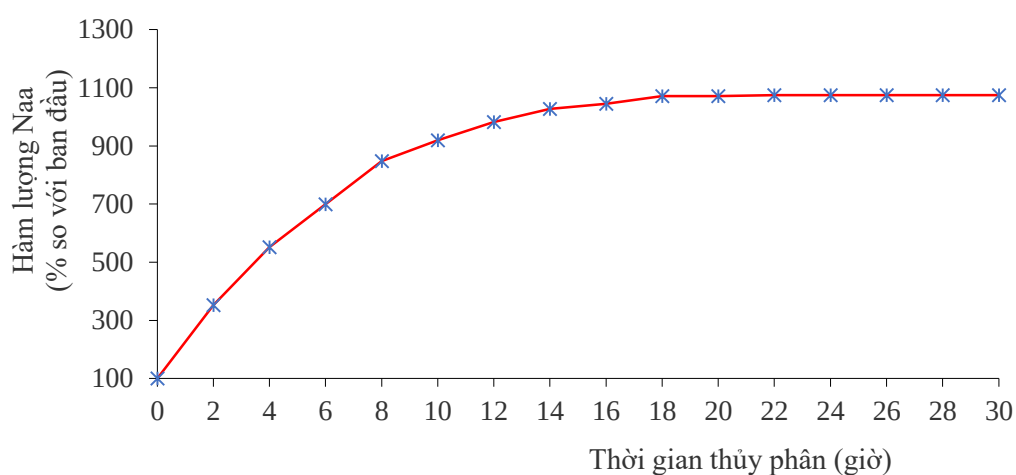
Tiến hành thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với tỷ lệ alcalase/papain trong hỗn hợp 60/40, nồng độ hỗn hợp enzyme sử dụng là 0,3%, tỉ lệ nước bổ sung là 50/50, quá trình thủy phân tiến hành ở pH tự nhiên (6,8) và nhiệt độ 50°C. Sau mỗi khoảng thời gian 2 giờ thủy phân, 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 phân tích trình bày ở các hình 3.31 ÷ 3.35.



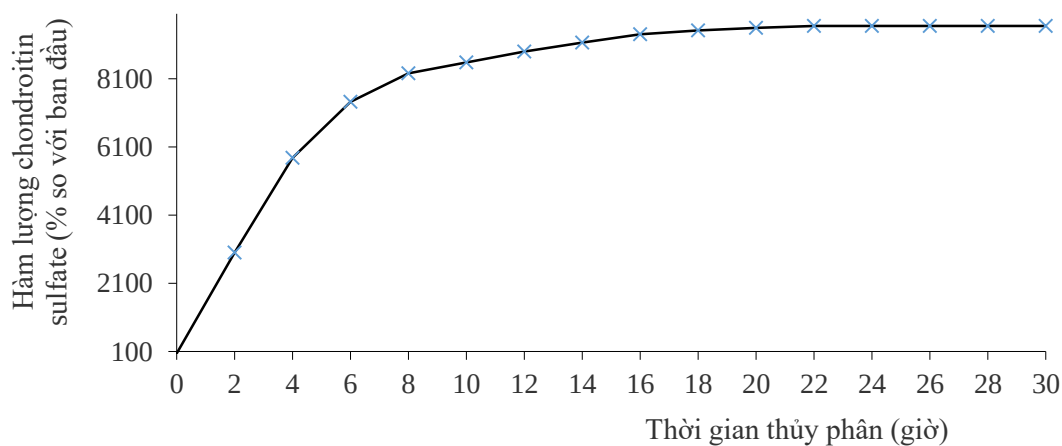
Hình 3.31. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng protein hòa tan trong dịch thủy phân sụn cá mập



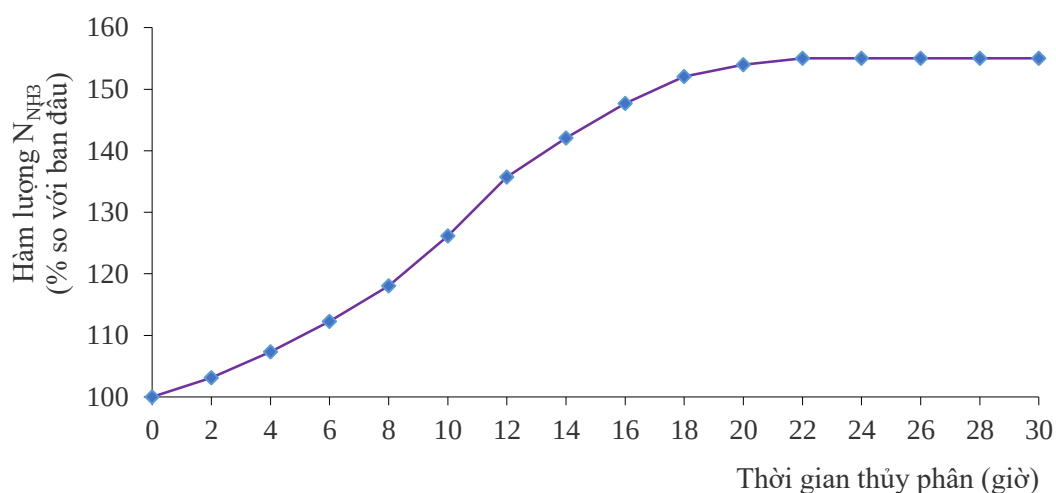
Hình 3.32. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng peptid trong dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.33. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng Naa trong dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.34. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng chondroitin sulfate trong dịch thủy phân sụn cá mập



Hình 3.35. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng N_{NH_3} trong dịch thủy phân sụn cá mập

Từ kết quả phân tích trình bày ở các hình 3.31 ÷ 3.35 cho thấy:

*** Về hàm lượng protein hòa tan**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.31 cho thấy theo thời gian thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain, hàm lượng protein hòa tan tạo thành có sự thay đổi tùy thuộc vào thời gian thủy phân. Cụ thể, trong thời gian thủy phân từ 2 ÷ 12 giờ thì hàm lượng protein hòa tan tạo thành đều tăng liên tục theo thời gian thủy phân và cao gấp tương ứng 3,28 lần ÷ 4,09 lần so với ban đầu. Trong giai đoạn từ 14 ÷ 18 giờ thủy phân, hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân sụn cá mập vẫn tăng theo thời gian thủy phân nhưng mức độ tăng chậm dần và cao gấp tương ứng so với ban đầu là 7,84 lần ÷ 8,02 lần. Khi kéo dài thời gian thủy phân lên từ 18 ÷ 20 giờ thì hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân có xu thế ổn định ở mức cao nhất và cao gấp tương ứng so với ban đầu là 8,02 lần ban đầu. Nếu tăng thời gian thủy phân ≥ 20 giờ thì hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân giảm nhanh. Kết quả này chứng tỏ sau 20 giờ thủy phân, protein hòa tan tiếp tục bị thủy phân thành peptid và acid amin nên hàm lượng protein hòa tan giảm nhanh. *Như vậy ở giai đoạn cuối của quá trình thủy phân sụn cá mập, hàm lượng protein hòa tan của dịch thủy phân giảm mạnh vì thế không nên lựa chọn hàm lượng protein hòa tan làm hàm mục tiêu của quá trình thủy phân.*

*** Về hàm lượng peptid**

Kết quả phân tích ở hình 3.32 cũng cho thấy theo thời gian thủy phân hàm lượng peptid tạo thành đều tăng theo thời gian thủy phân nhưng mức độ tăng khác nhau tùy

thuộc vào khoảng thời gian thủy phân. Cụ thể, trong khoảng thời gian thủy phân từ khoảng 2 ÷ 12 giờ, hàm lượng peptid thu được tăng liên tục trong suốt quá trình thủy phân và nằm trong khoảng 198,03mg/ml ÷ 442,81mg/ml, cao gấp 1,00 lần ÷ 4,02 lần so với ban đầu. Sau 14 ÷ 20 giờ thủy phân, hàm lượng peptid của dịch thủy phân sụn cá mập nằm trong khoảng 458,07mg/ml ÷ 493,62mg/ml, cao gấp tương ứng so với ban đầu là 4,42 lần ÷ 4,86 lần. Nhưng khi kéo dài thời gian thủy phân trên 20 giờ thì hàm lượng peptid của dịch thủy phân có xu hướng không tăng thêm. Kết quả này có thể lý giải: trong giai đoạn từ 2 ÷ 20 giờ thủy phân, dưới tác động của hỗn hợp enzyme alcalase và papain, protein nằm trong cấu trúc của sụn cá mập bị phân cắt thành protein hòa tan và peptid, sau đó các protein hòa tan tiếp tục bị thủy phân thành peptid và peptid lại tiếp tục bị thủy phân thành acid amin nên hàm lượng peptid ở giai đoạn sau của quá trình thủy phân có xu thế tăng chậm, thậm chí giảm. *Như vậy, ở giai đoạn cuối của quá trình thủy phân, hàm lượng peptid của dịch thủy phân có xu thế giảm vì thế không nên lựa chọn hàm lượng peptid làm hàm mục tiêu của quá trình thủy phân.*

*** Về hàm lượng Naa**

Kết quả phân tích ở hình 3.33 cũng cho thấy theo thời gian thủy phân hàm lượng Naa tạo thành đều tăng theo thời gian thủy phân nhưng mức độ tăng khác nhau tùy thuộc vào thời gian thủy phân. Cụ thể, trong giai đoạn từ khoảng 2 ÷ 22 giờ thủy phân, hàm lượng Naa tăng liên tục theo thời gian thủy phân và cao gấp 3,52 lần ÷ 10,75 lần so với ban đầu. Khi tăng thời gian > 22 giờ, hàm lượng Naa thu được có xu thế ổn định và không tăng. Kết quả này có thể giải thích: theo thời gian thủy phân sụn cá mập dưới tác động của hỗn hợp enzyme alcalase và papain, protein hòa tan và peptid trong dịch thủy phân bị phân giải thành acid amin nên hàm lượng Naa của dịch thủy phân tăng cao. Tuy vậy, theo nhiều nghiên cứu về quá trình thủy phân protein cá bằng enzyme protease của các tác giả như Đặng Văn Hợp, Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Thị Dư, Nguyễn Văn Lê, Vũ Ngọc Bội, ... [2, 11÷13, 29÷32] đều cho thấy giai đoạn phân cắt peptid thành acid amin diễn ra rất chậm và kéo dài trong nhiều giờ. Chính vì thế sản xuất nước mắm truyền thống hoặc nước chấm cần có quá trình thủy phân tạo thành acid amin nên thời gian thủy phân rất dài. Trong khi đó mục tiêu của luận án là tạo thành dịch thủy phân có chứa các chất tự nhiên ở sụn cá và quan trọng là dịch thủy phân có hàm lượng chondroitin sulfate cao nên dịch thủy phân có chứa acid amin hoặc peptid đều có thể dùng làm thực

phẩm. Chính vì thế không nên thủy phân trong thời gian quá dài.

*** Về hàm lượng chondroitin sulfate**

Kết quả phân tích ở hình 3.34 cho thấy theo thời gian thủy phân hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong dịch thủy phân sụn cá mập tăng theo thời gian thủy phân. Cụ thể, sau từ 2 ÷ 20 giờ thủy phân, hàm lượng chondroitin sulfate thu được tăng nhanh và đạt trong khoảng 3020,1mg/ml ÷ 9647,3mg/ml, cao gấp từ 3,00 lần ÷ 95,88 lần so với ban đầu. Nhưng khi kéo dài thời gian thủy phân > 20 giờ thì hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong dịch thủy phân tăng chậm lại và có xu thế đạt mức cao ổn định. Kết quả này có thể giải thích: đến giai đoạn 20 giờ thủy phân thì chondroitin sulfate nằm trong cấu trúc của mô sụn cá mập đã bị phân cắt gần hết thành dạng tự do nên hàm lượng chondroitin sulfate tạo thành trong dịch thủy phân thu được sẽ có xu thế không tăng.

Từ những phân tích ở trên cho thấy khi xét theo việc tạo ra dịch thủy phân sụn cá mập có hàm lượng chondroitin sulfate cao thì chỉ nên kéo dài thời gian thủy phân tới giai đoạn trong khoảng 20 ÷ 22 giờ.

*** Về hàm lượng N_{NH_3}**

Từ kết quả phân tích ở hình 3.35 cho thấy theo thời gian thủy phân từ 2 ÷ 22 giờ hàm lượng N_{NH_3} tạo thành đều tăng theo thời gian thủy phân nhưng mức độ tăng chậm và nằm trong khoảng cao gấp tương ứng từ 1,19 lần cho đến 1,23 lần so với ban đầu.

Từ tất cả những phân tích ở trên cho thấy để thu được dịch thủy phân có hàm lượng chondroitin sulfate cao thì quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain chỉ nên kéo dài thời gian thủy phân trong khoảng 20 ÷ 22 giờ.

3.1.9. Tối ưu hóa quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain

Mục tiêu của luận án là thủy phân sụn cá mập tạo thành dịch thủy phân có chứa chứa chondroitin sulfate với hàm lượng cao. Do vậy, để bài toán tối ưu hóa dễ thực hiện và phù hợp với mục tiêu đặt ra, luận án chọn hàm mục tiêu đặc trưng cho quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain là hiệu suất thủy phân tạo thành chondroitin sulfate (Y) với hàm lượng cao. Kết quả nghiên cứu cho thấy có nhiều yếu

tổ ảnh hưởng tới quá trình thủy phân sụn cá mập tạo thành dịch thủy phân chứa chondroitin sulfate với hàm lượng cao như: loại enzyme, tỉ lệ enzyme, tỉ lệ sụn/nước bổ sung, nồng độ enzyme, nhiệt độ thủy phân, pH thủy phân và thời gian thủy phân. Kết quả phân tích cũng cho thấy có 3 yếu tố tác động mạnh nhất tới hiệu suất thủy phân sụn cá mập tạo thành dịch thủy phân chứa chondroitin sulfate đó là: nồng độ enzyme, nhiệt độ thủy phân, thời gian thủy phân. Do vậy, luận án chọn 3 yếu tố này làm biến độc lập quy hoạch thực nghiệm để tối ưu hóa quá trình thủy phân. Tiến hành quy hoạch thực nghiệm 3 biến gồm 15 thí nghiệm. Kết quả thực nghiệm được trình bày ở bảng 3.2.

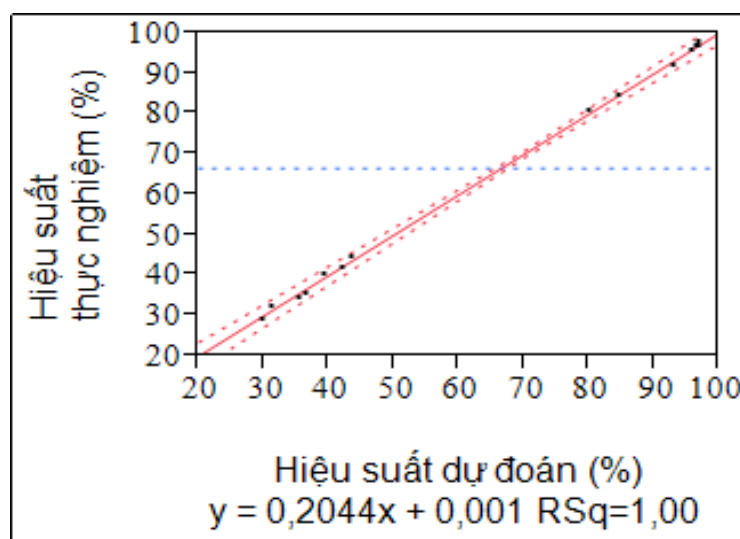
Bảng 3.2. Bảng ma trận thực nghiệm ảnh hưởng của biến mã hóa tới hiệu suất thủy phân tạo chondroitin sulfate

STT	Ma trận thí nghiệm	Biến mã hóa			Hiệu suất: Y (%)
		Nồng độ: X ₁ (%)	Nhiệt độ: X ₂ (°C)	Thời gian: X ₃ (giờ)	
1	0—	0,3	45	18	28,90
2	—+0	0,2	55	20	34,32
3	000	0,3	50	20	96,64
4	0++	0,3	55	22	80,85
5	0+—	0,3	55	18	44,71
6	+—0	0,4	45	20	40,24
7	+0+	0,4	50	22	96,66
8	—0—	0,2	50	18	42,11
9	000	0,3	50	20	96,64
10	—0+	0,2	50	22	84,79
11	000	0,4	55	20	92,13
12	000	0,3	50	20	97,64
13	+0—	0,4	50	18	95,62
14	—+0	0,2	45	20	32,03

15	0—+	0,3	45	22	35,34
----	-----	-----	----	----	-------

Bảng 3.3. Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) và hệ số tuyến tính, tương tác và bình phương của các phương trình hồi quy để dự đoán mức độ ảnh hưởng của các nhân tố thủy phân đến hàm mục tiêu

Nguồn	Bậc tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị mô hình thực F-Value	Sự thiếu phù hợp P-Value
Intercept		96,97	0,55	176,99	<0,001*
X ₁	1,00	17,18	0,33	51,19	<0,001*
X ₂	1,00	15,06	0,33	44,89	<0,001*
X ₃	1,00	10,91	0,33	32,52	<0,001*
X ₁ *X ₂	1,01	13,65	0,47	27,77	<0,001*
X ₁ *X ₃	1,01	-10,16	0,47	-21,41	<0,001*
X ₂ *X ₃	1,01	7,43	0,47	15,65	<0,001*
X ₁ *X ₁	1,00	-6,72	0,49	-13,62	<0,001*
X ₂ *X ₂	1,00	-39,32	0,49	-79,62	<0,001*
X ₃ *X ₃	1,00	-10,20	0,49	-20,66	<0,001*



Hình 3.36. Mối tương quan giữa mô hình dự đoán và thực nghiệm của các biến độc lập

tối hiệu suất thủy phân tạo chondroitin sulfate cao

Lack Of Fit				
		Sum of		
Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio
Lack of fit	3	6,5861000	2,19537	6,5861
Pure	2	0,6666667	0,33333	Prob >F
Total Error	5	7,2527667		0,1347
				Max RSq
				0,9999

Hình 3.37. Sự thiếu phù hợp của mô hình thông qua chỉ số (lack of fit >0,05)

*** Phân tích các kết quả thu được:**

Kết quả tối ưu hóa cho thấy hệ số tương quan R (coefficient of correlation) giữa kết quả thực nghiệm và kết quả mô hình dự đoán về nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân là giá trị của R (hình 3.36). Giá trị hệ số tương quan R cao cho thấy có sự tương đồng giữa kết quả dự đoán và kết quả thực nghiệm. Cụ thể, với $R = 1,0$ (cao nhất hay tối đa) có nghĩa là 100% là do ảnh hưởng của các biến độc lập như nồng độ enzyme (X_1), nhiệt độ (X_2) và thời gian thủy phân (X_3); và không có hay có 0% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được nguyên nhân gây ra (sai số ngẫu nhiên). Hơn nữa kết quả đánh giá ở hình 3.36 cho thấy hiệu suất thực nghiệm nằm gần như trùng hoàn toàn trên đường mô hình dự đoán, hiệu suất cao nhất đạt gần tới đỉnh 96÷99%. Điều này chứng tỏ phương trình hồi quy đã mô tả chính xác các số liệu thực nghiệm.

Kiểm định tính tương thích tổng quát của mô hình với thực nghiệm (F-test hay kiểm định Fisher) thể hiện trong bảng 3.3. Kiểm định giá trị F cho sự thiếu phù hợp của mô hình (lack of fit) là kiểm định sự thiếu phù hợp của mô hình bằng cách so sánh sự mất mát của các giá trị quan sát (tổng phương sai của giá trị thực nghiệm so với giá trị dự đoán) với phương sai của các lần chạy điểm lặp tâm, kết quả thu được $P < 0,001$ * $\alpha = 0,05$ và giá trị Lack of fit = 0,1347 $> \alpha = 0,05$ (hình 3.37) cho thấy sự tồn tại của giả thiết đảo là “không có sự thiếu phù hợp” hay sự sai khác giữa hai phương sai này là không đáng kể, từ đó kết luận mô hình phù hợp. Bên cạnh đó hệ số biến thiên theo độ lệch chuẩn thấp (trung bình bình phương $X_1 = 0,33$; $X_2 = 0,33$ và $X_3 = 0,33$) chứng tỏ rằng các thí nghiệm được thực hiện chính xác và độ lặp lại cao.

Tất cả giá trị P_{value} của nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân lần lượt là $P_{\text{value}}(X_1) < 0,001^*$; $P_{\text{value}}(X_2) < 0,001^*$ và $P_{\text{value}}(X_3) < 0,001^*$ nghĩa là chỉ có nhỏ hơn 0,001% sự thay đổi của giá trị F là phần nhiều mà mô hình không tính toán được. Kết quả này cho thấy độ tương thích tốt của phương trình hồi quy so với số liệu thực nghiệm, điều này cho thấy độ tin cậy thống kê cao.

Các kết quả kiểm định cho thấy sự đúng đắn của các mô hình xây dựng được. Từ đó, biểu thức toán học mô tả mối quan hệ giữa nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian thủy phân với các biến mã hóa (điều kiện khảo sát) như sau:

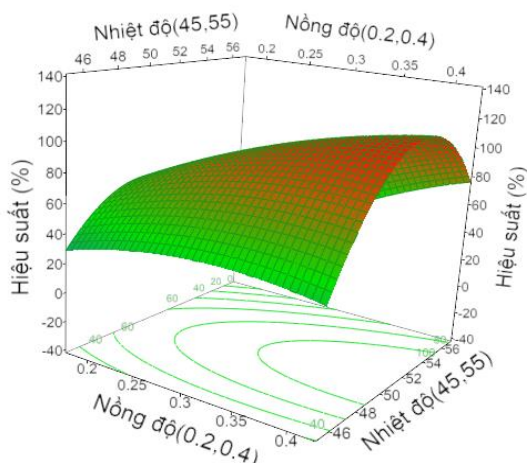
$$Y = 96,97 + 16,43 X_1 + 14,44 X_2 + 10,79 X_3 + 12,40 X_1 * X_2 - 10,41 X_1 * X_3 + 7,43 X_2 * X_3 - 7,47 X_1 * X_1 - 39,82 X_2 * X_2 - 9,70 X_3 * X_3 \quad (1)$$

Trong vùng khảo sát, phương trình hồi quy cho thấy Hiệu suất tạo chondroitin sulfate cao (Y) chịu ảnh hưởng bậc một của yếu tố nghiên cứu X_1 , X_2 , X_3 ; bậc hai của cả 3 yếu tố nghiên cứu X_1 , X_2 và X_3 ; và chịu ảnh hưởng đồng thời của các cặp yếu tố ($X_1 * X_2$), ($X_1 * X_3$), ($X_2 * X_3$). Trong đó ảnh hưởng mạnh nhất tới hiệu suất tạo chondroitin sulfate là cặp yếu tố ($X_2 * X_2$) và ít ảnh hưởng nhất là cặp yếu tố ($X_1 * X_1$).

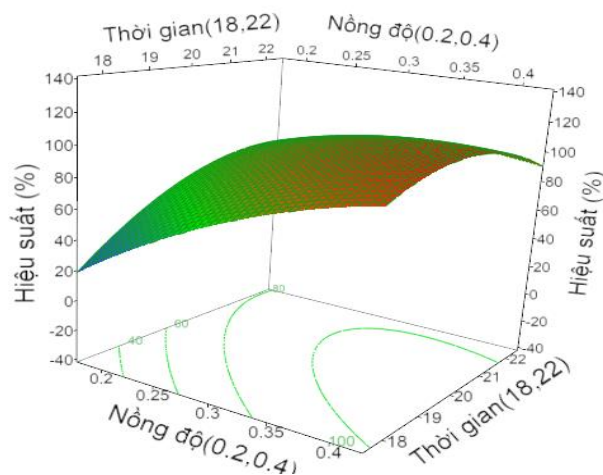
Xu hướng ảnh hưởng của các yếu tố ảnh hưởng được giải thích như sau: Yếu tố nồng độ enzyme ảnh hưởng tích cực tới hiệu suất thủy phân, khi nồng độ enzyme thấp ($<0.2\%$) thì hiệu suất thủy phân chưa cao do thiếu enzyme, còn khi nồng độ enzyme cao ($>0.4\%$) thì phản ứng thủy phân xảy ra hoàn toàn với sự dư thừa enzyme, điều này gây lãng phí enzyme. Tương tự yếu tố nhiệt độ cũng ảnh hưởng tích cực tới hiệu suất thủy phân, cụ thể khi nhiệt độ thấp ($<45^{\circ}\text{C}$) thì hiệu suất thu chondroitin sulfate thấp do khoảng nhiệt độ ($<45^{\circ}\text{C}$) chưa phải là nhiệt độ thích hợp cho hoạt động enzyme nên quá trình thủy phân chưa được thực hiện hoàn toàn, còn khi nhiệt độ cao ($>55^{\circ}\text{C}$) đây là nhiệt độ cao có thể làm giảm hoạt tính enzyme nên vận tốc của phản ứng enzyme giảm. Cuối cùng yếu tố thời gian cũng ảnh hưởng tích cực đến hiệu suất. Nếu thời gian ngắn (<18 giờ) phản ứng enzyme chưa hoàn toàn nên hiệu suất thủy phân tạo chondroitin sulfate chưa đạt mức tối đa. Ngược lại, khi thời gian dài (>22 giờ) thì phản ứng enzyme đã xảy ra hoàn toàn, hiệu suất thủy phân không tăng thêm.

Lần lượt xét ảnh hưởng của từng yếu tố (khi các yếu tố khác giữ ở mức trung bình) đến hiệu suất thu hồi (Hình 3.38÷3.40) là nồng độ enzyme, nhiệt độ và thời gian có ảnh

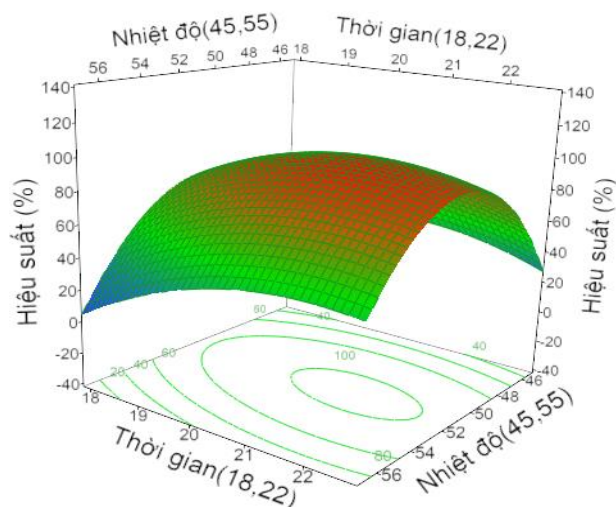
hưởng rõ rệt đến hiệu suất thủy phân.



Hình 3.38. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nồng độ enzyme (X_1) và nhiệt độ (X_2) đến hiệu suất thủy phân thu chondroitin sulfate



Hình 3.39. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nồng độ enzyme (X_1) và thời gian (X_3) đến hiệu suất thủy phân tạo chondroitin sulfate cao



Hình 3.40. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nhiệt độ (X_2) và thời gian

(X₃) đến hiệu suất thủy phân tạo chondroitin sulfate cao

Kết quả phân tích hình 3.38÷3.40 cho thấy cả 3 nhân tố X₁, X₂ và X₃ đều có tương tác với nhau và ảnh hưởng đến hàm mục tiêu hiệu suất thủy phân tạo chondroitin sulfate (Y) cao. Cụ thể, kết quả phân tích ở hình 3.38 cho thấy nồng độ enzyme (X₁) và nhiệt độ (X₂) có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu suất thủy phân. Đỉnh thể hiện hiệu suất tạo chondroitin sulfate cao nhất trong khoảng 96 ÷ 98% khi biến X₁=0,3(%) và X₂=50⁰C. Tương tự tại hình số 3.39: nồng độ enzyme (X₁) và thời gian (X₃) cũng ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thủy phân (Y). Cụ thể, hiệu suất thủy phân đạt cao nhất là Y=96,97% khi X₁ = 0,3% và X₃ = 20 giờ. Kết quả này cũng đúng với hình số 3.40: X₂=50⁰C và X₃=20 giờ thì hiệu suất thủy phân sẽ đạt cực đại cũng là Y=96,97%.

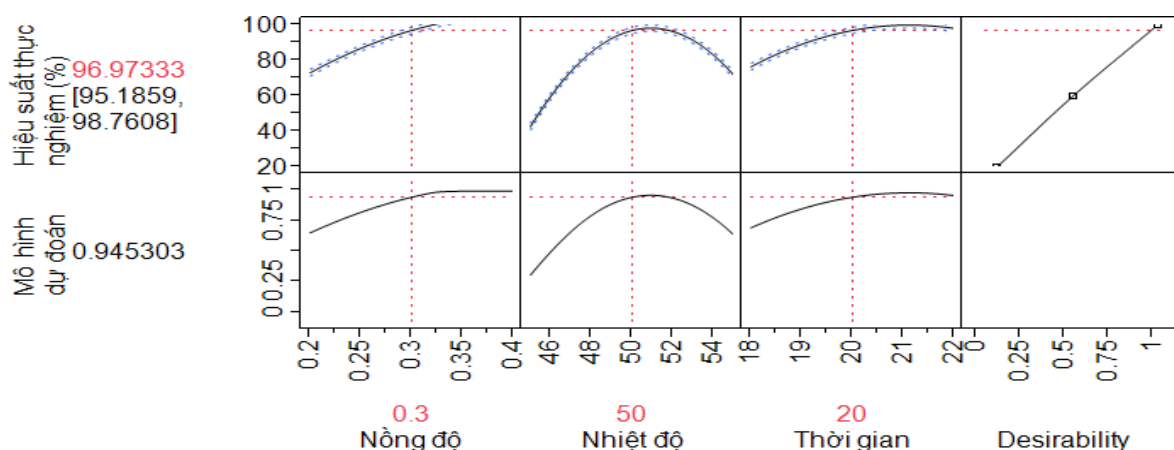
Giải bài toán quan hệ tuyến tính trong mặt phẳng: trong số các đường đồng mức cắt vector pháp tuyến, tìm đường đồng mức có giá trị mức nhỏ nhất. Ta nhận thấy, nếu dịch chuyển song song các đường đồng mức theo hướng vector pháp tuyến thì giá trị mức sẽ tăng, nếu dịch chuyển theo hướng ngược lại thì giá trị mức sẽ giảm. Do đó, bài toán đặt ra có thể tiến hành như sau: Bắt đầu từ một đường đồng mức cắt vector pháp tuyến, ta dịch chuyển song song các đường đồng mức theo hướng ngược hướng với vector gốc cho đến khi nào việc dịch chuyển tiếp theo làm cho đường đồng mức không còn cắt vector pháp tuyến nữa thì dừng. Các điểm của vector pháp tuyến nằm trên đường mức cuối cùng này sẽ là giá trị cần tìm, giá trị này chính là giá trị tối ưu tìm được. Cụ thể: trong cả 3 hình 3.38, 3.39 và 3.40 cho thấy bề mặt tương tác giữa các đường đồng mức một lần nữa khẳng định: cả 3 biến nồng độ enzyme (X₁), nhiệt độ (X₂) và thời gian (X₃) đều có liên quan và ảnh hưởng trực tiếp lẫn nhau. Hàm mục tiêu, tức hiệu suất thủy phân thu chondroitin sulfate cao nhất là Y=96,97% khi các biến X₁ = 0,3%; X₂=50⁰C và X₃= 20 giờ.

*** Tối ưu hóa**

Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) ảnh hưởng của các nhân tố sảy đến hàm mục tiêu cho thấy tất cả các biến bậc một, bậc 2 và tương tác giữa các biến đều có ảnh hưởng đến hàm mục tiêu ($p < 0,0001 * < \alpha = 0,05$). Các biến X₁, X₂, X₃, X₁², X₂² và X₃² có ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu ($p < 0,05$).

Kết quả phân tích phương sai trong bảng 3.3 và phương trình hồi quy cho thấy hệ số của các biến bậc hai và tương tác giữa các biến có giá trị âm còn các biến bậc nhất có hệ số dương. Điều này cho thấy hàm mục tiêu đồng biến với X_1 , X_2 , X_3 , $X_1 \cdot X_2$, $X_2 \cdot X_3$ và nghịch biến với X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 và $X_1 \cdot X_3$. Nhưng độ lớn của hệ số các biến bậc hai lớn (cao nhất là 39,82 của X_2^2) nên ảnh hưởng nhiều nhất đến hàm mục tiêu. Còn hệ số của các tương tác $X_1 \cdot X_2$, $X_2 \cdot X_3$ và $X_1 \cdot X_3$ nhỏ (cao nhất chỉ là 12,40 $X_1 \cdot X_2$) nên ảnh hưởng là không lớn đến hàm mục tiêu.

Kết quả ở hình 3.41 cho thấy khi nồng độ enzyme tăng thì hiệu suất thủy phân cũng tăng theo và tăng cao nhất khi nồng độ enzyme là 0,3%. Nếu tiếp tục tăng nồng độ enzyme >0,3% thì hiệu suất đi theo đường nằm ngang, có nghĩa là hiệu suất không tăng thêm khi tăng nồng độ enzyme, do enzyme đã bão hòa so với cơ chất, nên hiệu suất phản ứng enzyme không tăng thêm. Tiếp theo, với nhiệt độ thủy phân: khi tăng nhiệt độ thủy phân thì hiệu suất thủy phân cũng tăng theo và hiệu suất đạt cao nhất tại 50°C. Tuy nhiên khi tăng nhiệt độ > 50°C thì hiệu suất không tăng mà ngược lại còn giảm xuống. Kết quả này có thể giải thích: enzyme là một protein nên dễ bị biến đổi với nhiệt [10, 18]. Nhiều nghiên cứu về enzyme cho thấy ở nhiệt độ cao enzyme thường không bền với nhiệt nên khi phản ứng enzyme diễn ra trong thời gian dài ở nhiệt độ cao sẽ làm enzyme giảm hoạt tính dẫn tới hiệu suất của phản ứng enzyme giảm [10, 11, 18, 28 ÷ 32, 62, 68]. Kết quả nghiên cứu của luận án cũng phù hợp với nghiên cứu của Vũ Ngọc Bội năm 2001 cho thấy proteinase ngoại bào của *Bacillus subtilis* có nhiệt độ thích hợp là 55°C nhưng ở 55°C enzyme không bền, sau 30 phút thực hiện quá trình thủy phân, hoạt tính của enzyme này giảm. Vì thế, khi sử dụng proteinase ngoại bào của *B. subtilis* trong thủy phân cơ thịt cá mồi, mặc dù nhiệt độ thích hợp của enzyme proteinase ngoại bào của *B. subtilis* là 55°C vẫn phải thực hiện quá trình thủy phân ở 50°C vì quá trình thủy phân kéo dài tới 16 giờ [28, 30]. Tương tự với biến thời gian: khi kéo dài thời gian thủy phân thì hiệu suất thủy phân thu chondroitin sulfate cũng tăng và đạt cao nhất tại thời gian 20 giờ. Nếu thời gian thủy phân >20 giờ thì đường hiệu suất không tăng và đi theo chiều nằm ngang. Kết quả này có nghĩa là cơ chất của quá trình thủy phân là sụn cá mập trong đó chondroitin sulfate liên kết với protein đã bị thủy phân hết, nên phản ứng enzyme không còn xảy ra nữa nên hiệu suất không tăng.



Hình 3.41. Mối tương quan giữa mô hình lý thuyết và thực nghiệm của các nhân tố thủy phân đến quá trình thủy phân tạo chondroitin sulfate

Từ mô hình rút ra được điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân được tiến hành sao cho hiệu suất tạo chondroitin sulfate cao nhất. Tiến hành giải bài toán tối ưu bằng cách chấp mục tiêu theo thuật toán “hàm mong đợi”. Kết quả tối ưu hóa thu được $X_1 = 0,3$ tức nồng độ enzyme alcalase - papain là 0,3%, $X_2 = 50$ tức nhiệt độ thủy phân là 50°C , $X_3 = 20$ tức thời gian thủy phân là 20 giờ. Khi đó hàm mục tiêu (Y) là hiệu suất thủy phân tạo chondroitin sulfate đạt 96,97% tương ứng với hàm lượng chondroitin sulfate, hàm lượng nitơ tổng của dịch thủy phân lần lượt là 40,5 mg/ml và 7,46 g/l dịch thủy phân.

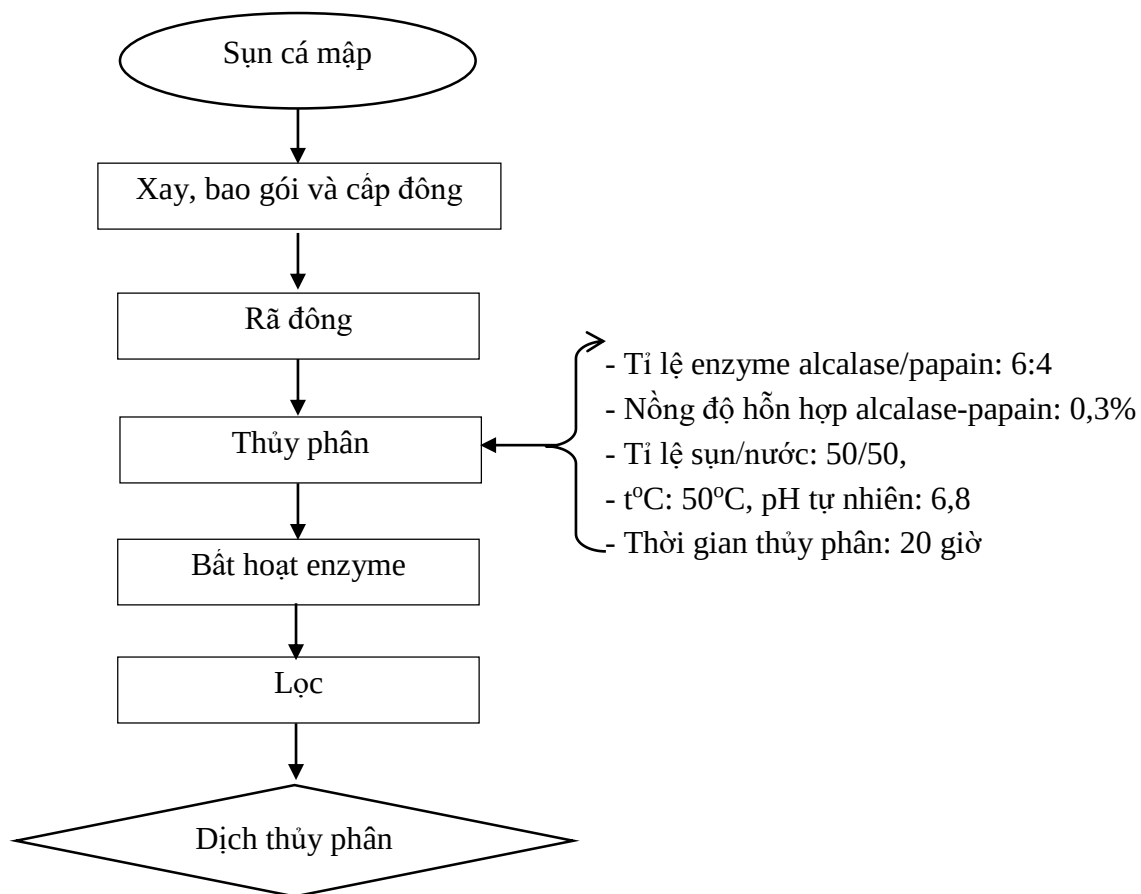
Với điều kiện tối ưu này thì mục tiêu về hiệu suất thủy phân tạo chondroitin sulfate đạt 96,97% cao hơn so với mục tiêu mong muốn từ mô hình là 94,53% (hình 3.41).

*** Thí nghiệm kiểm chứng**

Tiến hành thí nghiệm kiểm chứng thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain theo các thông số tối ưu đã tìm được: nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain là 0,3%, nhiệt độ thủy phân là 50°C , thời gian thủy phân là 20 giờ. Thí nghiệm được tiến hành 3 lần cho kết quả hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate thực tế đạt $96,97 \pm 1\%$ và dịch thủy phân thu được có hàm lượng nitơ tổng và hàm lượng chondroitin sulfate đạt tương ứng là 7,46 g/lít và 40,5 mg/ml. Kết quả của thí nghiệm kiểm chứng một lần nữa khẳng định mô hình đã xây dựng phù hợp với thực tế.

3.1.10. Đề xuất quy trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase papain

Từ các nghiên cứu ở trên, cho phép đề xuất quy trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain trình bày ở hình 3.42.



Hình 3.42. Sơ đồ quy trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase -papain

*** Thuyết minh quy trình**

+ **Sụn cá mập:** Cá mập được thu mua nguyên con tại cảng cá Vĩnh Lương - Nha Trang - 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 và làm sạch để thu sụn cá mập.

+ **Xay, bao gói và cấp đông:** tiến hành xay nhỏ sụn cá mập bằng máy xay thịt nhằm đồng nhất mẫu và bao gói bằng bao bì PA 2kg/túi, hút chân không 100%, cấp đông và bảo quản đông ở -20°C để dùng trong suốt quá trình nghiên cứu.

Hỗn hợp sụn cá mập có thành phần: Hàm lượng chondroitin sulfate: 41,77±0,21mg/g, hàm lượng tro tổng số: 4,2±0,11g/100g, hàm lượng nitơ tổng số: 2,64±0,02g/100g, độ ẩm 80,7±1,12%.

+ **Rã đông:** Trước khi thủy phân tiến hành rã đông nhanh trong thời gian 2 phút

trong lò vi sóng.

+ **Thủy phân:** Tiến hành thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain trong bể thủy phân theo các thông số kỹ thuật sau: Tỷ lệ enzyme alcalase/papain là 6:4; Nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain là 0,3%, tỉ lệ sụn/nước là 50/50, nhiệt độ thủy phân 50°C, thủy phân ở pH tự nhiên (6,8) trong thời gian 20 giờ.

+ **Bất hoạt enzyme:** Kết thúc quá trình thủy phân, tiến hành bất hoạt enzyme bằng cách đun sôi dịch thủy phân trong thời gian 10 phút.

+ **Lọc:** tiến hành lọc sơ bộ hỗn hợp thủy phân qua 2 lớp vải lọc để thu dịch lọc thô. Sau đó, tiếp tục lọc dịch lọc thô qua hệ thống lọc hút chân không với kích cỡ lỗ sứ cho phép các chất đi qua có kích cỡ nhỏ hơn 5µm để thu dịch lọc trong. Dịch lọc được đun sôi trong thời gian 10 phút và bảo quản ở ngăn mát tủ lạnh ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) để dùng cho quá trình phân tích và nghiên cứu sấy phun (hình 3.43).



Hình 3.43. Hình ảnh về dịch thủy phân sụn cá mập

3.2. ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG DỊCH THỦY PHÂN SỤN CÁ MẬP BẰNG HỖN HỢP ENZYME ALCALASE - PAPAIN VÀ PHÂN TÍCH CẤU TRÚC CỦA CHONDROITIN SULFATE

3.2.1. Đánh giá chất lượng dịch thủy phân sụn cá mập

Tiến hành sản xuất thử dịch thủy phân từ sụn cá mập theo quy trình thủy phân đã đề xuất ở trên và lấy mẫu đánh giá chất lượng của dịch thủy phân sụn cá mập. Kết quả đánh giá thành phần hóa học, năng lượng của dịch thủy phân tại Viện Pasteur Nha Trang và Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc gia - Bộ Y tế được trình bày ở bảng 3.4 và kết quả đánh giá cảm quan và vi sinh vật được trình bày ở các bảng 3.5 và 3.6.

Bảng 3.4. Thành phần hóa học và năng lượng của dịch thủy phân sụn cá mập

STT	Chỉ tiêu hóa học	Đơn vị	Kết quả
1	Hàm lượng nitơ tổng số	g/lít	7,46
2	Năng lượng dinh dưỡng	Kcal/100ml	20,42
3	Hàm lượng khoáng tổng số	g/lít	3,02
4	Hàm lượng Magie	mg/lít	205,49
5	Hàm lượng kẽm	mg/lít	7,63
6	Hàm lượng sắt	mg/lít	4,78
7	Hàm lượng Thủy ngân	mg/lít	Không phát hiện
8	Hàm lượng Arsen	mg/lít	Không phát hiện
9	Hàm lượng protein thô	g/lít	46,63
10	Hàm lượng Alanine	g/lít	2,617
11	Hàm lượng Arginine	g/lít	7,921
12	Hàm lượng Aspartic	g/lít	2,164
13	Hàm lượng Cysteine	g/lít	0,254
14	Hàm lượng Cystine	g/lít	0,469
15	Hàm lượng Glutamic	g/lít	3,102
16	Hàm lượng Glycine	g/lít	5,202
17	Hàm lượng Histidine	g/lít	0,221
18	Hàm lượng Isoleucine	g/lít	0,415
19	Hàm lượng Leucine	g/lít	3,680
20	Hàm lượng Lysine	g/lít	1,043
21	Hàm lượng Methionine	g/lít	0,994
22	Hàm lượng Phenylalanine	g/lít	0,653
23	Hàm lượng Tryptophane	g/lít	0,129
24	Hàm lượng Serine	g/lít	0,836
25	Hàm lượng Threonine	g/lít	1,009
26	Hàm lượng Tyrosine	g/lít	0,047
27	Hàm lượng Valine	g/lít	0,812
28	Hàm lượng chondroitin sulfate	mg/ml	40,50

Bảng 3.5. Trạng thái cảm quan của dịch thủy phân

STT	Chỉ tiêu	Kết quả
1	Trạng thái	Dịch lỏng, sánh
2	Màu sắc	Màu hơi vàng
3	Mùi vị	Đặc trưng của dịch thủy phân

Bảng 3.6. Kết quả phân tích một số chỉ tiêu vi sinh của dịch thủy phân sụn cá mập

STT	Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả	Quy định QCVN 4 - 16: 2010/BYT
1	Tổng số VSV hiếu khí	CFU/g	8	< 5000
2	<i>Salmonella</i>	CFU/g	Neg	Âm tính
3	<i>Coliforms</i>	CFU/g	Neg	Âm tính
4	Tổng số bào tử nấm men, nấm mốc	CFU/g	Neg	< 500

(Neg: không phát hiện)

Từ các kết quả phân tích ở các bảng 3.4 ÷ 3.6 cho thấy:

*** Về thành phần hóa học và năng lượng của dịch thủy phân sụn cá mập:**

Kết quả phân tích ở bảng 3.4 cho thấy dịch thủy phân sụn cá mập rất giàu năng lượng 20,42 Kcal/100ml, giàu khoáng chất, đặc biệt giàu Magie: 205,49 mg/l và kẽm 7,63mg/lít - đây là những khoáng chất rất cần cho sức khỏe của con người. Ngoài ra dịch thủy phân sụn cá mập chứa 18 acid amin thiết yếu đối với con người và đặc biệt là có hàm lượng chondroitin sulfate tới 40,5mg/ml - đây là thành phần rất cần thiết cho việc tái tạo mô sụn, chống lão hóa sụn khớp ở con người.

*** Về chất lượng cảm quan:**

Kết quả đánh giá ở bảng 3.5 cho thấy sản phẩm dịch thủy phân sụn cá mập ở dạng lỏng, sánh và có màu vàng nhạt, mùi vị đặc trưng cho sụn cá mập.

*** Về chỉ tiêu vi sinh vật:**

Kết quả phân tích vi sinh ở bảng 3.6 cho thấy dịch thủy phân sụn cá mập đạt yêu cầu về các chỉ tiêu vi sinh vật theo quy định của Bộ Y tế.

Từ những phân tích trên cho thấy dịch thủy phân sụn cá mập được sản xuất theo

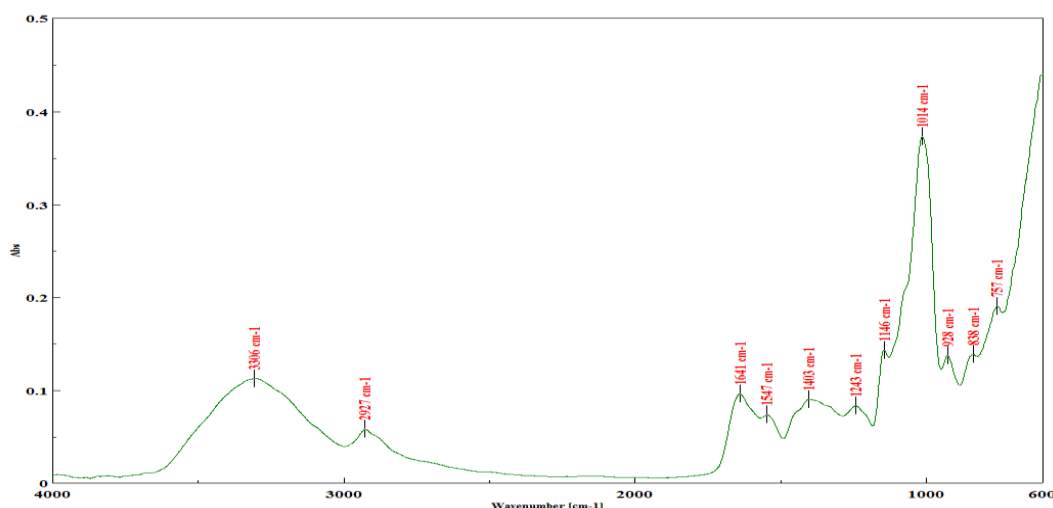
quy trình của luận án có chất lượng tốt và đạt các yêu cầu vi sinh vật theo Quy định hiện hành của Bộ Y Tế. Như vậy, dịch thủy phân sụn cá mập đã sản xuất đạt tiêu chuẩn chất lượng để dùng trong thực phẩm và định hướng làm thực phẩm chức năng.

3.2.2. Phân tích cấu trúc chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân sụn cá mập

Tiến hành kết tủa chondroitin sulfate có trong sụn cá mập bằng ethanol ở nồng độ 80%. Sau đó tinh sạch chondroitin sulfate qua hệ thống sắc kí trao đổi ion DEAE-cellulose, sắc ký lọc gel sephadex G25 và tiến hành phân tích cấu trúc của chondroitin sulfate.

* Dự đoán nhóm chức trong cấu trúc của chondroitin sulfate bằng phổ FT-IR

Kết quả phân tích nhằm dự đoán nhóm chức trong cấu trúc của chondroitin sulfate của dịch thủy phân sụn cá mập dựa vào phân tích phổ FT-IR tại Trung tâm Công nghệ Bức xạ - Viện Hạt nhân Đà Lạt được trình bày ở hình 3.44.

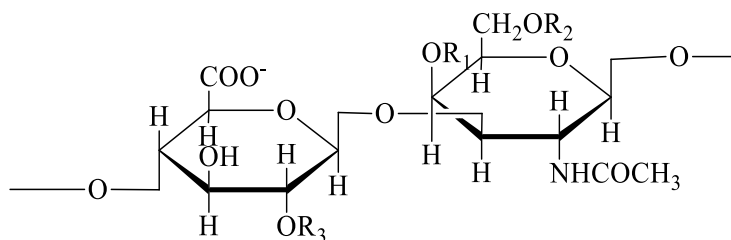


Hình 3.44. Kết quả xác định các nhóm chức của chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân sụn cá mập dựa vào phổ FT-IR

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.44 cho thấy phổ FT-IR của chondroitin sulfate thể hiện các đỉnh đặc trưng của dao động -CONH liên kết với nhóm C-O, dao động của nhóm S=O, -C-O-S, -COO; C-C, C-O-S và R-SO₂-R. Kết quả đo phổ FT-IR cho thấy phổ hồng ngoại của chondroitin sulfate có đỉnh hấp thụ nằm trong vùng 3306 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động hoá trị của nhóm -OH liên hợp, đỉnh hấp thụ ở 2927 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động hoá trị bất đối xứng và đối xứng của nhóm -CH, đỉnh hấp thụ ở 1641 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động biến dạng của của amin bậc một và dao động liên kết của nhóm -CONH với dao động bất đối xứng của nhóm C-O, đỉnh hấp thụ ở 1547, 1403 lần lượt

tương ứng với dao động hóa trị của nhóm $\text{C}=\text{O}$ và dao động của nhóm OH . Ngoài ra, còn xuất hiện đỉnh hấp thụ ở vùng dao động bất đối xứng có dải hấp thụ tại 1243cm^{-1} ($\text{S}=\text{O}$) là đặc trưng cho các sulfate este. Đỉnh hấp thụ ở 838 cm^{-1} cho thấy dao động đối xứng của nhóm C-O-S tại vị trí C4 axial của vòng fucopyranose (4-O-sulfated Fuc hoặc 4-O-sulfatedGalNAc).

Kết quả dự đoán nhóm chức của chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân sụn cá mập dựa vào phổ FT-IR thu được như sau:



Hình 3.45. Dự đoán nhóm chức trong cấu trúc chondroitin sulfate từ sụn cá mập

D - glucuronic acid (GlcA) N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc)

$\text{R}_1 = \text{SO}_3^-$, $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$: Chondroitin - 4 - sulfate (CSA)

$\text{R}_2 = \text{SO}_3^-$, $\text{R}_1 = \text{R}_3 = \text{H}$: Chondroitin - 6 - sulfate (CSC)

Acetyl-D-galactosamine (GalNAc) qua liên kết glucosid (1-3). Gốc D - glucuronic acid (GlcA) có thể bị epime hóa thành L-iduronic (IdoA). Mỗi gốc đường có thể không bị sulfate hóa hoặc bị sulphate hóa 1 hoặc 2 gốc sulphate trên một gốc đường.

Chondroitin sulfate từ các nguồn nguyên liệu khác nhau rất đa dạng về cấu trúc và kích thước, chúng chứa ở mức độ nhiều hay ít một số lượng các isome của chondroitin sulfate, có tới 16 isome chondroitin sulfate, phụ thuộc vào vị trí sulphat hóa của các gốc đường đơn. Chondroitin sulfate thu nhận từ sụn cá mập thường chủ yếu ở hai dạng: chondroitin - 4 - sulfate (CSA) (GlcA-GalNAc-4S) và chondroitin - 6 -sulfate (CSC) (GlcA-GalNAc-6S) chiếm tỉ lệ 16% và 84%.

Tiến hành phân tích cấu trúc của chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân sụn cá mập bằng các phương pháp phổ ^1H -NMR và ^{13}C - NMR một chiều (1D), các phương pháp phổ hai chiều (2D) như: HSQC, HMBC, COSY tại Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Kết quả phân tích cho thấy các tín hiệu đặc trưng và rõ ràng để chứng minh là chondroitin sulfate với các mảnh cấu trúc đặc trưng:



Điều này một lần nữa chứng tỏ chondroitin sulfate bị sulphate hóa ở các vị trí 4, 6 không đồng đều, dẫn tới cấu trúc phức tạp.

Để chứng minh công thức cấu tạo của chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân từ sụn cá mập, chúng ta ký hiệu nhóm Hydrogen là H, nhóm Carbon là C, nhóm D - glucuronic acid (GlcA) là U, nhóm GlcA là U', nhóm N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc)-6S là G và nhóm GalNAc-4S là G', được thể hiện thông qua các kết quả phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều $^1\text{H-NMR}$ (phổ proton), phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (phổ có từ 2 proton), phổ COSY, phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều HSQC, phổ HMBC (phổ liên kết dị nhân: tức có từ 2-3 proton liên kết với nhau), như sau:

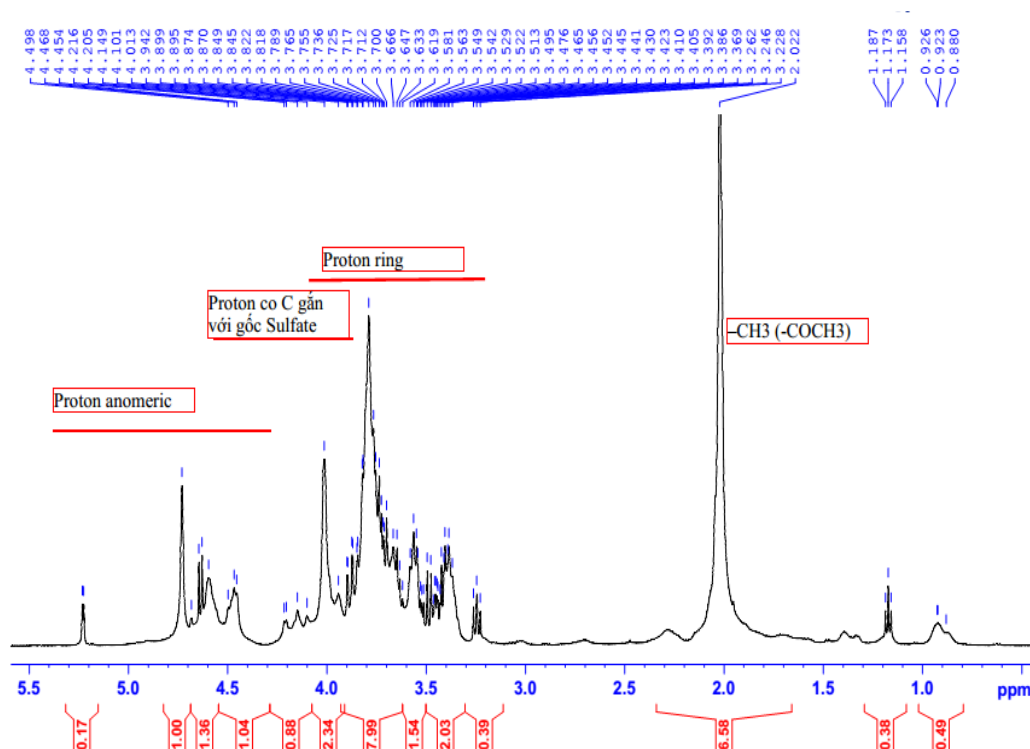
+ PHÂN TÍCH CẤU TRÚC CHONDROITIN SULFATE BẰNG PHỔ $^1\text{H-NMR}$

Phổ proton ($^1\text{H-NMR}$ hay proton NMR) cho biết môi trường hoá học của proton trong phân tử. Các proton có môi trường hoá học khác nhau sẽ có chuyển dịch hoá học khác nhau.

Phổ proton của 1 proton hay 1 nhóm proton có cùng môi trường hoá học (như 3 proton của nhóm CH_3) thể hiện trên phổ có thể là 1 đỉnh. Đỉnh này có thể là đỉnh đơn, đôi, ba ... tới 7 đỉnh thành phần (đỉnh 7). Diện tích của mỗi đỉnh tỉ lệ với số lượng proton của đỉnh. Dựa vào diện tích đỉnh có thể biết số proton của đỉnh đó. Một thông số quan trọng khác của phổ proton là hằng số ghép (J) tính bằng Hz, cho biết tương tác của proton với các proton kế cận.

Căn cứ vào giá trị CS, dạng vạch bội và giá trị tích phân cũng dễ dàng xác định 02 tín hiệu vùng khử che chắn ở phía trường thấp là H1 (S, che chắn rất mạnh do liên với 2O) và H5 (dq, che chắn mạnh do kề với C=O). Có thể gán cặp tín hiệu của 02 proton không tương đương của cùng một gốc CH_2 .

Kết quả phân tích cấu trúc chondroitin sulfate bằng phổ $^1\text{H-NMR}$ (phổ proton) được thể hiện trên hình 3.46 và 3.47.

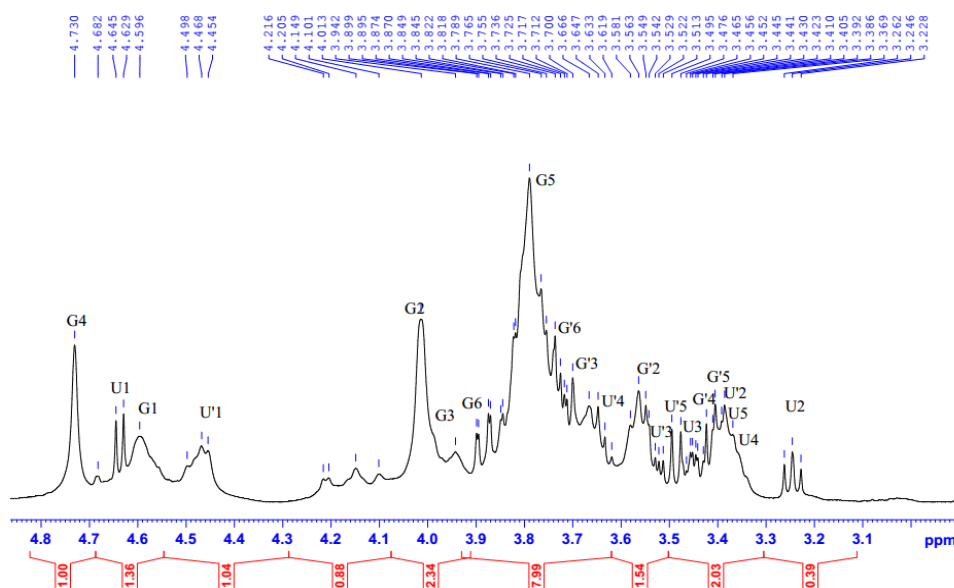


Hình 3.46. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate thu được bằng phổ ^1H -NMR với độ dịch chuyển hóa học proton từ 0ppm ÷ 5,5ppm

Kết quả phân tích mảnh cấu trúc chondroitin sulfate trên hình 3.46 kết hợp với các phổ khác cho thấy rất rõ tín hiệu của proton nhóm $-\text{CH}_3$ ($-\text{COCH}_3$) ở 2,02ppm thể hiện trên đỉnh pick cao và rõ nhất với độ dịch chuyển hóa học của nhóm CH_3 ($-\text{COCH}_3$) nằm trong khoảng từ 1,8ppm ÷ 2,2ppm. Độ dịch chuyển hóa học của các tín hiệu α -anomeric GalNAc và β -anomeric GalNAc thể hiện không rõ nét, có đặc thù chồng lấn lên nhau, nằm trong khoảng từ 4,4ppm ÷ 5,5ppm. Điều này chứng tỏ các proton của nhóm H này có thể liên kết đa chiều với proton C của nhóm khác. Các tín hiệu của proton mạch vòng, tức là proton mạch vòng có gốc Carbon (C) gần với gốc sulfate có độ dịch chuyển hóa học trong khoảng từ 3,2ppm ÷ 4,4ppm.

Căn cứ vào giá trị CS, dạng vạch bội và giá trị tích phân, có thể thấy dễ dàng gán được 03 tín hiệu của 03 nhóm CH_3 , trong đó có 01 tín hiệu vạch đơn (s) của H5 và hai tín hiệu vạch kép (d) của H3 và H4.

Các tín hiệu vùng 3,2÷4,8ppm bị chồng chập mạnh, khó gán theo phổ ^1H -NMR. Đây là vùng tín hiệu của chondroitin sulfate mạch vòng. Để gán được các vị trí này, cần kết hợp với phân tích phổ 2D-NMR dưới đây:



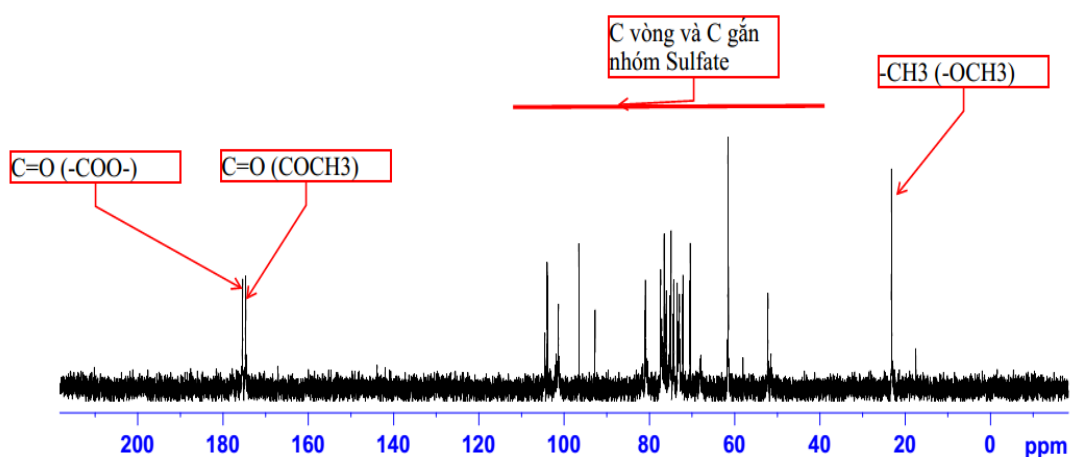
Hình 3.47. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate thu được bằng phổ ^1H -NMR với độ dịch chuyển hóa học proton từ 2,9ppm ÷ 4,9ppm

Kết quả phân tích mảnh cấu trúc chondroitin sulfate ở hình 3.47 kết hợp với các phổ khác cho thấy có 20 pick, tức là có 20 tín hiệu. Cụ thể, tín hiệu của U2 hay còn gọi là độ dịch chuyển hóa học của nhóm U2 nằm trong khoảng 3,23 ÷ 3,28ppm. Tương tự, thấy rõ tín hiệu trên phổ ^1H -NMR hay còn gọi là độ dịch chuyển hóa học của các nhóm khác nằm trong các khoảng giá trị như sau: nhóm U1 = 4,63 ÷ 4,67ppm, U3 = 3,42 ÷ 3,47ppm, U4 = 3,34 ÷ 3,36ppm, U5 = 3,36 ÷ 3,37ppm, U'5 = 3,47 ÷ 3,51ppm, U'4 = 3,62 ÷ 3,68ppm, U'3 = 3,51 ÷ 3,55ppm, U'2 = 3,38 ÷ 3,39ppm, U'1 = 4,44 ÷ 4,46ppm, G'6 = 3,74 ÷ 3,75ppm, G'5 = 3,39 ÷ 3,41ppm, G'4 = 3,41 ÷ 3,42ppm, G'3 = 3,68 ÷ 3,71ppm, G'2 = 3,55 ÷ 3,58ppm, G6 = 3,84 ÷ 3,91ppm, G5 = 3,78 ÷ 3,82ppm, G4 = 4,71 ÷ 4,77ppm, G3 = 3,91 ÷ 3,97ppm, G2 = 3,98 ÷ 4,06ppm, G1 = 4,57 ÷ 4,62ppm.

Qua phân tích trên, chứng tỏ chondroitin sulfate bị sulphate hóa ở các vị trí không đồng đều, dẫn tới cấu trúc phức tạp.

+ PHÂN TÍCH CẤU TRÚC CHONDROITIN SULFATE BẰNG PHỔ ^{13}C -NMR (phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều)

Kết quả phân tích cấu trúc chondroitin sulfate bằng phổ ^{13}C -NMR. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon ^{13}C -NMR của chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập cho biết độ dịch chuyển hóa học của nguyên tử hydro (H) và carbon (C) được trình bày trên hình 3.48, 3.49 và 3.50 như sau:

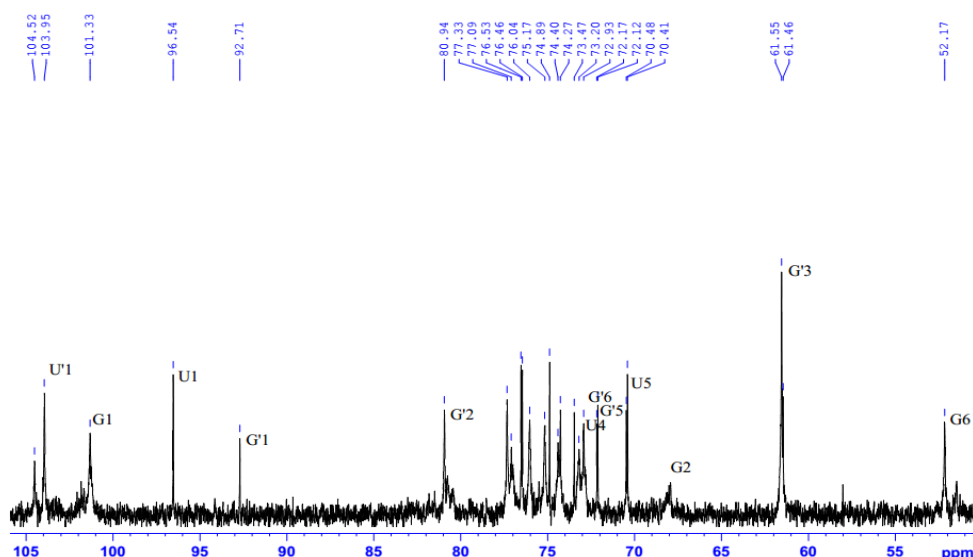


Hình 3.48. Phổ ^{13}C -NMR của chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân từ sụn cá mập

Kết quả phân tích trên hình 3.48 kết hợp với các phổ khác cho thấy rất rõ tín hiệu của proton nhóm carbon $-\text{CH}_3$ ($-\text{COCH}_3$) là 23,18ppm, tín hiệu của nhóm $\text{C}=\text{O}$ (COCH_3) là 174,72ppm, tín hiệu của nhóm $\text{C}=\text{O}$ ($-\text{COO}-$) là 175,42ppm và tín hiệu thể hiện độ dịch chuyển hóa học của nhóm Carbon mạch vòng và Carbon có gắn nhóm sulphate nằm trong khoảng từ 52ppm ÷ 105ppm.

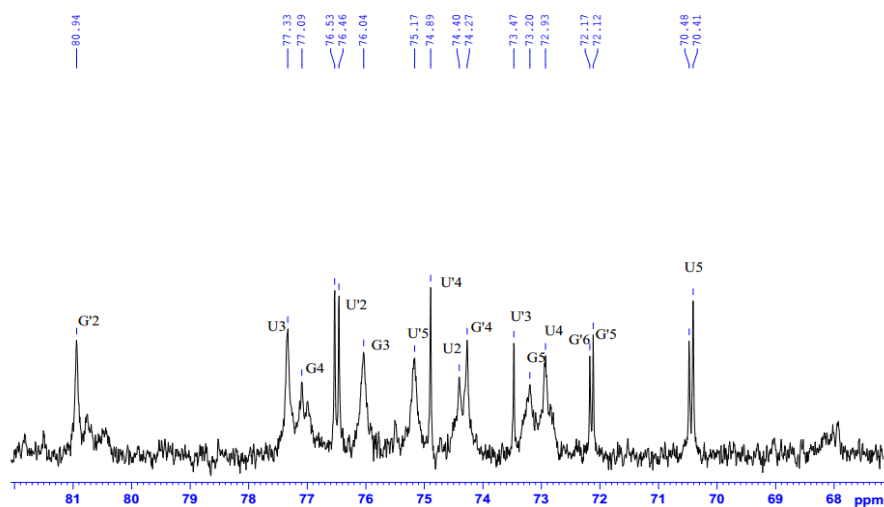
Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon-13 (^{13}C -NMR) cung cấp thông tin về độ dịch chuyển hoá học của carbon. Carbon lai hoá SP^3 không liên kết với dị tố chuyển dịch trong khoảng 0 ÷ 60 ppm. Carbon liên kết đơn với oxy (alcol, ether) chuyển dịch trong khoảng 55 ÷ 105 ppm. Carbon lai hoá SP^2 chuyển dịch trong khoảng 105 ÷ 150 ppm; nếu có liên kết (đôi) với oxy có thể chuyển dịch tới 240 ppm. Với kỹ thuật đo phổ hiện tại, phổ NMR của carbon là những vạch đơn, mỗi vạch ứng với một carbon (hơn 1 carbon nếu chúng có chung môi trường hoá học) của phân tử.

Kết quả phân tích ở hình 3.49 cho thấy có 15 peak ứng với 15 liên kết của proton carbon liên kết với proton hydro ở trường thấp. Kết hợp với các phổ khác cho thấy tín hiệu của G6 hay còn gọi là độ dịch chuyển hóa học của nhóm G6 nằm trong khoảng 56,8 ÷ 57,8ppm. Tương tự, thấy tín hiệu rõ nhất trên phổ ^{13}C -NMR hay còn gọi là độ dịch chuyển hóa học của các nhóm khác nằm trong các khoảng giá trị như sau: nhóm $\text{G}'6 = 72,4 \div 73,5\text{ppm}$, $\text{G}'5 = 71,8 \div 72,3\text{ppm}$, $\text{G}'3 = 61,2 \div 62,3\text{ppm}$, $\text{G}'2 = 80,2 \div 81,3\text{ppm}$, $\text{G}'1 = 92,7 \div 92,9\text{ppm}$, $\text{G}2 = 67,5 \div 68,7\text{ppm}$, $\text{G}1 = 101,2 \div 102,3\text{ppm}$, $\text{U}5 = 70,2 \div 70,8\text{ppm}$, $\text{U}4 = 73,6 \div 77,8\text{ppm}$, $\text{U}1 = 96,2 \div 97,0\text{ppm}$, $\text{U}'1 = 103,7 \div 104,8\text{ppm}$.



Hình 3.49. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate thu được bằng phổ ^{13}C -NMR với độ dịch chuyển hóa học proton từ 50ppm ÷ 105ppm

Kết quả phân tích chondroitin sulfate bằng phổ ^{13}C -NMR ở hình 3.50 kết hợp với các phổ khác cho thấy có 14 pick cao và rõ nhất, điều này cho thấy rõ nhất tín hiệu của U5 hay còn gọi là độ dịch chuyển hóa học của nhóm U5 nằm trong khoảng $70,2 \div 70,7\text{ppm}$. Tương tự, thấy tín hiệu rõ nhất trên phổ ^{13}C -NMR hay còn gọi là độ dịch chuyển hóa học của các nhóm khác nằm trong các khoảng giá trị như sau: nhóm G'5 = $72,1 \div 72,2\text{ppm}$, G'6 = $72,2 \div 72,9\text{ppm}$, U4 = $72,8 \div 73,1\text{ppm}$, G5 = $73,2 \div 73,3\text{ppm}$, U'3 = $73,4 \div 73,6\text{ppm}$, G'4 = $74,2 \div 74,4\text{ppm}$, U2 = $74,4 \div 74,7\text{ppm}$, U'4 = $74,8 \div 75,1\text{ppm}$, U'5 = $75,2 \div 75,4\text{ppm}$, G3 = $75,8 \div 76,3\text{ppm}$, U'2 = $76,4 \div 76,6\text{ppm}$, G4 = $76,8 \div 77,2\text{ppm}$, U3 = $77,2 \div 77,6\text{ppm}$, G2 = $80,7 \div 81,1\text{ppm}$.



Hình 3.50. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate thu được bằng phổ ^{13}C -NMR với độ dịch chuyển hóa học proton từ 67ppm ÷ 82ppm

Qua phân tích kết quả phổ ^{13}C -NMR, cho thấy chondroitin sulfate bị sulphate hóa ở các vị trí không đồng đều và có cấu trúc phức tạp.

+ PHÂN TÍCH CẤU TRÚC CHONDROITIN SULFATE BẰNG PHỔ HSQC

Phổ HSQC là kỹ thuật phổ hai chiều 2D còn cho thêm các thông tin về tương tác giữa C và H gắn trực tiếp trên nó, cho ta thông tin về các liên kết trực tiếp 1JCH. Việc phân tích phổ HSQC sẽ rất dễ dàng và quan trọng khi đã gán được tốt phổ ^1H -NMR và phổ COSY.

Phổ Dept-HSQC cho thông tin về liên kết trực tiếp 1JCH và phân biệt CH_2 với CH và CH_3 . Trên phổ dễ dàng gán 04 cặp tín hiệu CH_2 bất đối xứng.

Bảng phổ HSQC kết hợp với các phổ khác cho thấy các tín hiệu của proton ^1H và ^{13}C của mạch chondroitin sulfate được gán kết theo bảng sau:

Bảng 3.7. Bảng gán các tín hiệu dị nhân proton H/C trên phổ HSQC

H/C	GlcA (U)		GlcA (U')		GalNAc-6S (G)		GalNAc-4S (G')	
H1/C1	4,63/96,54	U1	4,46/103,95	U'1	4,59/101,33	G1	5,23/92,71	G'1
H2/C2	3,24/74,40	U2	3,41/76,46	U'2	4,01/68,23	G2	3,78/80,94	G'2
H3/C3	3,45/77,33	U3	3,65/77,33	U'3	3,94/76,04	G3	3,78/61,45	G'3
H4/C4	3,38/72,93	U4	3,89/74,89	U'4	4,73/77,09	G4	3,61/74,27	G'4
H5/C5	3,39/70,41	U5	3,71/75,17	U'5	3,78/73,20	G5	3,56/72,12	G'5
H6/C6					4,01/52,17	G6	3,87/72,17	G'6
H/CH₃					2,02/23,18	G7	2,02/23,18	G'7

Từ kết quả ở bảng 3.7 cho thấy:

• Đối với nhóm GlcA (U)

Tín hiệu thấy rõ nhất của Hydro (H) và Carbon (C) hay độ dịch chuyển proton rõ nhất của H và C của nhóm GlcA (U1) ký hiệu là U1 lần lượt tương ứng là 4,63ppm và 96,54ppm. Tương tự, tín hiệu rõ nhất hay độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GlcA (U2) ký hiệu là U2 lần lượt là 3,24ppm và 74,40ppm. Độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GlcA (U3) ký hiệu là U3 lần lượt là 3,45ppm và 77,33ppm. Tín hiệu rõ nhất hay độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GlcA (U4) ký hiệu là U4 lần

lượt là 3,38ppm và 72,93ppm. Tín hiệu rõ nhất hay độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GlcA (U5) ký hiệu là U5 lần lượt là 3,39ppm và 70,41ppm. Còn các tín hiệu của nhóm H, C và CH₃ của các nhóm khác còn lại không nhận rõ hoặc mờ nhạt.

• **Đối với nhóm GlcA (U')**

Tín hiệu thấy rõ nhất của Hydro (H) hay độ dịch chuyển proton rõ nhất của H trong nhóm GlcA (U') lần lượt tương ứng là H'1 = 4,46ppm, H'2 = 3,41ppm, H'3 = 3,65ppm, H'4 = 3,89ppm, H'5 = 3,71ppm. Tín hiệu thấy rõ nhất của Carbon (C) hay độ dịch chuyển proton rõ nhất của C của nhóm GlcA (U') lần lượt tương ứng là và C'1 = 103,95ppm, C'2 = 76,46ppm, C'3 = 77,33ppm, C'4 = 74,89ppm, C'5 = 75,17ppm. Còn các tín hiệu của nhóm H, C và CH₃ của các nhóm khác còn lại trong mẫu không nhận rõ hoặc mờ nhạt.

• **Đối với nhóm GalNAc-6S (G)**

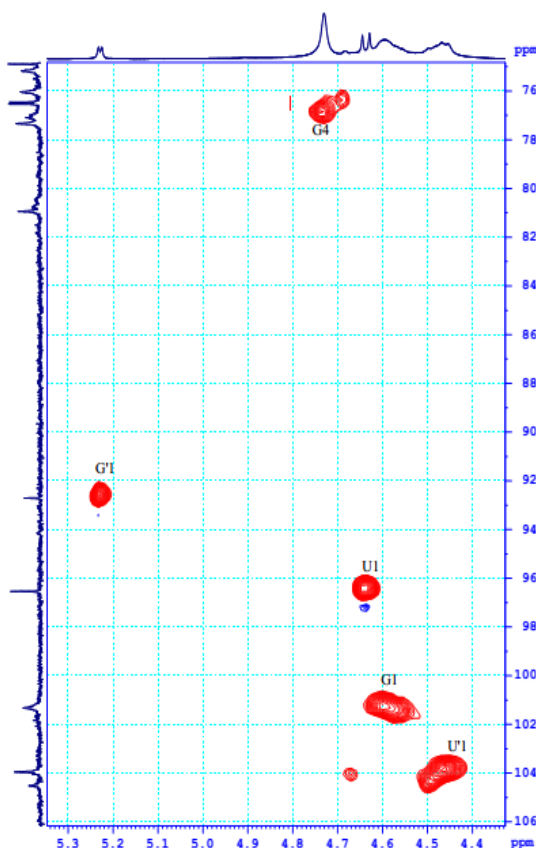
Tín hiệu thấy rõ nhất của Hydro (H) và Carbon (C) hay độ dịch chuyển proton rõ nhất của H và C của nhóm GalNAc-6S (G1) ký hiệu là G1 lần lượt tương ứng là 4,59ppm và 101,33ppm. Tương tự, tín hiệu rõ nhất hay độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GalNAc-6S (G2) ký hiệu là G2 lần lượt là 4,01ppm và 68,23ppm. Độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GalNAc-6S (G3) ký hiệu là G3 lần lượt là 3,94ppm và 76,04ppm. Tín hiệu rõ nhất hay độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GalNAc-6S (G4) ký hiệu là G4 lần lượt là 4,73ppm và 77,09ppm. Tín hiệu rõ nhất hay độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GalNAc-6S (G5) ký hiệu là G5 lần lượt là 3,78ppm và 73,20ppm. Tín hiệu rõ nhất hay độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GalNAc-6S (G6) ký hiệu là G6 lần lượt là 4,01ppm và 52,17ppm. Tín hiệu rõ nhất hay độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GalNAc-6S (G7) ký hiệu là G7 lần lượt là 2,02ppm và 23,18ppm.

• **Đối với nhóm GalNAc-4S (G')**

Tín hiệu thấy rõ nhất của Hydro (H) và Carbon (C) hay độ dịch chuyển proton rõ nhất của H và C của nhóm GalNAc-4S (G'1) ký hiệu là G'1 lần lượt tương ứng là 5,23ppm và 92,71ppm. Tương tự, tín hiệu rõ nhất hay độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GalNAc-4S (G'2) ký hiệu là G'2 lần lượt là 3,78ppm và 80,94ppm. Độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GalNAc-4S (G'3) ký hiệu là G'3 lần lượt là

3,78ppm và 61,45ppm. Tín hiệu rõ nhất hay độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GalNAc-4S (G'4) ký hiệu là G'4 lần lượt là 3,61ppm và 74,27ppm. Tín hiệu rõ nhất hay độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GalNAc-4S (G5) ký hiệu là G'5 lần lượt là 3,56ppm và 72,12ppm. Tín hiệu rõ nhất hay độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GalNAc-4S (G'6) ký hiệu là G'6 lần lượt là 3,87ppm và 72,17ppm. Tín hiệu rõ nhất hay độ dịch chuyển proton của H và C của nhóm GalNAc-4S (G'7) ký hiệu là G'7 lần lượt là 2,02ppm và 23,18ppm.

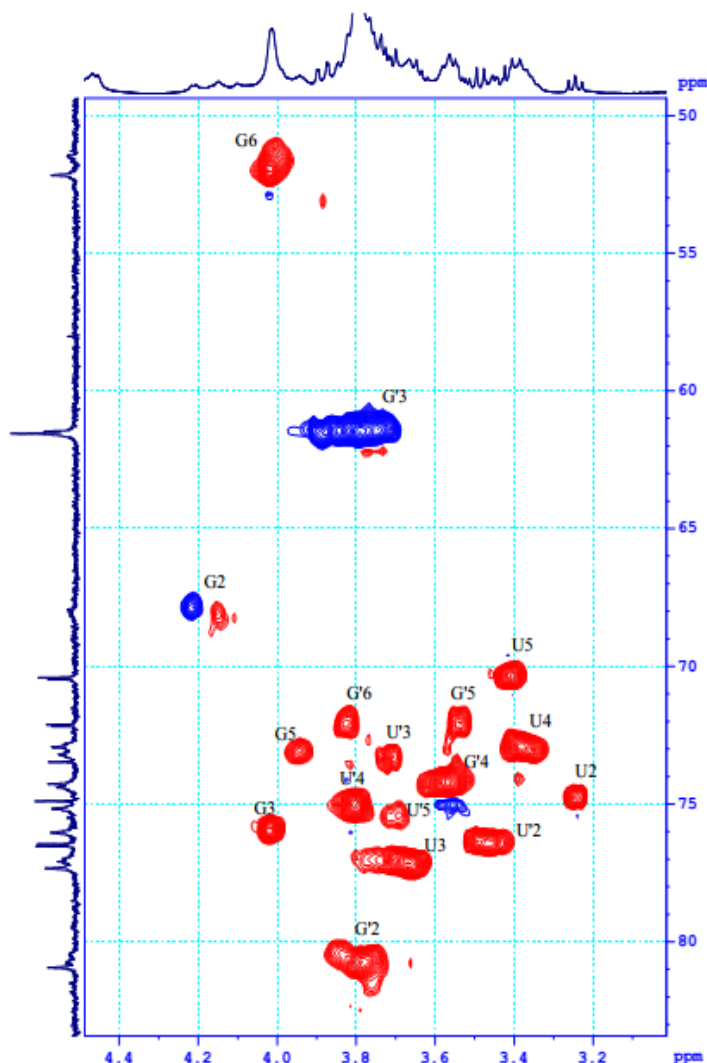
+ Phân tích cấu trúc chondroitin sulfate bằng phổ HSQC:



Hình 3.51. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HSQC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 4.3 ÷ 5.3ppm và C từ 76 ÷ 106ppm

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.51 cho thấy: tín hiệu rõ nhất là tại vị trí G4 tương ứng với proton của H và C trong nhóm GalNAc -6S (G4) có độ dịch chuyển hóa học với giá trị là 4,73ppm và 77,09ppm. Tại điểm GalNAc -4S (G'1) tương ứng với proton của H và C trong nhóm G'1 có độ dịch chuyển hóa học với giá trị là 5,23ppm và 92,71ppm. Tại điểm GlcA -4S (U1) với proton của H và C trong nhóm U1 có độ dịch

chuyển hóa học tương ứng với giá trị là 4,63ppm và 96,54ppm. Tại điểm GlcA -4S (U'1) với proton của H và C trong nhóm U'1 có độ dịch chuyển hóa học tương ứng với giá trị là 4,46ppm và 103,95ppm. Cuối cùng, tín hiệu rõ nhất là tại vị trí G1 tương ứng với proton của H và C trong nhóm GalNAc -6S (G1) có độ dịch chuyển hóa học với giá trị là 4,59ppm và 101,33ppm.



Hình 3.52. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HSQC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 3,1 ÷ 4,5ppm và C từ 50 ÷ 85ppm

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.52 cho thấy tín hiệu rõ nhất là tại vị trí G6 tương ứng với proton của H và C trong nhóm GalNAc -6S (G6) có độ dịch chuyển hóa học với giá trị là 4,01ppm và 52,17ppm. Tại vị trí G5 tương ứng với proton của H và C trong nhóm GalNAc -6S (G5) có độ dịch chuyển hóa học với giá trị là 3,78ppm và 73,20ppm. Tại vị trí G3 tương ứng với proton của H và C trong nhóm GalNAc -6S (G3)

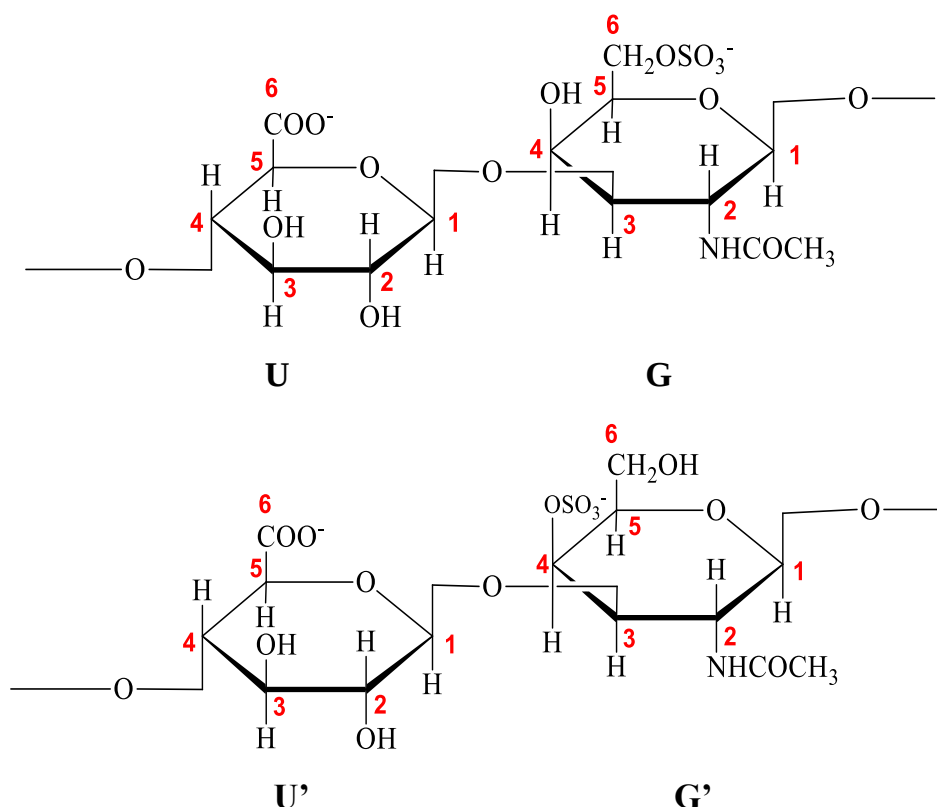
có độ dịch chuyển hóa học với giá trị là 3,94ppm và 76,04ppm. Tại vị trí G2 tương ứng với proton của H và C trong nhóm GalNAc -6S (G2) có độ dịch chuyển hóa học với giá trị là 4,01ppm và 68,23ppm. Tại vị trí G1 tương ứng với proton của H và C trong nhóm GalNAc -6S (G1) có độ dịch chuyển hóa học với giá trị là 4,59ppm và 101,33ppm.

Tại điểm GalNAc -4S (G'3) tương ứng với proton của H và C trong nhóm G'3 có độ dịch chuyển hóa học với giá trị là 3,78ppm và 61,45ppm. Tại điểm GalNAc -4S (G'4) tương ứng với proton của H và C trong nhóm G'3 có độ dịch chuyển hóa học với giá trị là 3,61ppm và 74,27ppm. Tại điểm GalNAc -4S (G'5) tương ứng với proton của H và C trong nhóm G'5 có độ dịch chuyển hóa học với giá trị là 3,56ppm và 72,12ppm. Tại điểm GalNAc -4S (G'6) tương ứng với proton của H và C trong nhóm G'6 có độ dịch chuyển hóa học với giá trị là 3,87ppm và 72,12ppm.

Tại điểm GlcA -4S (U2) với proton của H và C trong nhóm U2 có độ dịch chuyển hóa học tương ứng với giá trị là 3,24ppm và 74,40ppm. Tại điểm GlcA -4S (U3) với proton của H và C trong nhóm U3 có độ dịch chuyển hóa học tương ứng với giá trị là 3,45ppm và 77,33ppm. Tại điểm GlcA -4S (U2) với proton của H và C trong nhóm U2 có độ dịch chuyển hóa học tương ứng với giá trị là 3,24ppm và 74,40ppm. Tại điểm GlcA -4S (U4) với proton của H và C trong nhóm U4 có độ dịch chuyển hóa học tương ứng với giá trị là 3,38ppm và 72,93ppm. Tại điểm GlcA -4S (U5) với proton của H và C trong nhóm U5 có độ dịch chuyển hóa học tương ứng với giá trị là 3,39ppm và 70,41ppm.

Tại điểm GlcA -4S (U'3) với proton của H và C trong nhóm U'3 có độ dịch chuyển hóa học tương ứng với giá trị là 3,65ppm và 77,33ppm. Tại điểm GlcA -4S (U'4) với proton của H và C trong nhóm U'4 có độ dịch chuyển hóa học tương ứng với giá trị là 3,89ppm và 74,89ppm. Cuối cùng, tín hiệu rõ nhất là tại vị trí tại điểm GlcA -4S (U'5) với proton của H và C trong nhóm U'5 có độ dịch chuyển hóa học tương ứng với giá trị là 3,71ppm và 75,17ppm.

Từ kết quả phân tích phổ $^1\text{C-NMR}$, phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ HSQC ở trên cho thấy chondroitin sulfate của dịch thủy phân sụn cá mập trắng có cấu trúc như hình 3.53.



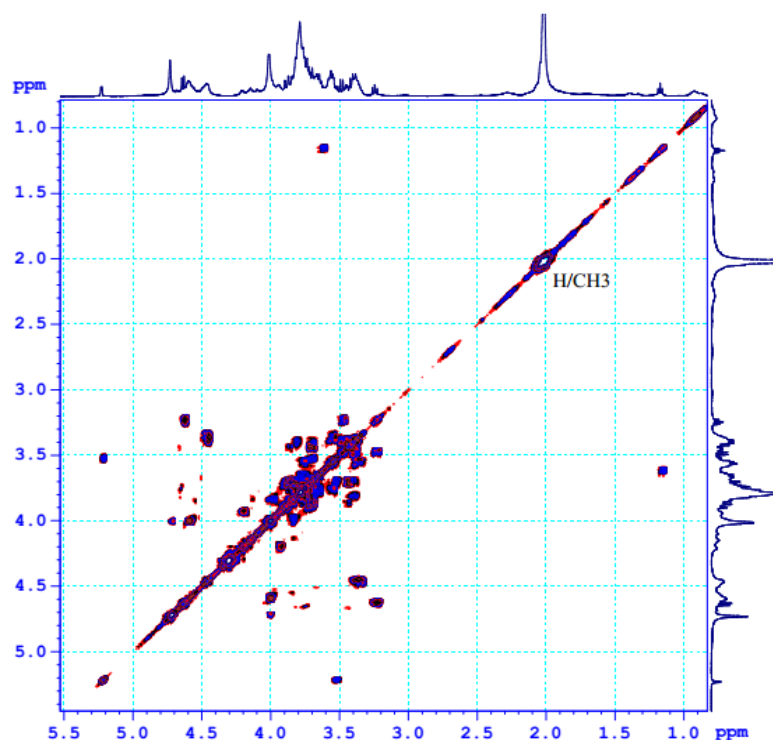
Hình 3.53. Cấu trúc chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân từ sụn cá mập + PHÂN TÍCH CẤU TRÚC MẢNH CHONDROITIN SULFATE BẰNG PHỔ COSY

Phổ COSY cho thông tin về liên kết H-H, thường là 3JHH (như liên kết H7-H8), hãn hữu có thể có 4JHH (như liên kết H3-H4). Trên phổ, khi nối các tín hiệu đường chéo và các tín hiệu giao nhau của một cặp liên kết, ta sẽ được một hình vuông.

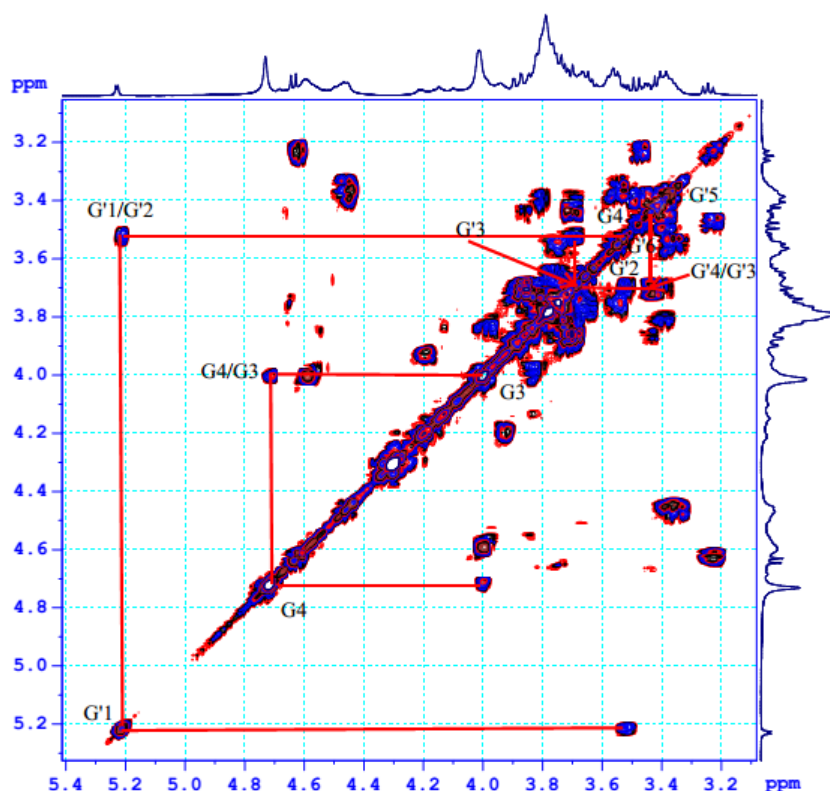
Để phân tích phổ COSY, ta lập bảng gán COSY, bao gồm số liên kết COSY H-H cho mỗi tín hiệu. Để xác định số liên kết COSY liên quan tới một tín hiệu trên đường chéo, đơn giản chúng ta đếm số hình vuông có đỉnh là tín hiệu trên đường chéo đang xét.

Vai trò, ý nghĩa chính của phân tích phổ COSY là kiểm chứng và nói rộng các kết quả gán phổ $^1\text{H-NMR}$, tạo nên các cụm liên kết, các mảnh phân tử thay vì chỉ gán được từng nhóm proton tương đương riêng rẽ. Vì thế, phổ COSY sẽ chỉ ra các proton cô lập, không tương tác (H1, H4) và ghép nối các cụm liên kết qua 3JHH, như H1 - H3 - H5.

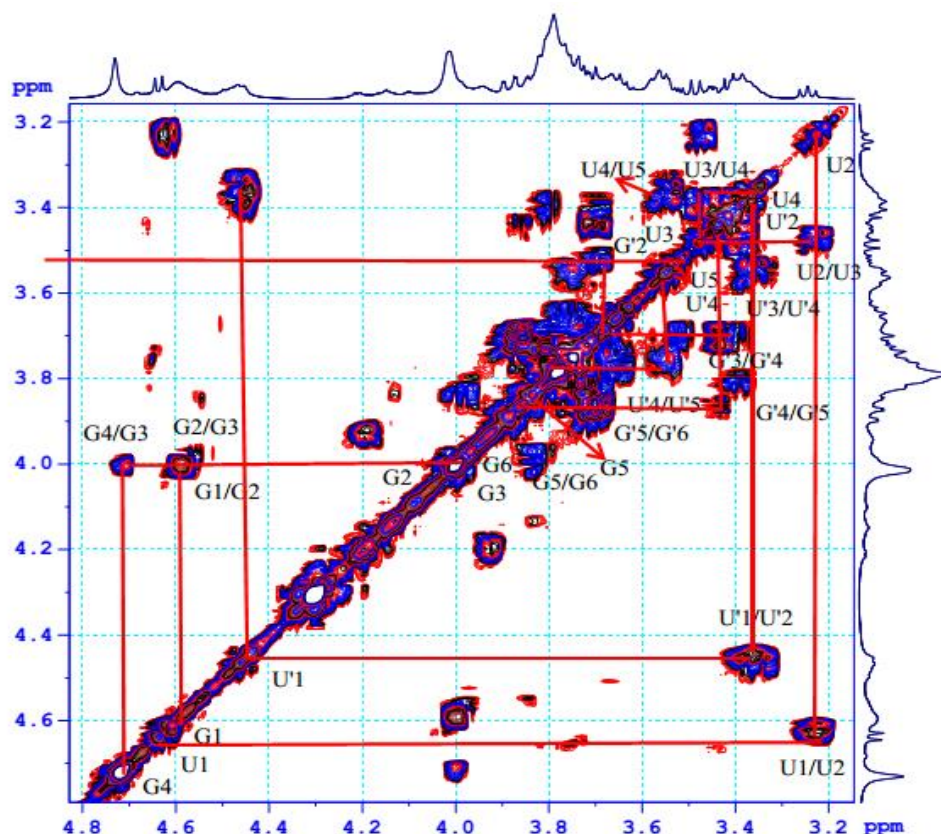
Kết quả phân tích cấu trúc chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân từ sụn cá mập thu được bằng phổ COSY cụ thể như hình 3.54, 3.55 và 3.56 như sau:



Hình 3.54. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ COSY với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 1,0 ÷ 5,5ppm và C từ 1,0 ÷ 5,5ppm



Hình 3.55. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HSQC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 3,1 ÷ 5,4ppm và C từ 3,1 ÷ 5,3ppm



Hình 3.56. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HSQC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 3,2 ÷ 4,8ppm và C từ 3,2 ÷ 4,8ppm

Dựa vào kết quả tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate thu được bằng phổ COSY với khoảng dịch chuyển hóa học proton của H từ 1,0 ÷ 5,5ppm và C từ 1,0 ÷ 5,5ppm trên hình 3.55 cho thấy: Giá trị proton của C là 2,0ppm liên kết 2 chiều với H có giá trị proton là 2,0ppm và nhóm CH₃ thông qua các peak đường chéo vẫn quan sát rõ mặc dù hằng số tương tác của chúng rất bé. Chứng tỏ, đây là liên kết giao động, giao động hóa trị và giao động biến dạng không đối xứng.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhận xác định mảnh cấu trúc chondroitin sulfate trong hình 3.55 cũng không ngoại lệ, đó là sự tương tác proton giữa các nhóm carbon này với proton của carbon hoặc hydro của nhóm khác thể hiện rõ qua các peak đường chéo, cụ thể:

Proton G'1/G'2 có độ dịch chuyển hóa học 5,23ppm có tương tác với proton G'6 (3,87ppm) và G'1 (5,21ppm). Tương tự, proton G4/G3 có tương tác với proton G4 (4,73ppm) và G3 (3,94ppm). Đặc biệt với chất lượng hình ảnh của phổ HSQC rất tốt đo được, thể hiện sự tương tác giữa proton của G'4/G'3 có độ dịch chuyển hoá học là 3,61 ppm và proton G'5 có độ dịch chuyển hóa học là 3,56ppm qua các peak đường chéo vẫn

quan sát được mặc dù hằng số tương tác của chúng rất bé.

Dựa vào kết quả tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate thu được bằng phổ HSQC với khoảng chạy proton của H từ 3,2 ÷ 4,8ppm và C từ 3,2 ÷ 4,8ppm trên hình 3.56 cho thấy các tương tác gần về mặt không gian giữa các proton G4-G4/G3-G6 (4,72ppm/ 4,0ppm), G1-G2/G3-G6 (5,59ppm/4,0ppm), U1-U1/U2-U2 (4,63ppm/3,24ppm), U'1-U'1/U'2-U'2 (4,7ppm/3,38ppm), U3/U4-U3-U'1/U'2 (3,48ppm/3,38ppm), G'2-G'3-G'3/G'4 (3,71ppm/3,42ppm).

Phổ HSQC trên hình 3.56 là một minh chứng cụ thể cho việc gán phổ proton ^1H -NMR khi đã phân tích được phổ carbon ^{13}C -NMR. Từ phổ HSQC cho thấy có sự tương tác trực tiếp của proton với carbon tại các vị trí liên kết của chúng trong mạch chondroitin sulfate.

Qua phân tích kết quả phổ HSQC cho thấy chondroitin sulfate bị sulphate hóa ở các vị trí không đồng đều và có cấu trúc phức tạp.

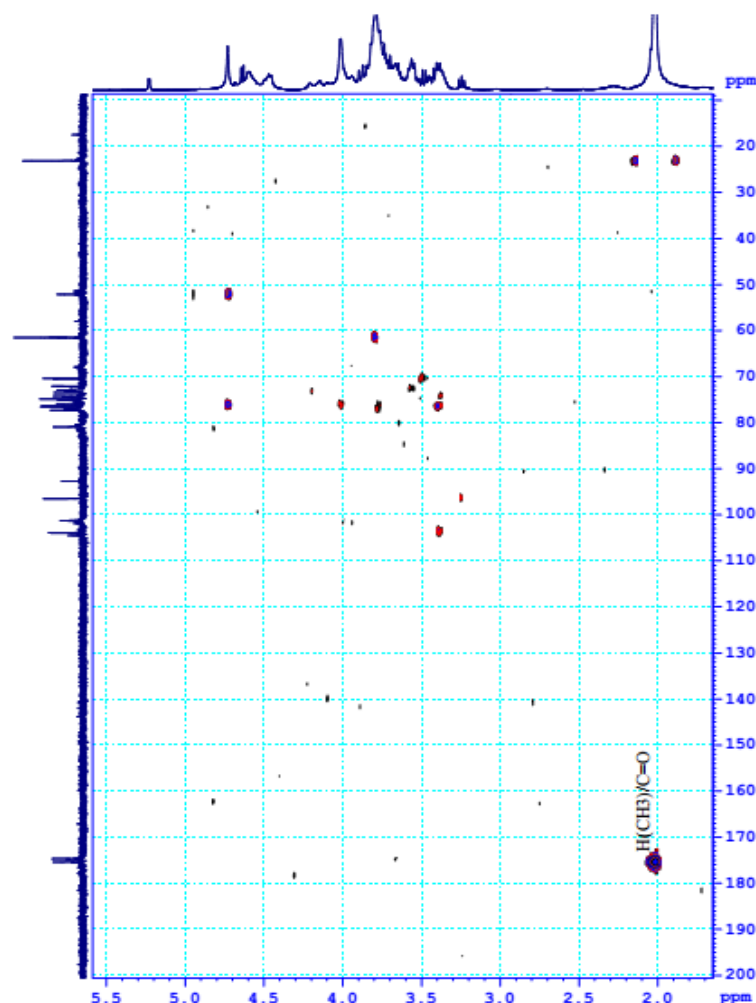
+ PHÂN TÍCH CẤU TRÚC CHONDROITIN SULFATE BẰNG PHỔ HMBC

Phổ HMBC cho thông tin về liên kết xa $n\text{JCH}$ với $n = 2, 3, \dots$ (hay còn gọi là liên kết dị nhân), Phổ HMBC đóng vai trò quan trọng để gán các C bậc 4, vốn không gán được trên phổ HSQC, và để kết nối các cụm, các mảnh thành phân tử hoàn chỉnh.

Kết quả xác định mảnh cấu trúc chondroitin sulfate bằng phổ HMBC được thể hiện trên hình 3.57 ÷ 3.60.

Dựa vào phổ HMBC trên hình 3.57 cho ta thấy các tín hiệu rõ nét, chứng tỏ có sự tương tác xa của 2 ÷ 3 liên kết proton của H với độ dịch chuyển hóa học từ 1,7 ÷ 5,5ppm và proton của C với độ dịch chuyển hóa học từ 10 ÷ 200ppm. Kết quả cụ thể được cắt nhỏ và giải thích cụ thể trên hình 3.58 ÷ 3.60.

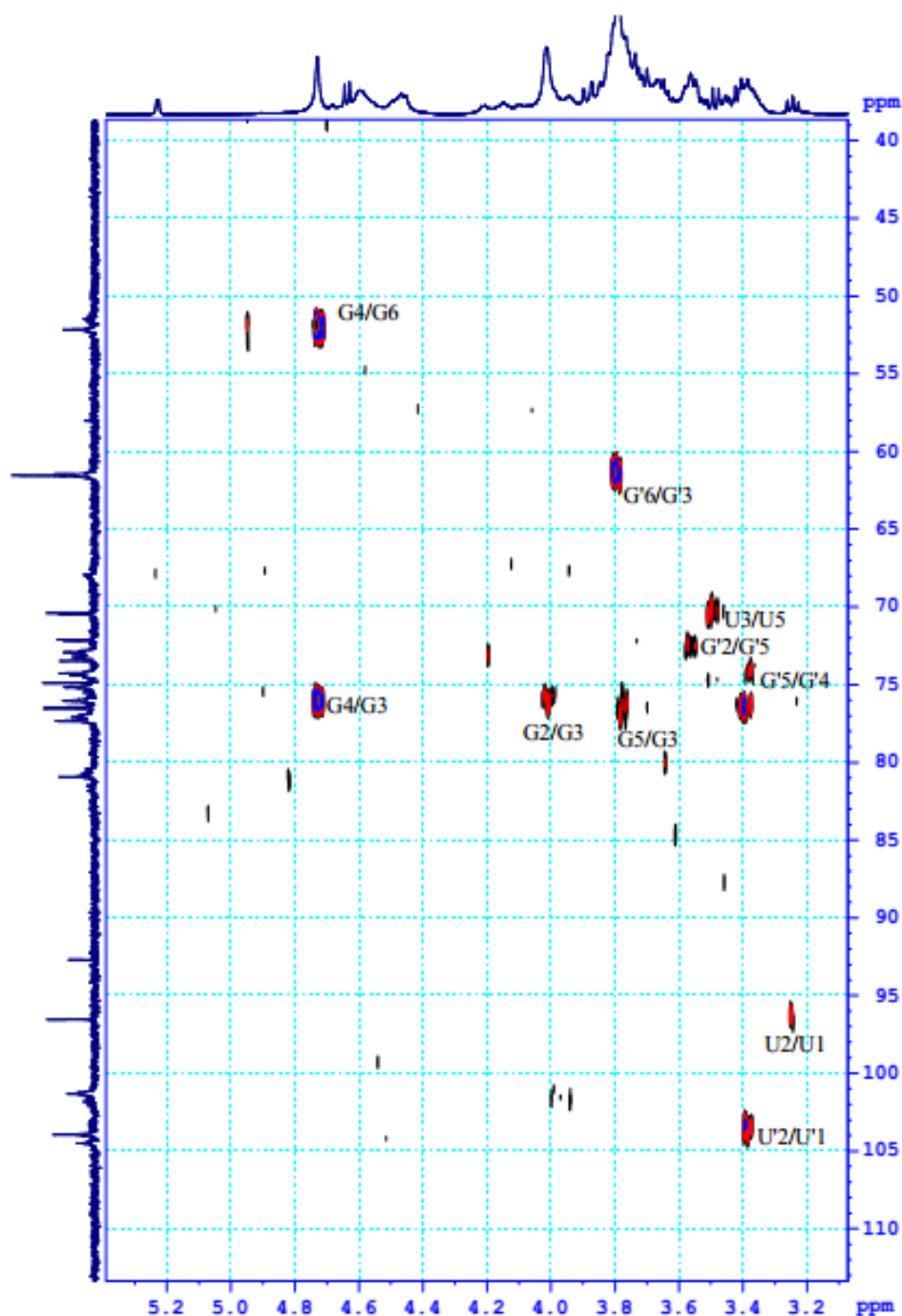
Kết quả chạy phổ HMBC với khoảng chạy proton của H từ 3,1 ÷ 5,4ppm và C từ 40 ÷ 110ppm trên hình 3.58 cho thấy liên kết dị nhân của proton G4/G6 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H4/C6 là 4,73ppm/52,17ppm. Tương tự, liên kết dị nhân của proton G4/G3 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H4/C3 là 4,73ppm/76,04ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm G2/G3 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H2/C3 là 4,01ppm/76,04ppm. Liên kết dị nhân của proton G5/G3 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H5/C3 là 3,78ppm/76,04ppm.



Hình 3.57. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HMBC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 1,7 ÷ 5,5ppm và C từ 10 ÷ 200ppm

Liên kết dị nhân của proton nhóm G'6/G'3 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H'6/C'3 là 3,87ppm/61,45ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm G'5/G'4 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H'5/C'4 là 3,56ppm/74,27ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm G'2/G'5 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H'2/C'5 là 3,78ppm/72,12ppm.

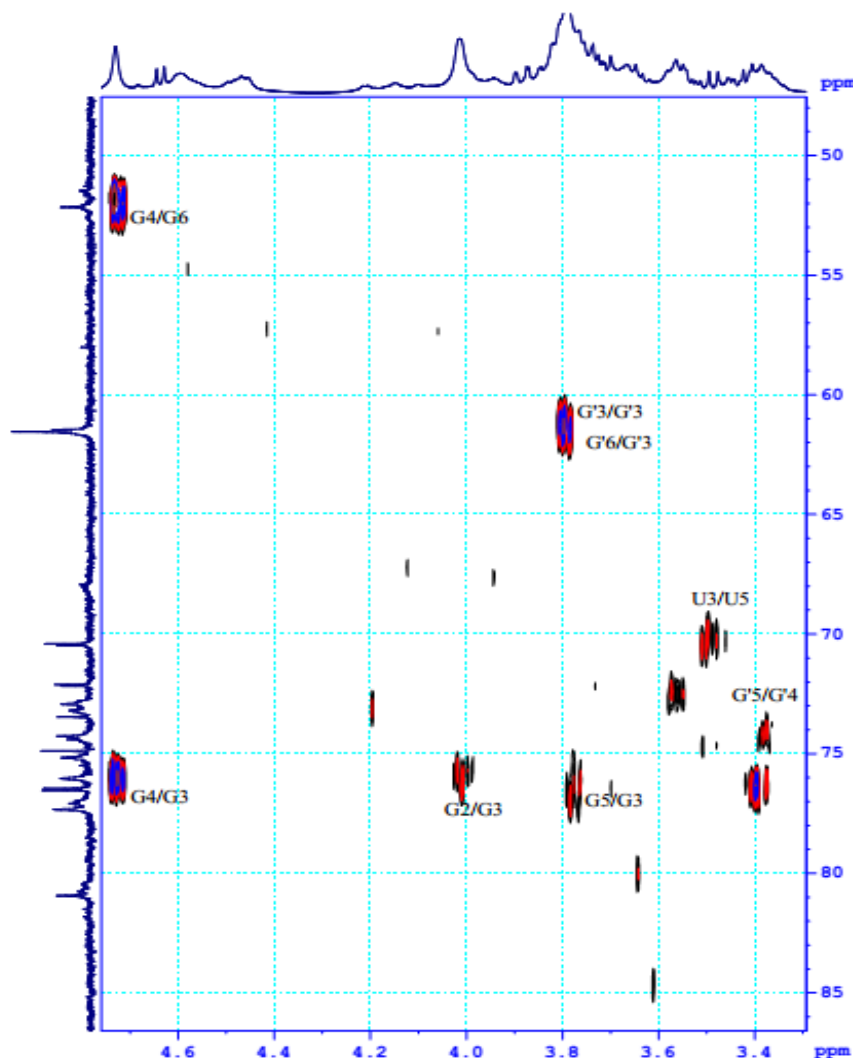
Liên kết dị nhân của proton nhóm U3/U5 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H3/C5 là 3,45ppm/70,41ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm U2/U1 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H2/C1 là 3,24ppm/96,54ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm U'2/U'1 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H'2/C'1 là 3,41ppm/103,95ppm.



Hình 3.58. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HMBC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 3,1 ÷ 5,4ppm và C từ 40 ÷ 110ppm

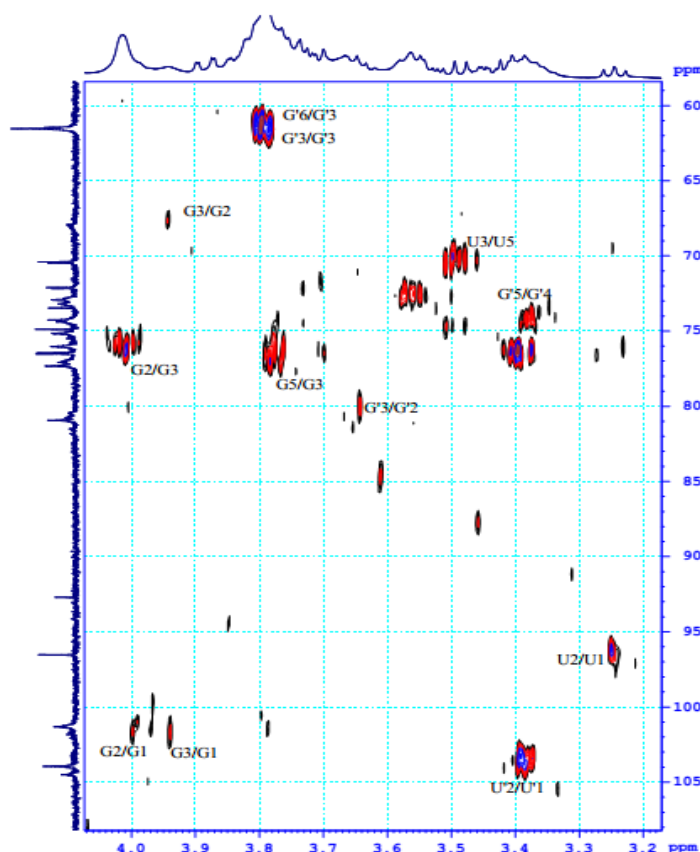
Kết quả chạy phổ HMBC trên hình 3.59 chính là bản cắt chi tiết hơn của hình 3.58 với tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate thu được bằng phổ HMBC với khoảng chạy proton của H từ 3,4 ÷ 4,7ppm và C từ 50 ÷ 85ppm cho thấy liên kết dị nhân của proton G4/G6 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H4/C6 là 4,73ppm/52,17ppm. Tương tự, liên kết dị nhân của proton G4/G3 thể hiện qua độ dịch

chuyển hóa học proton của H4/C3 là 4,73ppm/76,04ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm G2/G3 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H2/C3 là 4,01ppm/76,04ppm. Liên kết dị nhân của proton G5/G3 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H5/C3 là 3,78ppm/76,04ppm.



Hình 3.59. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HMBC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 3,4 ÷ 4,7ppm và C từ 50 ÷ 85ppm

Liên kết dị nhân của proton nhóm G'3/G'3 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H'3/C'3 là 3,78ppm/61,45ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm G'6/G'3 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H'6/C'3 là 3,87ppm/61,45ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm G'5/G'4 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H'5/C'4 là 3,56ppm/74,27ppm.



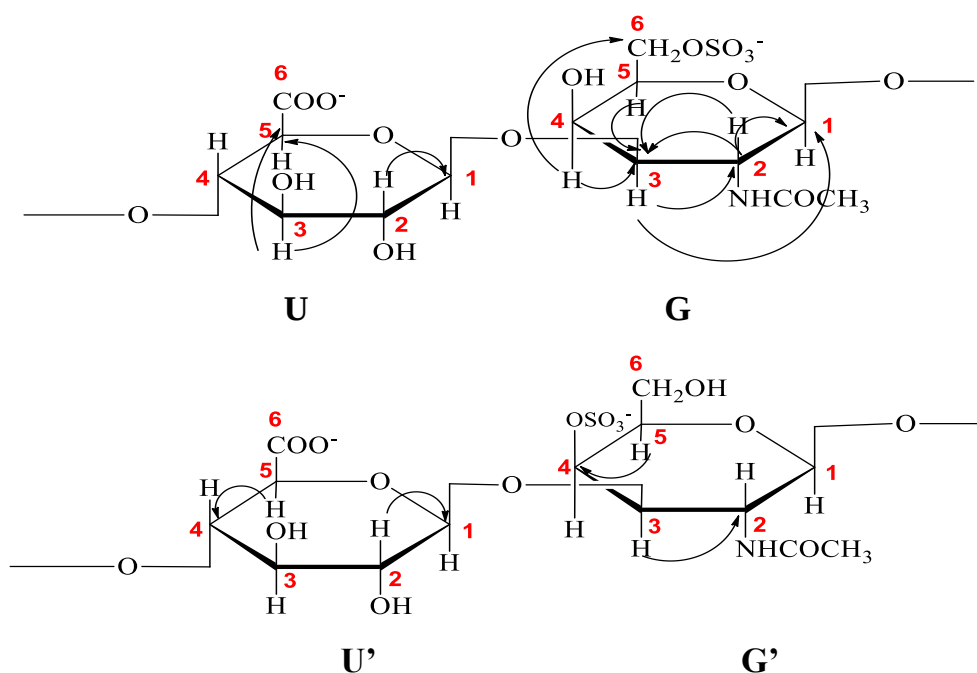
Hình 3.60. Tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate bằng phổ HMBC với độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 3,2 ÷ 4,0ppm và C từ 60 ÷ 105ppm

Kết quả chạy phổ HMBC trên hình 3.60 chính là bản cắt chi tiết hơn của hình 3.59 với tín hiệu cấu trúc mảnh chondroitin sulfate thu được bằng phổ HMBC với khoảng chạy proton của H từ 3,4 ÷ 4,0ppm và C từ 60 ÷ 105ppm cho thấy liên kết dị nhân proton G3/G2 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H3/C2 là 3,94ppm/68,23ppm. Tương tự, liên kết dị nhân của proton G2/G3 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H2/C3 là 4,01ppm/76,04ppm. Liên kết dị nhân của proton G5/G3 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H5/C3 là 3,78ppm/76,04ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm G2/G1 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H2/C1 là 4,01ppm/101,33ppm. Liên kết dị nhân của proton G3/G1 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H3/C1 là 3,94ppm/101,33ppm.

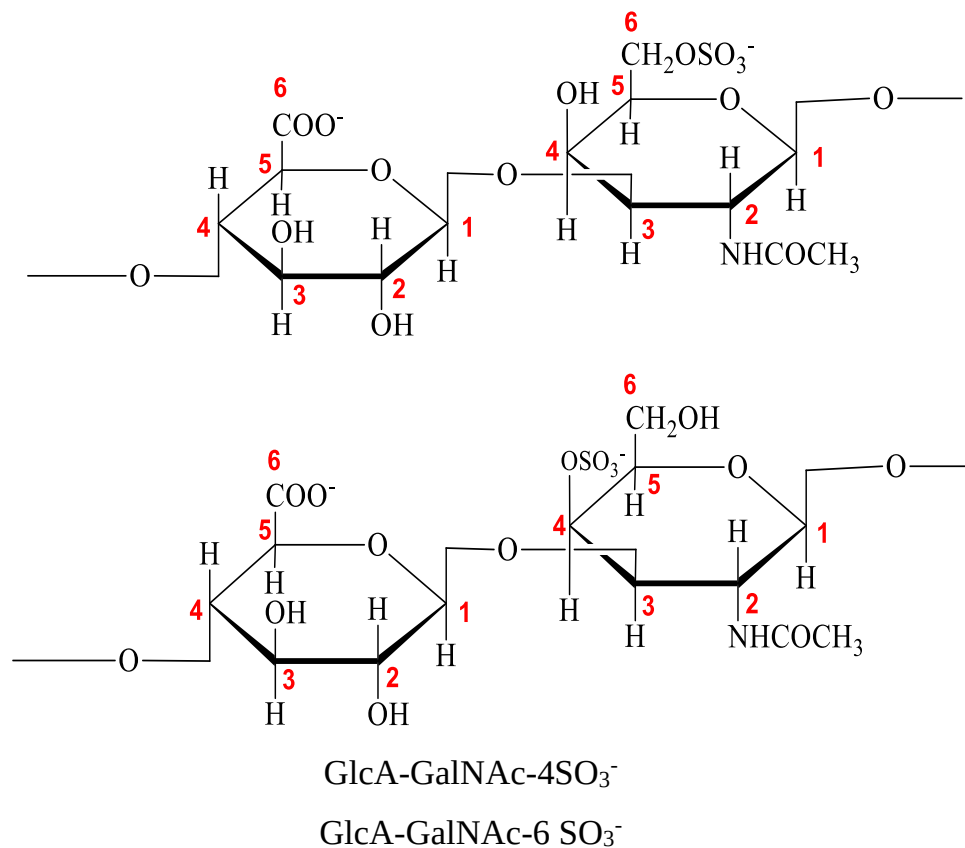
Liên kết dị nhân của proton nhóm G'6/G'3 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H'6/C'3 là 3,87ppm/61,45ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm G'3/G'3 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H'3/C'3 là 3,78ppm/61,45ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm G'5/G'4 thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của

H⁵/C⁴ là 3,56ppm/74,27ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm G³/G² thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H³/C² là 3,78ppm/80,94ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm U³/U⁵ thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H³/C⁵ là 3,45ppm/70,41ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm U²/U¹ thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H²/C¹ là 3,24ppm/96,54ppm. Liên kết dị nhân của proton nhóm U²/U¹ thể hiện qua độ dịch chuyển hóa học proton của H²/C¹ là 3,41ppm/103,95ppm.

Tổng hợp kết quả phân tích HMBC vừa để hoàn thiện cấu trúc, vừa để kiểm chứng các kết quả gán HSQC. HMBC cho biết thông tin về liên kết xa 2JCH, 3JCH, nhờ đó có thể “khâu” các mảnh 1JCH đã gán trước đó theo phổ HSQC. Khó khăn chính của bước này là không phân biệt được một liên kết là 2JCH hay 3JCH. Vì thế, khi phân tích phổ HMBC, thường phải kết hợp với phân tích phổ COSY. Điểm đặc biệt của phổ HMBC là cho phép gán các C bậc 4, điều mà không thể thực hiện được với phổ COSY. Chẳng hạn, trong nhóm N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc)-6S là: C bậc 4 ở 73,20ppm (C6) có liên kết với proton H3 (s; 3,94ppm), nhờ đó có thể gán C này là 6 (qua 2JCH). Trong nhóm D – glucuronic acid (GlcA) là U: C bậc 4 thứ 2 là C5 (70,41ppm) liên kết đồng thời với H3 (3,45ppm) và H5 (3,39ppm), do vậy có thể gán C5, có 3JCH tới cả hai hydrogen. Kết quả thu được như sau:



Từ các phương pháp phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ 1D và 2D cho phép kết luận về cấu trúc đặc trưng của chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân sụn cá mập (*Carcharhinus dussumieri*) có công thức cấu tạo như sau:

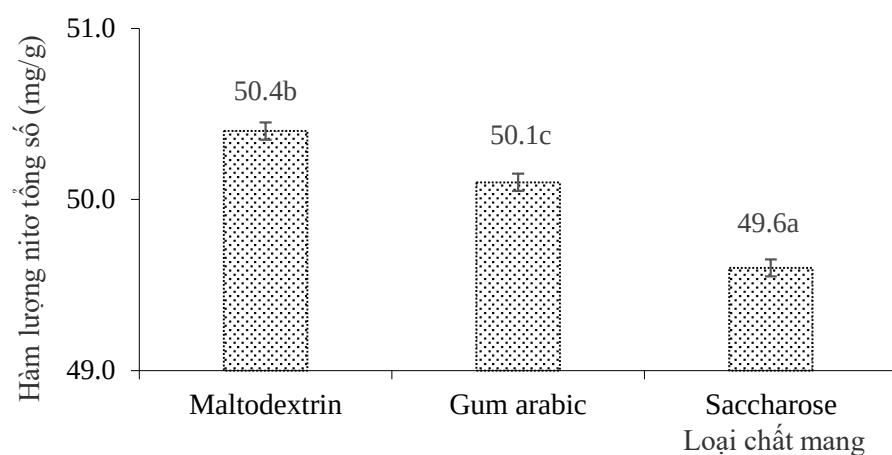


Hình 3.61. Cấu trúc chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân sụn cá mập

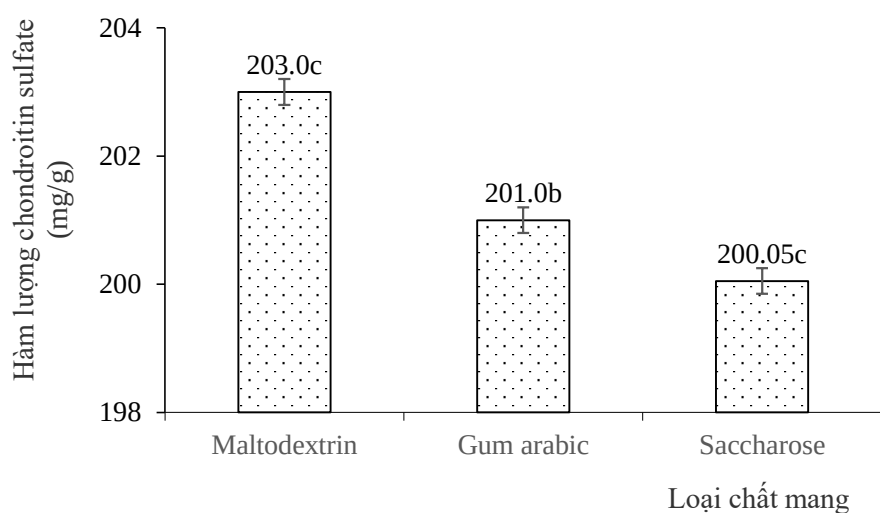
3.3. NGHIÊN CỨU SẤY PHUN TẠO BỘT ĐẠM THỦY PHÂN CHỨA CHONDROITIN SULFATE

3.3.1. Xác định chất mang thích hợp cho quá trình sấy phun

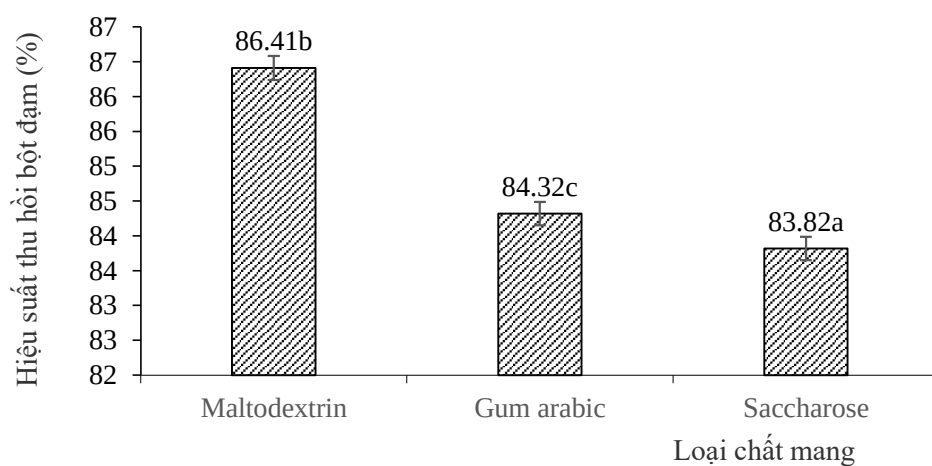
Tiến hành 3 thí nghiệm sấy phun tạo bột đạm thủy phân từ dịch thủy phân sụn cá mập với các mang khác nhau: Mẫu 1: maltodextrin 10%, Mẫu 2: gum arabic 10%, Mẫu 3: saccharose 10%. Quá trình sấy phun thực hiện ở cùng điều kiện nhiệt độ buồng sấy là 80°C, tốc độ bơm nhập liệu là 12ml/phút, áp suất buồng sấy là 2,5bar. Sau khi sấy phun thu chế phẩm bột đạm và lấy mẫu xác định hàm lượng nitơ tổng, hàm lượng chondroitin sulfate, hiệu suất thu hồi sản phẩm. Kết quả được trình bày ở các hình 3.62÷3.64.



Hình 3.62. Ảnh hưởng của chất mang đến hàm lượng nitơ tổng của bột đậm



Hình 3.63. Ảnh hưởng của loại chất mang đến hàm lượng chondroitin sulfate của bột đậm



Hình 3.64. Ảnh hưởng của chất trợ sấy đến hiệu suất thu hồi bột đậm

Từ các kết quả phân tích ở các hình 3.62÷3.64 cho thấy:

*** Về hàm lượng nitơ tổng số**

Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng nitơ tổng của chế phẩm bột đậm thu được sau sấy phun thay đổi phụ thuộc vào loại chất mang sử dụng nhưng mức độ chênh lệch không nhiều. Do vậy, các thí nghiệm tiếp theo sẽ không đưa thông số này vào đánh giá. Trong đó, hàm lượng nitơ tổng số của mẫu bột đậm sử dụng maltodextrin làm chất mang có hàm lượng nitơ tổng cao nhất và đạt mức $50.4 \pm 0.02\text{mg/g}$ bột. Trong khi đó, mẫu bột đậm sử dụng gum arabic và sacharose có hàm lượng nitơ tổng số thấp hơn một chút, đạt tương ứng là $50.1 \pm 0.12\text{mg/g}$ bột và $49.6 \pm 0.11\text{mg/g}$ bột (hình 3.63). Như vậy, mẫu bột đậm sử dụng sacharose có hàm lượng nitơ tổng số thu được thấp nhất. Sự khác biệt này có thể giải thích là do có sự khác nhau trong cấu trúc hóa học và đặc tính của các chất mang. Khi cho chất mang vào dịch thủy phân sụn cá mập, giữa chất mang và các chất như acid amin, khoáng, chondroitin sulfate, ... sẽ hình thành các liên kết tạo thành phức hợp chất mang gắn kết, bao lấy các acid amin, khoáng, chondroitin sulfate, ... giúp chúng không bị bay theo hơi nước nên hạn chế được thất thoát trong quá trình sấy phun. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Renata V. và cộng sự công bố năm 2010 khi nghiên cứu về quá trình sấy các chất có hoạt tính sinh học thu nhận từ thực vật [78].

Từ các phân tích ở trên cho thấy maltodextrin là chất mang, gắn kết và bảo vệ các thành phần có trong dịch thủy phân sụn cá mập tốt nhất nên hàm lượng nitơ tổng số của bột đậm thu được cao nhất. Do vậy, maltodextrin nên được lựa chọn làm chất mang dùng cho quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập.

*** Về hàm lượng chondroitin sulfate**

Kết quả phân tích ở hình 3.63 cho thấy mẫu bột đậm sử dụng maltodextrin làm chất mang có hàm lượng chondroitin sulfate (CS) cao hơn các mẫu khác. Như vậy, khi xét theo thứ tự giảm dần của hàm lượng chondroitin sulfate có trong bột đậm thu được sau sấy, thì thứ tự các chất mang có hiệu quả thu chondroitin sulfate cao trong sấy phun dịch đậm thủy phân sụn cá mập được sắp xếp như sau: maltodextrin, gum arabic và saccharose.

*** Về hiệu suất thu sản phẩm**

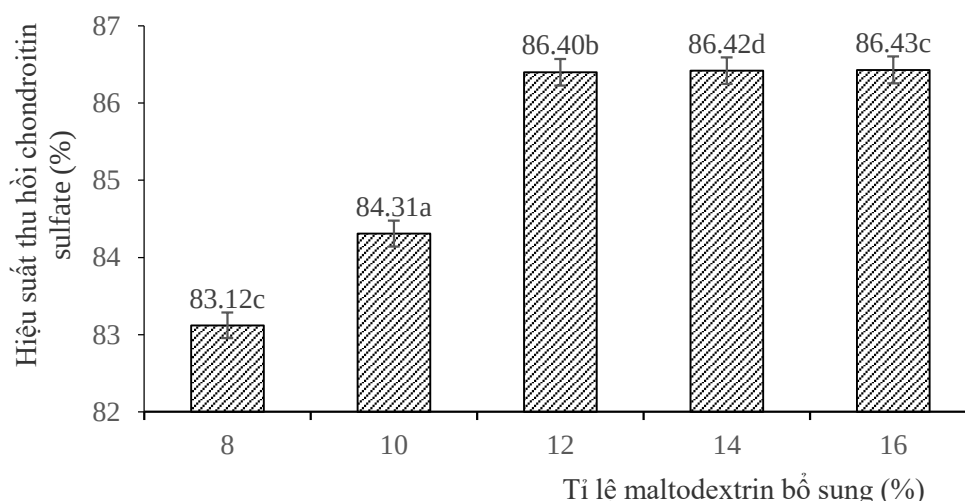
Kết quả phân tích ở hình 3.64 cho thấy tương tự như kết quả phân tích về hàm

lượng chondroitin sulfate và hàm lượng nitơ tổng số, mẫu sử dụng maltodextrin làm chất mang cũng có hiệu suất thu hồi sản phẩm cao nhất và đạt 86.41%.

Từ những phân tích ở trên cho thấy maltodextrin là chất mang tốt nhất trong quá trình sấy phun tạo bột đậm thủy phân chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập. Do vậy, maltodextrin được lựa chọn là chất mang cho quá trình sấy phun thu bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập.

3.3.2. Xác định tỉ lệ chất mang thích hợp cho quá trình sấy phun

Tiến hành 3 mẫu thí nghiệm sấy phun dịch thủy phân sụn cá mập ở nhiệt độ buồng sấy 80°C, áp suất buồng sấy 2,5bar, tốc độ nhập liệu 12ml/phút, tỷ lệ maltodextrin sử dụng khác nhau: 8%, 10%, ..., 14%. Sau khi sấy phun, lấy mẫu đánh giá hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate và bột đậm. Kết quả được trình bày ở hình 3.65 và 3.66.



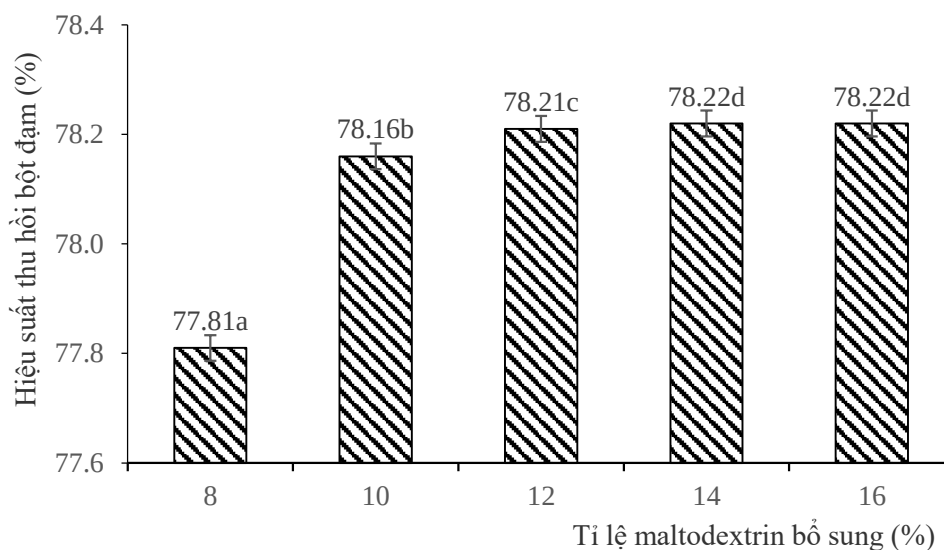
Hình 3.65. Ảnh hưởng của tỉ lệ maltodextrin sử dụng đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate

Từ kết quả được trình bày ở hình 3.65 và 3.66 cho thấy:

* Về hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.65 cho thấy ở cùng một chế độ sấy, tỷ lệ maltodextrin sử dụng có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thu hồi choindoitin sulfate (CS) có trong bột đậm. Cụ thể, khi tỷ lệ maltodextrin sử dụng tăng từ 8% lên 12%, thì hiệu suất thu hòichoindoitin sulphate của bột đậm tăng từ 83,12% lên 86,40%. Nhưng khi tăng tỷ lệ maltodextrin trên 12% thì hiệu suất thu hồi choindoitin sulfate trong bột đậm tăng không đáng kể và sự chênh lệch không có ý nghĩa thống kê.

Như vậy khi xét theo hiệu suất thu chondroitin sulfate cao trong bột đậm thì tỉ lệ maltodextrin sử dụng thích hợp là 12%.



Hình 3.66. Ảnh hưởng của tỉ lệ maltodextrin sử dụng đến hiệu suất thu hồi bột đậm

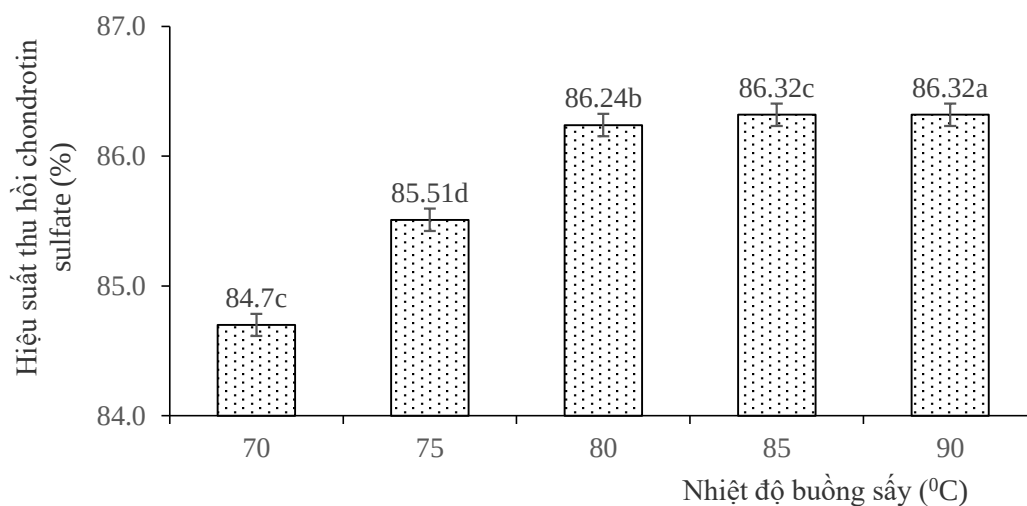
*** Về hiệu suất thu hồi bột đậm**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.66 cho thấy ở cùng một chế độ sấy, tỷ lệ maltodextrin bổ sung có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thu hồi bột đậm. Cụ thể, khi tỷ lệ maltodextrin bổ sung tăng từ 8% lên 12%, thì hiệu suất thu hồi bột đậm tăng từ 77,81% lên 78,21%. Sau đó nếu tiếp tục tăng tỷ lệ maltodextrin bổ sung trên 12%, cụ thể lên 14% và 16% thì hiệu suất thu hồi bột đậm tăng không đáng kể và sự chênh lệch về hiệu suất không có ý nghĩa thống kê. Từ phân tích ở trên cho thấy khi xét theo hiệu suất thu hồi bột đậm cao thì tỉ lệ maltodextrin bổ sung thích hợp là 12%.

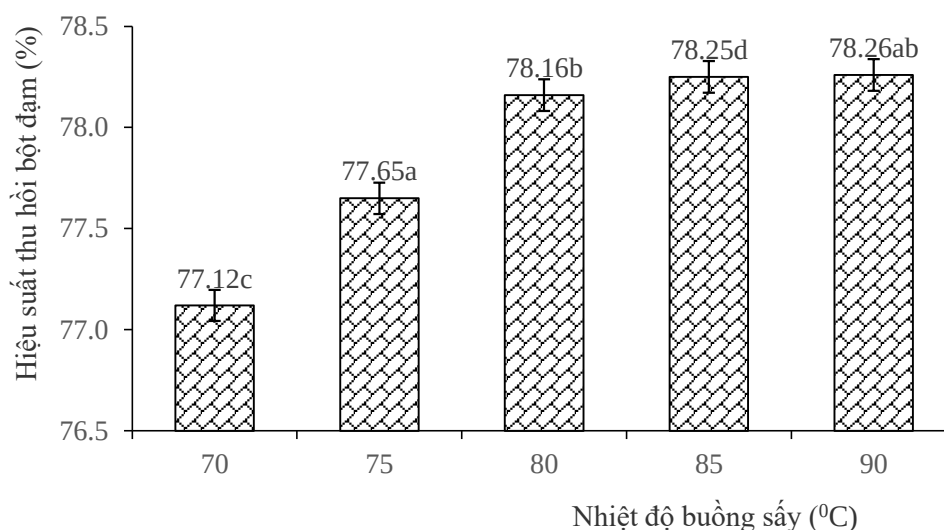
Từ tất cả các phân tích ở trên cho phép chọn tỷ lệ maltodextrin bổ sung trong quá trình sấy phun tạo bột đậm từ dịch thủy phân sụn cá mập là 12%.

3.3.3. Xác định nhiệt độ không khí buồng sấy thích hợp

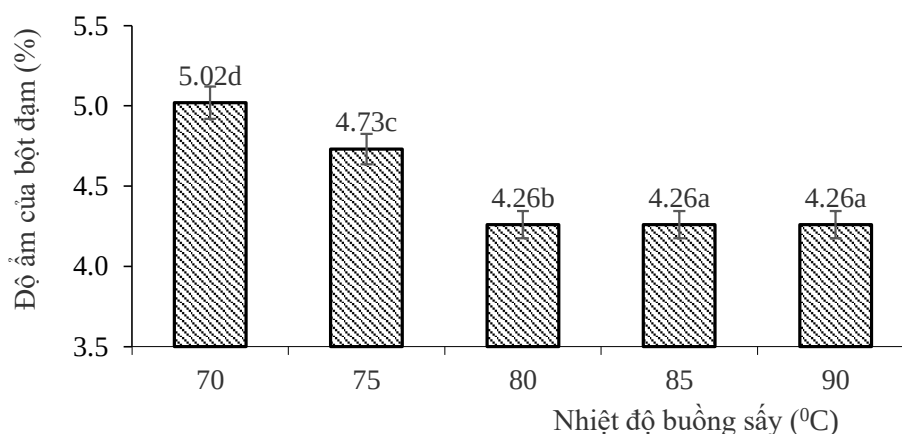
Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm sấy phun dịch đậm thủy phân từ sụn cá mập ở áp suất buồng sấy 2,5bar, tốc độ nhập liệu 12ml/phút, tỷ lệ chất mang maltodextrin bổ sung là 12% và nhiệt độ buồng sấy thay đổi: 70°C, 75°C, 80°C, 85°C và 90°C. Sau khi sấy phun lấy mẫu đánh giá độ ẩm, hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate và bột đậm. Kết quả được trình bày ở hình 3.67 ÷ 3.69.



Hình 3.67. Ảnh hưởng của nhiệt độ buồng sấy đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate



Hình 3.68. Ảnh hưởng của nhiệt độ buồng sấy đến hiệu suất thu hồi bột đậm



Hình 3.69. Ảnh hưởng của nhiệt độ buồng sấy đến độ ẩm của bột đậm

Từ kết quả phân tích trình bày ở hình 3.67 ÷ 3.69 cho thấy:

*** Về hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate**

Kết quả phân tích ở hình 3.67 cho thấy nhiệt độ buồng sấy có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate. Cụ thể, khi tăng nhiệt độ buồng sấy trong khoảng $70^{\circ}\text{C} \div 80^{\circ}\text{C}$ thì hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate tăng từ 84,70% lên 86,24%. Sau đó nếu tiếp tục tăng nhiệt độ buồng sấy lên trên 80°C thì hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate có tăng nhưng không đáng kể và sự chênh lệch về hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate của các mẫu bột đậm sấy ở nhiệt độ trên 80°C không có ý nghĩa thống kê.

Từ kết quả phân tích ở trên khi xét theo hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate cao thì nhiệt độ buồng sấy phun 80°C là phù hợp.

*** Về hiệu suất thu hồi bột đậm**

Kết quả phân tích ở hình 3.68 cũng cho thấy nhiệt độ buồng sấy có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thu hồi bột đậm. Cụ thể, khi tăng nhiệt độ buồng sấy trong khoảng $70 \div 80^{\circ}\text{C}$, thì hiệu suất thu hồi bột đậm tăng trong khoảng 77,12% $\div$ 78,16%. Khi tăng nhiệt độ buồng sấy phun lên 85°C và 90°C thì hiệu suất thu hồi bột đậm tăng không đáng kể và sự chênh lệch về hiệu suất thu hồi bột đậm khi sấy phun ở nhiệt độ buồng sấy 85°C và 90°C không có ý nghĩa thống kê.

Từ phân tích ở trên cho thấy khi xét hiệu suất thu hồi bột đậm cao thì nhiệt độ buồng sấy phun nên được lựa chọn là 80°C .

*** Về độ ẩm của bột đậm**

Kết quả phân tích độ ẩm của các mẫu bột đậm sấy phun cho thấy độ ẩm của bột đậm giảm theo chiều tăng của nhiệt độ không khí trong buồng sấy (hình 3.69). Cụ thể, khi tăng nhiệt độ buồng sấy trong khoảng $70 \div 80^{\circ}\text{C}$, thì độ ẩm của bột đậm giảm từ 5,02% khi nhiệt độ buồng sấy phun là 70°C xuống chỉ còn 4,26% khi nhiệt độ buồng sấy phun là 80°C . Sau đó, nếu tiếp tục tăng nhiệt độ buồng sấy trên 80°C thì độ ẩm của mẫu bột đậm thu được không giảm khi so với độ ẩm của mẫu bột đậm sấy phun ở nhiệt độ buồng sấy 80°C và độ ẩm của bột đậm sấy ở nhiệt độ buồng sấy trên 80°C có xu thế giữ ổn định ở mức 4,26%. Kết quả này chứng tỏ khi sấy phun dịch đậm thủy phân từ sụn cá mập ở nhiệt độ không khí buồng sấy $\geq 80^{\circ}\text{C}$ thì lượng nước tự do có trong dịch đậm đã bay hơi hết và bột đậm thu được có độ ẩm thấp nhất là 4,26% như vậy nhiệt độ 80°C là nhiệt độ tối đa cần thiết để làm khô mẫu bột đậm trong quá trình sấy phun. Mặt khác, khi nhiệt độ buồng sấy tăng cao hơn 80°C , thì bột đậm thu được có màu sắc sẫm

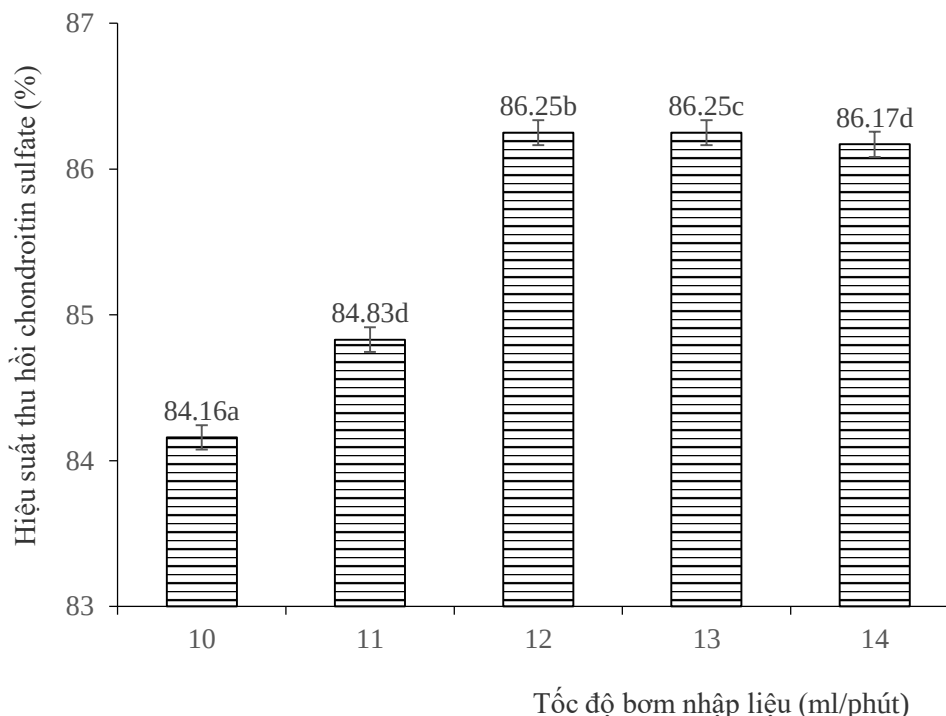
hơn. Kết quả này được lý giải là: phản ứng sẫm màu là phản ứng giữa acid amin và carbohydrat chịu ảnh hưởng lớn của nhiệt độ, nhiệt độ càng cao thì phản ứng sẫm màu càng mạnh. Mà hỗn hợp sấy phun có chứa cả hai thành phần trên nên khi nhiệt độ buồng sấy cao hơn 80°C sẽ làm phản ứng sẫm màu xảy ra mạnh nên bột đậm bị sẫm màu.

Từ phân tích ở trên cho thấy khi xét theo độ ẩm bột đậm thấp thì nhiệt độ buồng sấy phun nên được lựa chọn là 80°C.

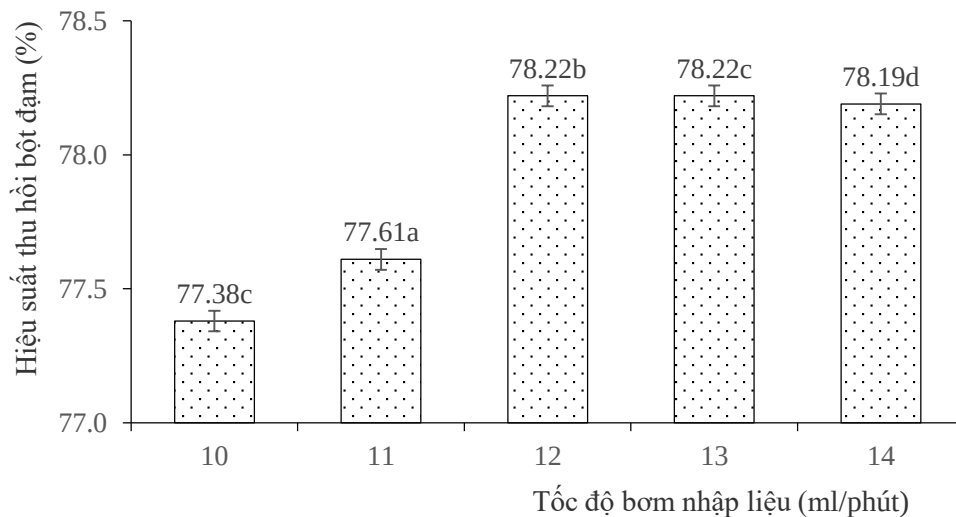
Từ tất cả những phân tích ở trên cho thấy nhiệt độ buồng sấy phun phù hợp với quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập là 80°C. Do vậy, nhiệt độ 80°C được lựa chọn để điều chỉnh nhiệt độ buồng sấy phun trong tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập.

3.3.4. Xác định tốc độ bơm nhập liệu

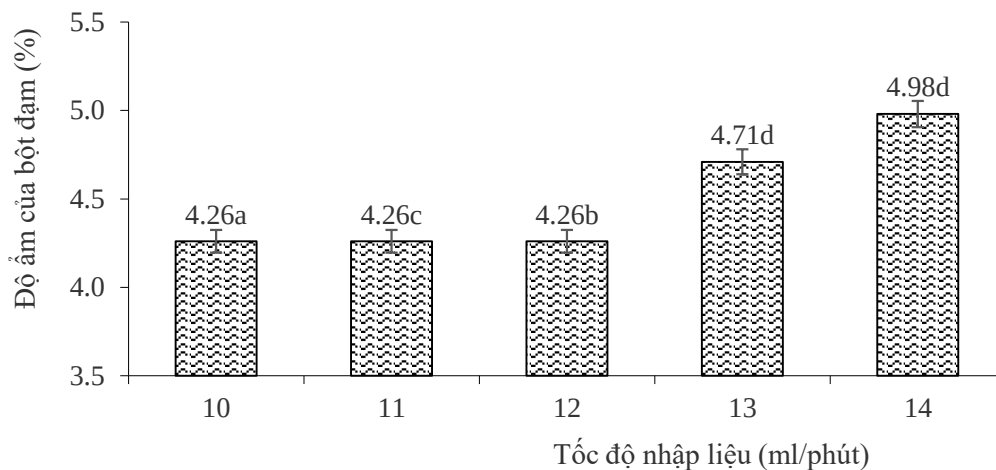
Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm sấy phun dịch đậm thủy phân từ sụn cá mập theo các thông số thích hợp đã chọn với tốc độ nhập liệu thay đổi: 10ml/phút, 11ml/phút, 12ml/phút, 13ml/phút và 14ml/phút. Sau khi sấy phun lấy mẫu đánh giá độ ẩm, hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate và bột đậm. Kết quả được trình bày ở hình 3.70 ÷ 3.72.



Hình 3.70. Ảnh hưởng của tốc độ bơm nhập liệu đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate



Hình 3.71. Ảnh hưởng của tốc độ bơm nhập liệu đến hiệu suất thu hồi bột đậm



Hình 3.72. Ảnh hưởng của tốc độ bơm nhập liệu đến độ ẩm bột đậm sau sấy

Từ kết quả phân tích trình bày ở hình 3.70 ÷ 3.72 cho thấy

*** Về hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate**

Kết quả phân tích cho thấy tốc độ bơm nhập liệu cũng có ảnh hưởng mạnh đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate (hình 3.71). Cụ thể, khi tăng tốc độ bơm nhập liệu trong quá trình sấy phun dịch thủy phân sụn cá mập trong khoảng 10 ÷ 12ml/phút, thì hiệu suất thu hồi chondroitin sulphat tăng trong khoảng 84,16% ÷ 86,25%. Sau đó nếu tiếp tục tăng tốc độ bơm nhập liệu > 12ml/phút thì hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate không tăng. Kết quả này chứng tỏ tốc độ bơm nhập liệu trong quá trình sấy phun dịch thủy phân sụn cá mập 12ml/phút là phù hợp để đảm bảo cho hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate cao nhất.

Như vậy, khi xét hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate cao thì tốc độ bơm nhập liệu

12ml/phút là thích hợp cho quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập.

*** Về hiệu suất thu hồi bột đậm**

Kết quả phân tích cho thấy tốc độ bơm nhập liệu cũng có ảnh hưởng mạnh đến hiệu suất thu hồi bột đậm (hình 3.71). Cụ thể, khi tăng tốc độ bơm nhập liệu trong quá trình sấy phun dịch thủy phân sụn cá mập trong khoảng $10 \div 12$ ml/phút, thì hiệu suất thu hồi bột đậm tăng trong khoảng từ 77,38% ÷ 78,22% và đạt hiệu suất thu hồi bột đậm cao nhất 78,22% khi tốc độ bơm nhập liệu là 12ml/phút. Sau đó nếu tiếp tục tăng tốc độ bơm nhập liệu > 12ml/phút thì hiệu suất thu hồi bột đậm không tăng và thậm chí có xu thế giảm nhẹ chỉ còn 78,18% khi tốc độ bơm nhập liệu là 14ml/phút. Kết quả này chứng tỏ tốc độ bơm nhập liệu 12ml/phút là phù hợp và đảm bảo cho hiệu suất thu hồi bột đậm cao nhất.

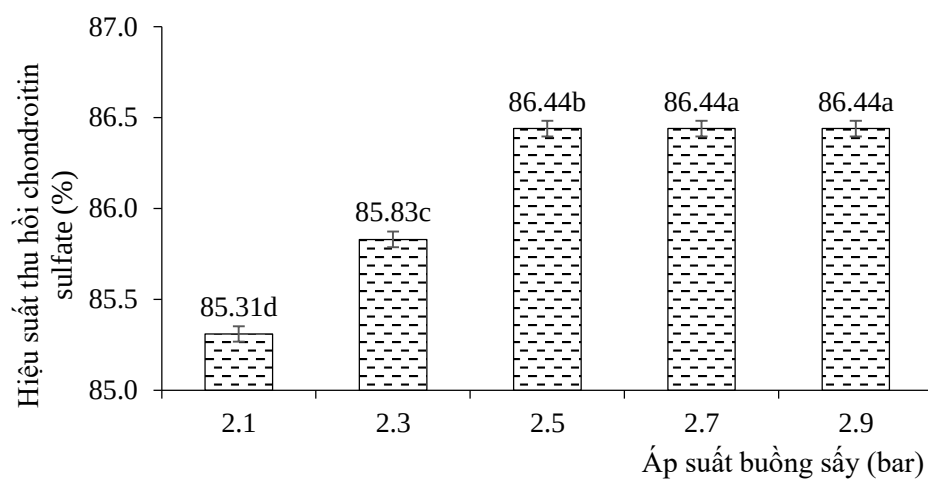
*** Về độ ẩm của bột đậm**

Kết quả phân tích cũng cho thấy độ ẩm của bột đậm cũng thay đổi theo sự thay đổi của tốc độ bơm nhập liệu trong quá trình sấy phun dịch thủy phân sụn cá mập (hình 3.72). Cụ thể, khi thay tốc độ bơm nhập liệu trong khoảng $10 \div 12$ ml/phút, thì độ ẩm của bột đậm sau sấy phun không thay đổi và giữ ở mức 4,26%. Nhưng khi tăng tốc độ bơm nhập liệu > 12ml/phút thì độ ẩm của bột đậm sau sấy có xu thế tăng. Kết quả này chứng tỏ ở chế độ sấy phun dịch thủy phân sụn cá mập bổ sung maltodextrin theo tỉ lệ 12%, áp suất buồng sấy 2.5 bar và nhiệt độ buồng sấy 80°C thì tốc độ bơm nhập liệu > 12ml/phút là không phù hợp do tốc độ bơm nhập liệu lớn nên bột đậm không kịp khô vì thế độ ẩm của bột đậm tăng. *Như vậy, khi xét theo độ ẩm bột đậm thấp thì tốc độ bơm nhập liệu thích hợp nhất là 12ml/phút.*

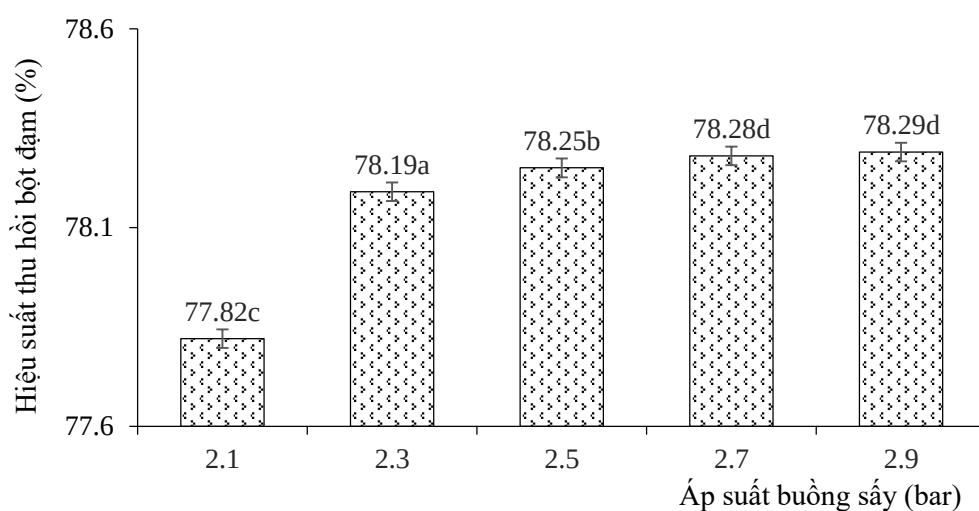
Từ tất cả những phân tích ở trên cho phép lựa chọn tốc độ bơm nhập liệu 12 ml/phút để sấy phun dịch thủy phân từ sụn cá mập.

3.3.5. Xác định áp suất buồng sấy

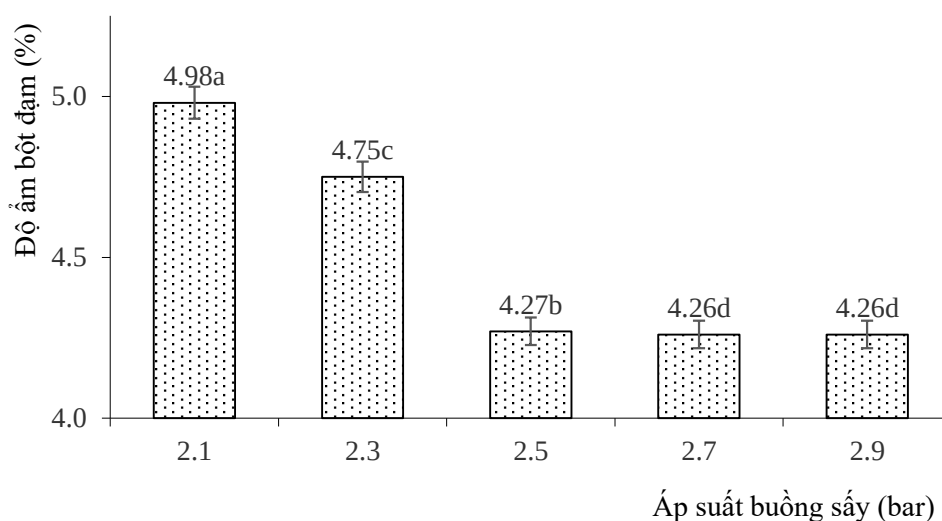
Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm sấy phun để tạo bột đậm từ dịch thủy phân sụn cá mập theo các thông số thích hợp đã chọn nhưng áp suất buồng sấy thay đổi: 2,1bar; 2,3bar; 2,5bar; 2,7bar và 2,9bar. Sau khi sấy phun lấy mẫu đánh giá độ ẩm, hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate và bột đậm. Kết quả được trình bày ở các hình 3.73 ÷ 3.75.



Hình 3.73. Ảnh hưởng của áp suất buồng sấy đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate



Hình 3.74. Ảnh hưởng của áp suất buồng sấy đến hiệu suất thu hồi bột đậm



Hình 3.75. Ảnh hưởng của áp suất buồng sấy đến độ ẩm của bột đậm

Từ kết quả phân tích trình bày ở các hình 3.73 ÷ 3.75

*** Về hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.73 cho thấy áp suất buồng sấy cũng có ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate. Cụ thể, trong quá trình sấy phun tạo bột đậm từ dịch thủy phân sụn cá mập, khi tăng áp suất buồng sấy trong khoảng 2,1 ÷ 2,5 bar, thì hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate cũng tăng theo trong khoảng từ 85,31% ÷ 86,44% và đạt hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate cao nhất 86,44% khi áp suất khí buồng sấy là 2,5 bar. Sau đó, nếu tiếp tục tăng áp suất buồng sấy > 2,5 bar thì hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate không tăng. Kết quả này chứng tỏ, áp suất khí buồng sấy 2,5 bar là phù hợp cho hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate cao trong bột đậm.

*** Về hiệu suất thu hồi bột đậm**

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.74 cũng cho thấy áp suất buồng sấy cũng có ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi bột đậm. Cụ thể, khi tăng áp suất khí buồng sấy trong quá trình sấy phun dịch thủy phân sụn cá mập trong khoảng 2,1 ÷ 2,5 bar, thì hiệu suất thu hồi bột đậm cũng tăng từ 77,82% ÷ 78,29% và đạt hiệu suất thu hồi bột đậm cao nhất khi áp suất khí buồng sấy là 2,5 bar. Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy sự khác biệt về hiệu suất thu hồi bột đậm khi sấy phun dịch thủy phân sụn cá mập trong khoảng áp suất buồng sấy 2,1 ÷ 2,5 bar có ý nghĩa thống kê cao. Sau đó nếu tiếp tục tăng áp suất buồng sấy > 2,5 bar thì hiệu suất thu hồi bột đậm tăng nhẹ, nhưng mức độ tăng không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này chứng tỏ, áp suất khí buồng sấy 2,5 bar là phù hợp cho hiệu suất thu hồi bột đậm cao nhất.

*** Về độ ẩm của bột đậm**

Kết quả phân tích cũng cho thấy tương tự: độ ẩm của bột đậm cũng thay đổi theo sự thay đổi của áp suất buồng sấy trong quá trình sấy phun dịch thủy phân từ sụn cá mập (hình 3.75). Cụ thể, khi thay tốc độ bơm nhập liệu trong khoảng 2,1 ÷ 2,5 bar, thì độ ẩm của bột đậm giảm từ 4,98% khi áp suất khí buồng sấy là 2,1 bar xuống mức 4,27% khi áp suất khí buồng sấy là 2,5 bar. Khi tiếp tục tăng áp suất buồng sấy > 2,5 bar thì độ ẩm của bột đậm sau sấy có xu thế giảm nhỏ hơn 4,27%, nhưng mức độ giảm không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này có nghĩa là tăng áp suất buồng sấy > 2,5 bar không làm giảm độ ẩm của bột đậm. Kết quả này chứng tỏ, áp suất buồng sấy 2,5 bar là phù hợp và đảm bảo cho độ ẩm của bột đậm thấp nhất. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi

cũng có những nét tương đồng với một số công bố về quá trình sấy phun dịch cô đặc chanh dây hay dịch cà chua đậm đặc của một số tác giả trên thế giới. Các nghiên cứu đều cho thấy áp suất khí buồng sấy từ 1,6 ÷ 3,0 bar là phù hợp [2, 23, 36, 60].

Từ những phân tích ở trên cho thấy áp suất buồng sấy 2,5bar là phù hợp cho quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập.

3.3.6. Tối ưu hóa quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập

3.3.6.1. Bố trí thí nghiệm theo biến X_4 ; X_5 , X_6 để hàm mục tiêu Y lớn nhất

Kết quả nghiên cứu sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập cho thấy có 3 thông số: nhiệt độ buồng sấy, tỷ lệ maltodextrin bổ sung, tốc độ bơm nhập liệu ảnh hưởng mạnh tới hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate trong bột đậm. Do vậy, luận án chọn 3 biến độc lập: Nhiệt độ buồng sấy (X_4) ($^{\circ}\text{C}$); Tỷ lệ maltodextrin bổ sung (X_5) (%), Tốc độ bơm nhập liệu (X_6) (ml/phút) để tiến hành quy hoạch thực nghiệm với hàm mục tiêu Hiệu suất thu chondroitin sulfate (Y mg/g) cao. Tiến hành quy hoạch thực nghiệm gồm 20 thí nghiệm như phân bố trí thí nghiệm. Kết quả thực nghiệm được trình bày ở bảng 3.8.

Bảng 3.8. Bố trí thí nghiệm và kết quả qui hoạch trực tâm quay (RCCD) của hàm mục tiêu Y (hiệu suất thu chondroitin sulfate) theo biến nhiệt độ buồng sấy (X_4), tỷ lệ maltodextrin (X_5) và tốc độ nhập liệu (X_6)

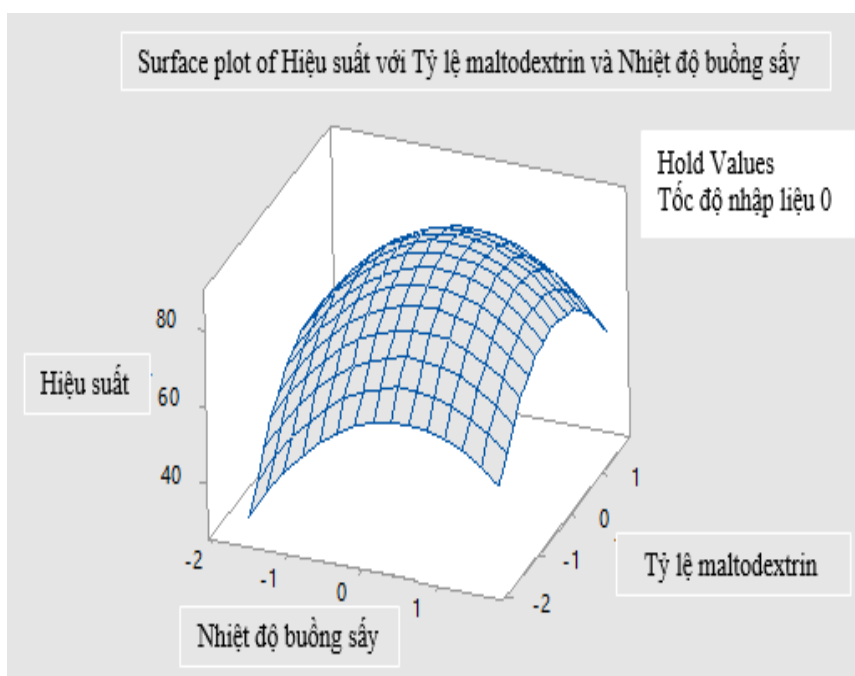
TN	Biến mã hóa			Hàm mục tiêu
	X_4	X_5	X_6	Y
1	0	1,681793	0	73,1
2	-1	-1	-1	56,5
3	0	0	1,681793	72,6
4	0	0	0	86,6
5	1,681793	0	0	73,5
6	0	0	0	86,7
7	-1	1	-1	65,7
8	1	-1	1	73,1
9	1	1	-1	68,2
10	0	0	0	86,5
11	0	-1,68179	0	51,3
12	1	1	1	71,5

13	1	-1	-1	66,9
14	-1,68179	0	0	51,5
15	0	0	0	86,5
16	0	0	0	86,8
17	0	0	-1,68179	52,3
18	-1	-1	1	68,2
19	0	0	0	86,4
20	-1	1	1	68,5

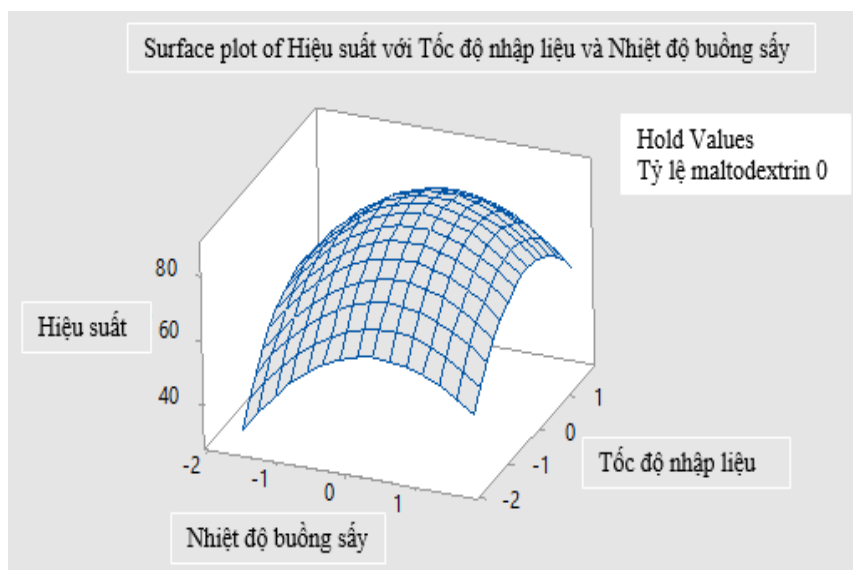
Phân tích hồi quy cho thấy $p = 0,013 < \alpha = 0,05$ tức mô hình hoàn toàn có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%. Như vậy hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate sau khi sấy được biểu diễn bằng hình bậc 2 như sau:

$$Y = 86,38 + 4,23 \cdot X_4 + 3,36 \cdot X_5 + 4,26 \cdot X_6 - 7,16 \cdot X_4^2 - 7,27 \cdot X_5^2 - 7,18 \cdot X_6^2 - 1,22 \cdot X_4 \cdot X_5 - 0,62 \cdot X_4 \cdot X_6 - 1,48 \cdot X_5 \cdot X_6$$

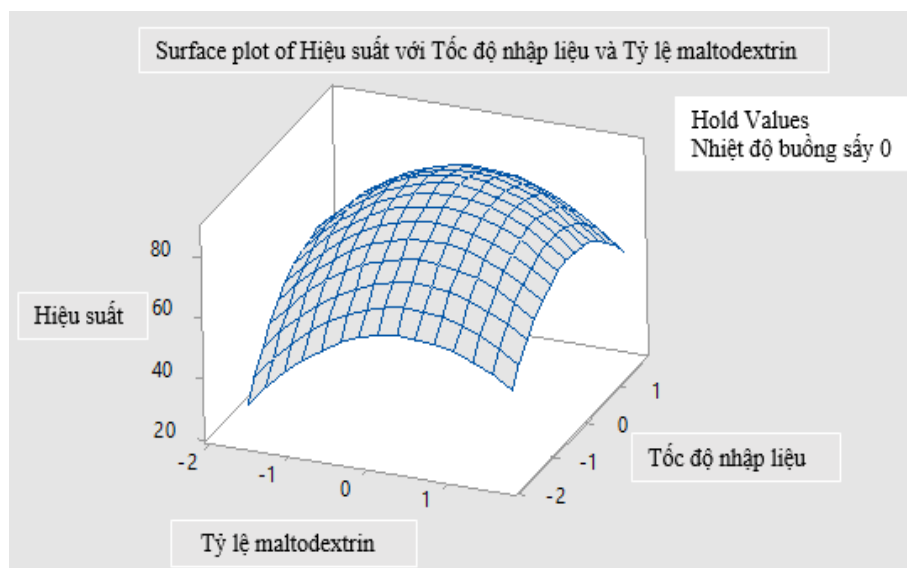
Lần lượt xét ảnh hưởng của từng yếu tố (khi các yếu tố khác giữ ở mức trung bình) đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate (Hình 3.76 ÷ 3.78) tỷ lệ maltodextrin/tổng chất khô hòa tan của dịch thủy phân và tốc độ bơm nhập liệu có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu suất thu hồi.



Hình 3.76. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nhiệt độ buồng sấy (X_4) và tỷ lệ maltodextrin (X_5) đến hiệu suất thu chondroitin sulfate



Hình 3.77. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nhiệt độ buồng sấy (X_4) và tốc độ nhập liệu (X_6) đến hiệu suất thu chondroitin sulfate



Hình 3.78. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa tỷ lệ maltodextrin (X_5) và tốc độ nhập liệu (X_6) đến hiệu suất thu chondroitin sulfate

Kết quả phân tích cũng cho thấy cả 3 nhân tố X_4 , X_5 và X_6 đều có tương tác với nhau và ảnh hưởng đến hàm mục tiêu hiệu suất thu chondroitin sulfate (Y). Cụ thể: kết quả trên hình 3.76 cho thấy tỷ lệ maltodextrin và nhiệt độ buồng sấy có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate. Đỉnh thể hiện hiệu suất thu chondroitin sulfate cao nhất là khoảng $86 \div 88\%$ khi biến $X_4=80^\circ\text{C}$ và $X_5=12\%$. Tương tự tại hình 3.77: tốc độ nhập liệu và nhiệt độ buồng sấy cũng ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate. Hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate đạt cao nhất $Y=87,81\%$ khi

$X_5=12\%$ và $X_6=12\text{ml/phút}$. Kết quả này cũng đúng với hình số 3.78: $X_5=12\%$ và $X_6=12\text{ml/ph}$ thì hiệu suất thu hồi bột đậm sẽ đạt cực đại là $Y=87,81\%$.

Kết quả trên có thể giải thích: hiệu suất thu chondroitin sulfate chịu ảnh hưởng nhiều nhất bởi tỷ lệ maltodextrin bổ sung và tốc độ bơm nhập liệu. Maltodextrin đóng vai trò là chất mang giúp gắn kết và bảo vệ các thành phần có dịch đậm thủy phân cũng như đảm bảo cho hỗn hợp khi sấy phun sẽ tạo ra bột có khối lượng phù hợp với tốc độ bốc thoát hơi nước với hiệu suất thu chondroitin sulfate cao nhất. Khi tỷ lệ maltodextrin bổ sung thấp, bột đậm tạo thành ở dạng bột mịn nên dễ bị bay lơ lửng theo hơi nước và bám lên thành thiết bị dẫn đến hiệu suất thu chondroitin sulfate thấp (hình 3.79). Tỷ lệ maltodextrin bổ sung tăng thì hiệu suất thu chondroitin sulfate tăng lên nhưng tỷ lệ maltodextrin bổ sung quá cao có thể làm bột đậm không kịp khô nên sẽ bị bay lơ lửng theo hơi nước dẫn đến hiệu suất thu chondroitin sulfate giảm [22, 33, 37]. Tốc độ bơm nhập liệu cũng ảnh hưởng tới hiệu suất thu chondroitin sulfate. Khi tốc độ bơm nhập liệu thấp, hỗn hợp chất mang và dịch thủy phân được bơm vào buồng sấy ít nên bột đậm tạo thành quá ít nên hiệu suất thu chondroitin sulfate thấp. Tốc độ bơm nhập liệu tăng, lượng chất mang và dịch thủy phân được bơm vào buồng sấy nhiều nên hiệu suất thu chondroitin sulfate cũng tăng nhưng chỉ tăng đến một mức độ nhất định khi lưu lượng dòng nhập liệu vượt quá tốc độ làm khô sẽ xảy ra hiện tượng sản phẩm không kịp khô nên dễ bị bốc thoát theo hơi nước ra ngoài vì thế hiệu suất thu chondroitin sulfate sẽ giảm. Kết quả này cũng có nét tương đồng với nghiên cứu của Seda và cộng sự (2007) về quá trình sấy phun dịch anthocyanin từ carot cho thấy nồng độ maltodextrin bổ sung có ảnh hưởng đến đặc tính và hiệu suất thu bột sấy phun [82]. Nghiên cứu của Seda cũng chỉ ra rằng rất khó để thu bột sấy phun nếu không bổ sung maltodextrin làm chất mang do bột sấy phun không bổ sung maltodextrin quá mịn bám dính trên thành của buồng sấy và thất thoát theo hơi nước nên không thể thu hồi được. Theo Seda và cộng sự, sử dụng maltodextrin làm chất trợ sấy đã cải thiện được những khó khăn trên và thu được sản phẩm [82]. Phan Tại Huân và cộng sự (2014) khi đánh giá về việc sấy phun bột gấc cũng cho rằng hàm lượng carotenoid trong bột gấc sấy phun giảm khi tăng nồng độ maltodextrin lên 10%, 20%, 30% (w/v) và khi tăng tỷ lệ maltodextrin trên 30% thì độ nhớt của dịch sấy phun tăng, dẫn tới khi sấy phun có hiện tượng tạo thành các giọt dịch lớn ở đầu béc phun. Vì vậy, quá trình làm khô trong buồng sấy chậm, dẫn tới bột gấc có

độ ẩm cao, đồng thời dịch sấy phun dễ bám dính vào đầu béc phun gây hiện tượng tắc béc phun [22].

3.3.6.2. Tối ưu hóa quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate

Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) ảnh hưởng của các nhân tố sấy đến hàm mục tiêu cho thấy các biến: X_4 , X_5 , X_6 , X_4^2 và X_5^2 có ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu ($p < 0,05$). Các biến khác (thể hiện trong bảng 3.9) mặc dù không có ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu ($p > 0,05$), nhưng vì các biến đơn có ảnh hưởng đáng kể nên các biến tương tác của chúng cũng được giữ lại trong mô hình để tiến hành tối ưu hóa.

Tiến hành xử lý số liệu bằng phần mềm Minitab 18 sử dụng thuật toán tối ưu (optimization) thu được mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của ba nhân tố sấy đến hàm mục tiêu như sau:

Bảng 3.9. Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) và hệ số tuyến tính, tương tác và bình phương của các phương trình hồi quy để dự đoán mức độ ảnh hưởng của các nhân tố sấy đến hàm mục tiêu

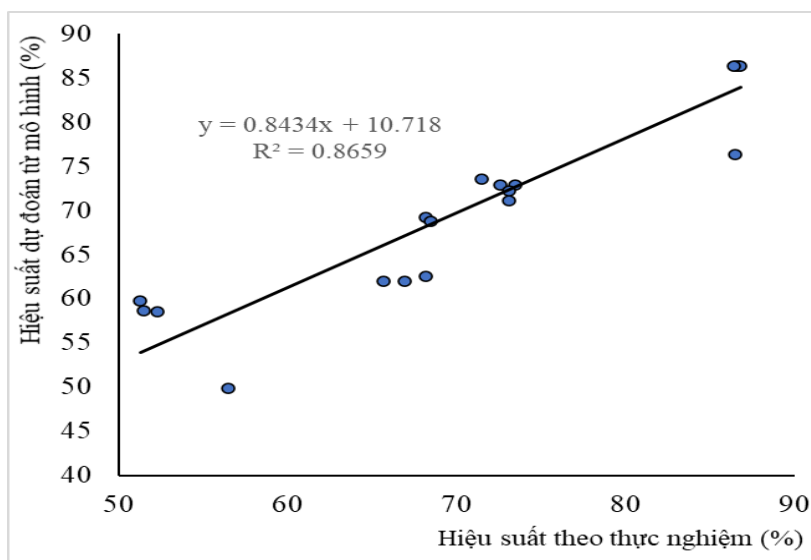
Nguồn	Bậc tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F-Value	P-Value
Model	9	2550,47	283,385	9,08	0,001
Linear	3	646,16	215,386	6,90	0,008
X_4	1	244,62	244,623	7,84	0,019
X_5	1	154,02	154,020	4,94	0,050
X_6	1	247,52	247,517	7,93	0,018
Square	3	1871,77	623,925	20,00	0,000
X_4^2	1	739,25	739,248	23,70	0,001
X_5^2	1	761,31	761,306	24,40	0,001
X_6^2	1	742,90	742,902	23,81	0,001
2-Way Interaction	3	32,53	10,845	0,35	0,049
$X_4^2 \times X_5$	1	12,01	12,005	0,38	0,049
$X_4^2 \times X_6$	1	3,12	3,125	0,10	0,050
$X_5^2 \times X_6$	1	17,40	17,405	0,56	0,047

Bảng 3.10. Kết quả tối ưu hóa hiệu suất thu chondroitin sulfate theo biến X_4 , X_5 , X_6

Variable	Setting
X_4	0,254817
X_5	0,186866
X_6	0,254817

Bảng 3.11. Giá trị tối ưu của hàm mục tiêu hiệu suất thu chondroitin sulfate theo nhiệt độ, tỷ lệ maltodextrin và tốc độ nhập liệu tìm được từ mô hình dự đoán

Response	Fit	SE Fit	95% CI	95% PI
HIỆU SUẤT	87,81	2,25	(82,81; 92,82)	(74,40; 101,23)



Hình 3.79. Mối tương quan giữa mô hình lý thuyết và thực nghiệm của các nhân tố sấy đến quá trình sấy phun tạo bột đậm từ dịch thủy phân sụn cá mập

Quá trình sấy phun được tiến hành sao cho thu được chondroitin sulfate trong bột đậm với hiệu suất cao nhất. Tiến hành giải bài toán tối ưu bằng cách chấp mục tiêu theo thuật toán “hàm mong đợi”. Kết quả tối ưu hóa thu được $X_4 = 80$ tức nhiệt độ buồng sấy là 80°C , $X_5=12$ tức tỷ lệ maltodextrin bổ sung là 12%, $X_6 = 12$ tức tốc độ bơm nhập liệu 12 ml/phút. Khi đó, hàm mục tiêu hiệu suất (Y) đạt 87,81% mong muốn và hàm lượng chondroitin sulfate, hàm lượng nitơ tổng của bột đậm lần lượt là 203 mg/g, 50mg/g bột.

Với điều kiện tối ưu này thì mục tiêu về hiệu suất thu chondroitin sulfate đạt 87,81% mong muốn (bảng 3.11) lớn hơn mục tiêu chung là 86,59% (hình 3.79).

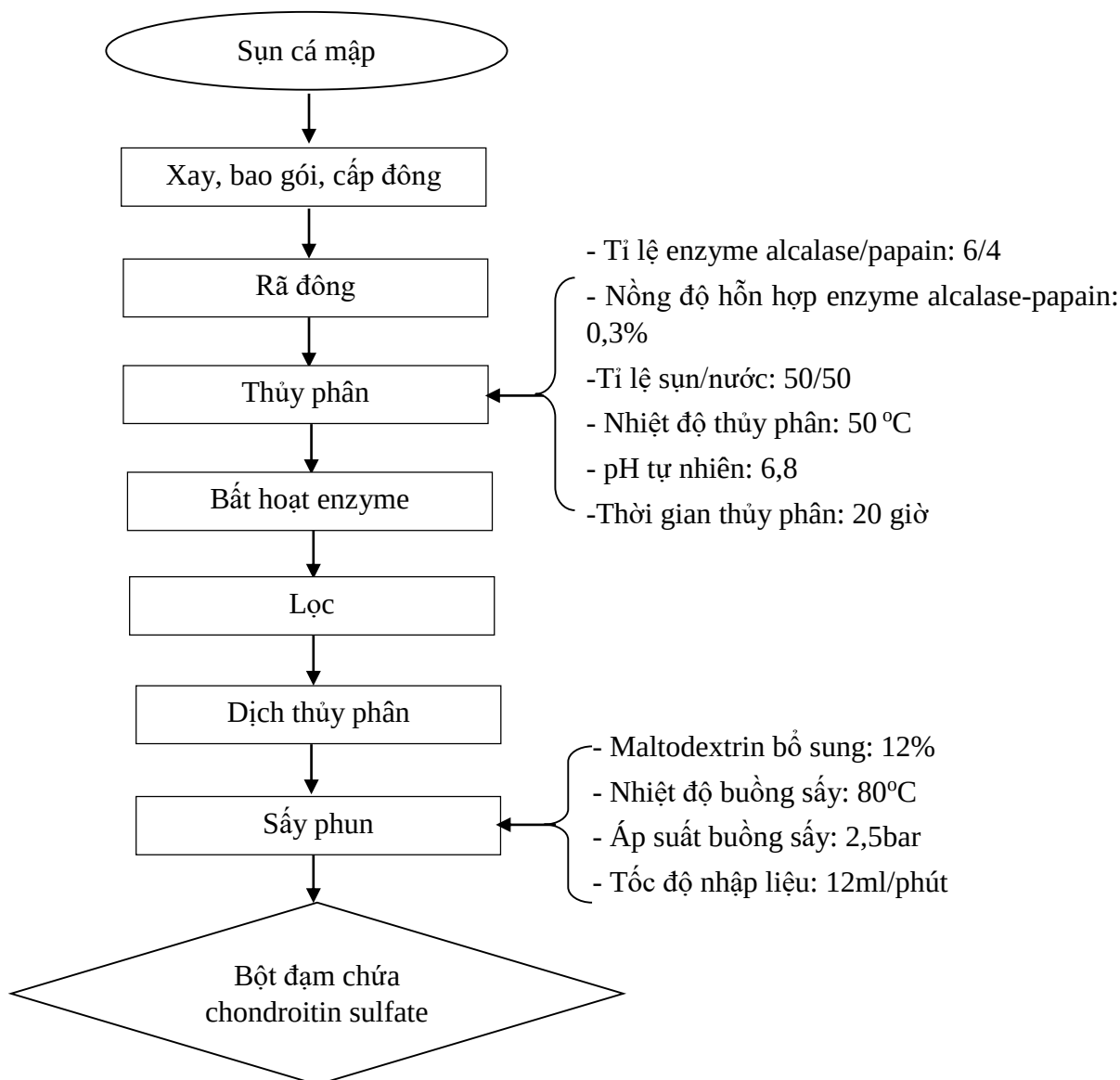
3.3.6.3. Thí nghiệm kiểm chứng

Tiến hành sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập với các thông số: tỷ lệ maltodextrin bổ sung là 12%, nhiệt độ không khí buồng sấy 80°C , tốc độ bơm nhập liệu 12 ml/phút. Thí nghiệm được tiến hành 3 lần cho kết quả hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate trong bột đậm đạt $(87 \pm 0,3)\%$ và hàm lượng chondroitin sulfate, hàm lượng nitơ tổng số của bột đậm lần lượt đạt $(203 \pm 0,13)$ mg/g và $(50 \pm 0,44)$ mg/g bột đậm.

3.3.7. Đề xuất quy trình sản xuất và đánh giá chất lượng bột đậm chứa chondroitin sulfate từ sụn cá mập

3.3.7.1. Đề xuất quy trình sản xuất bột đậm chứa chondroitin sulfate từ sụn cá mập

Từ các kết quả nghiên cứu ở trên cho phép đề xuất quy trình sản xuất bột đậm chứa chondroitin sulfate từ sụn cá mập trình bày ở hình 3.80.



Hình 3.80. Sơ đồ quy trình quy trình sản xuất bột đậm chứa chondroitin sulfate từ sụn cá mập trắng bằng enzyme protease

* Thuyết minh quy trình

+ **Sụn cá mập:** Cá mập được thu mua nguyên con tại cảng cá Vĩnh Lương - Nha Trang - 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 và làm sạch để thu sụn cá mập.

+ **Xay, bao gói và cấp đông:** tiến hành xay nhỏ sụn cá mập bằng máy xay thịt nhằm đồng nhất mẫu và bao gói bằng bao bì PA 2kg/túi, hút chân không 100%, cấp đông và bảo quản đông ở -20°C để dùng trong suốt quá trình nghiên cứu.

Hỗn hợp sụn cá mập có thành phần: Hàm lượng chondroitin sulfate: $41,77 \pm 0,21 \text{ mg/g}$, hàm lượng tro tổng số: $4,2 \pm 0,11 \text{ g/100g}$, hàm lượng nitơ tổng số: $2,64 \pm 0,02 \text{ g/100g}$, độ ẩm $80,7 \pm 1,12\%$.

+ **Rã đông:** Trước khi thủy phân tiến hành rã đông nhanh trong thời gian 2 phút trong lò vi sóng.

+ **Thủy phân:** Tiến hành thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain trong bể thủy phân theo các thông số kỹ thuật sau: Tỷ lệ enzyme alcalase/papain là 6:4; Nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase-papain là 0,3%, tỉ lệ sụn/nước là 50/50, nhiệt độ thủy phân 50°C , thủy phân ở pH tự nhiên (6,8) trong thời gian 20 giờ.

+ **Bất hoạt enzyme:** Kết thúc quá trình thủy phân, tiến hành bất hoạt enzyme bằng cách đun sôi dịch thủy phân trong thời gian 10 phút.

+ **Lọc:** tiến hành lọc sơ bộ hỗn hợp thủy phân qua 2 lớp vải lọc để thu dịch lọc thô. Sau đó, tiếp tục lọc dịch lọc thô qua hệ thống lọc hút chân không với kích cỡ lõi sứ cho phép các chất đi qua có kích cỡ nhỏ hơn $5\mu\text{m}$ để thu dịch lọc trong. Dịch lọc được đun sôi trong thời gian 10 phút và bảo quản ở ngăn mát tủ lạnh ($4 \pm 1^{\circ}\text{C}$) để dùng cho quá trình phân tích và nghiên cứu sấy phun.

+ **Sấy phun:** sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate với tỉ lệ maltodextrin bổ sung 12%, nhiệt độ buồng sấy 12°C , tốc độ nhập liệu là 12ml/phút.

+ **Sản phẩm:** Sản phẩm bột đậm thu được màu trắng.

3.3.7.2. Sơ bộ đánh giá chất lượng và tính chất nhiệt của bột đậm chứa chondroitin sulfate

Tiến hành sản xuất thử bột đậm chứa chondroitin sulfate theo quy trình đã đề xuất ở trên và đánh giá chất lượng, tính chất nhiệt của bột đậm. Kết quả trình bày ở bảng 3.12 ÷ 3.13 và hình 3.81.

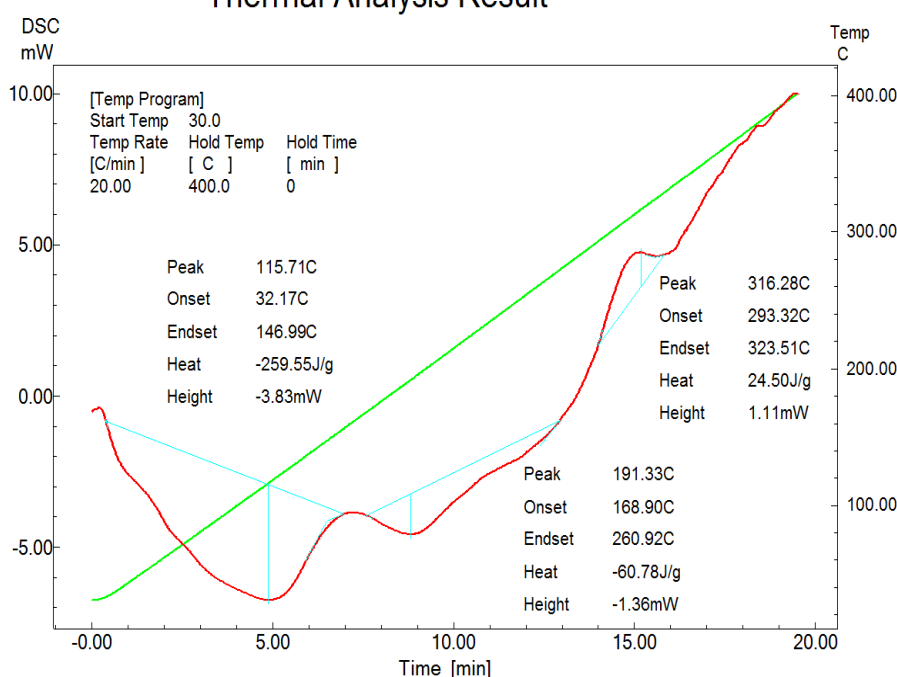
Bảng 3.12. Kết quả một số chỉ tiêu hóa học của bột đậm thủy phân

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả
1	Hàm lượng chondroitin sulfate	mg/g	203,00
2	Nitơ tổng	g/100g	5,04
3	Tro tổng số	g/100g	3,95
4	Độ ẩm	%	4,27

Bảng 3.13. Kết quả phân tích một số chỉ tiêu vi sinh của bột đậm chứa chondroitin sulfate

STT	Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả	Quy định QCVN 4 - 16: 2010/BYT
1	Tổng số VSV hiếu khí	CFU/g	10	< 5000
2	<i>Salmonella</i>	CFU/g	Neg	Âm tính
3	<i>Coliforms</i>	CFU/g	Neg	Âm tính
4	Tổng số bào tử nấm men, nấm mốc	CFU/g	Neg	< 500

(Neg: không phát hiện)

Thermal Analysis Result**Hình 3.81. Giải đồ phân tích nhiệt vi sai của bột đậm chứa chondroitin sulfate**

Từ các kết quả phân tích ở các bảng 3.12 ÷ 3.13 và hình 3.81 cho thấy:

*** Về thành phần hóa học của bột đậm chứa chondroitin sulfate:**

Kết quả phân tích ở bảng 3.12 cho thấy bột đậm chứa chondroitin sulfate giàu

khoáng chất và đậm, đặc biệt có hàm lượng chondroitin sulfate tới 203mg/g - đây là thành phần rất cần thiết cho việc tái tạo mô sụn, chống lão hóa sụn khớp ở con người.

*** Về chỉ tiêu vi sinh vật:**

Kết quả phân tích ở bảng 3.13 cho thấy bột đậm đạt yêu cầu về các chỉ tiêu vi sinh vật theo quy định của Bộ Y Tế.

*** Về phân tích nhiệt vi sai**

Kết quả phân tích nhiệt vi sai của bột đậm chứa chondroitin sulfate tại Trung tâm Công nghệ Bức xạ - Viện Hạt nhân Đà Lạt cho thấy có 3 quá trình thay đổi nhiệt của mẫu bột đậm chứa chondroitin sulfate. Quá trình chuyển đổi đầu tiên xảy ra giữa nhiệt độ từ 32,17⁰C đến 146,99⁰C, khu vực 1. Nhiệt độ chuyển hóa thủy tinh (T_g) được định nghĩa là nhiệt độ cần thiết để chuyển đổi trạng thái của một chất từ trạng thái lỏng thành chất rắn vô định hình như thủy tinh (hoặc ngược lại) được xác định tại nhiệt độ 115,71⁰C sự thay đổi công suất nhiệt của quá trình này là do quá trình mất nước và/hoặc dẫn chuỗi. Quá trình chuyển đổi thứ hai nằm giữa nhiệt độ ở 168,90⁰C đến 260,92⁰C quá trình này tượng trưng cho sự đứt gãy các liên kết trong chuỗi của phân tử làm thay đổi độ ổn định của chondroitin sulfate, đỉnh thu nhiệt nằm ở nhiệt độ 191,33⁰C. Quá trình thay đổi nhiệt độ cuối cùng nằm trong khoảng nhiệt độ 293,32⁰C đến 323,51⁰C với đỉnh tỏa nhiệt tại 316⁰C đại diện cho sự phân hủy của polysaccharid. Từ phân tích này cho thấy không nên sấy phun tạo bột đậm ở nhiệt độ cao 168⁰C. Kết quả này cho thấy việc chọn chế độ sấy phun của luận án là chính xác.

Từ những phân tích trên cho thấy bột đậm chứa chondroitin sulfate được sản xuất theo quy trình của luận án có chất lượng tốt và đạt các yêu cầu vi sinh vật theo Quy định hiện hành của Bộ Y Tế. Như vậy, bột đậm chứa chondroitin sulfate đã sản xuất đạt tiêu chuẩn chất lượng để dùng trong sản xuất thực phẩm chức năng.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT Ý KIẾN

1. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu ở trên cho thấy Luận án đã hoàn thành tất cả các nội dung và mục tiêu đã đặt ra, thể hiện qua các kết luận rút ra từ kết quả nghiên cứu như sau:

1) *Xác định được các thông số tối ưu cho quá trình thủy phân sụn cá mập là: hỗn hợp enzyme alcalase-papain theo tỷ lệ 60/40, với nồng độ hỗn hợp là 0,3%; Tỷ lệ nguyên liệu:nước là 1/1; pH thích hợp là 6,8; nhiệt độ thủy phân là 50°C trong thời gian 20 giờ. Hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate là 96,97%. Dịch đậm thủy phân có năng lượng dinh dưỡng: 20,42 Kcal/100 ml, hàm lượng chondroitin sulfate: 40,5 mg/ml, N tổng số: 7,46 g/l, khoáng tổng số: 3,02 g/l, Zn: 7,63 mg/l, Mg: 205 mg/l, Fe: 4,78 mg/l, 18 loại acid amin và đạt tiêu chuẩn an toàn thực phẩm theo quy định hiện hành của Bộ Y tế.*

2) *Xác định được cấu trúc đặc trưng bảo toàn cả hai gốc sulfate C4 và C6 của sản phẩm chondroitin sulfate. Sản phẩm là hỗn hợp gồm 2 đồng phân GlcA-GalNAc-4SO3- và GlcA-GalNAc-6SO3-.*

3) *Xác định được các thông số tối ưu cho quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập là: 12% chất mang maltodextrin, nhiệt độ buồng sấy là 80°C, tốc độ dòng 12 ml/phút và áp suất buồng sấy 2,5bar. Hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate là 87,81%. Sản phẩm có hàm lượng chondroitin sulfate là 203mg/g, nito tổng số 5,04g/100g, tro tổng số 3,95g/100g, độ ẩm 4,27% và đạt tiêu chuẩn vi sinh vật dùng trong thực phẩm theo qui định của Bộ Y tế.*

4) *Xác định được qui trình sản xuất bột đậm thủy phân chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập tươi bằng enzyme protease ở quy mô thí nghiệm. Sản phẩm bột đậm chứa chondroitin sulfate đạt tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm theo quy định hiện hành của Bộ Y tế.*

2. ĐỀ XUẤT Ý KIẾN

Từ quá trình nghiên cứu ở trên cho phép đề xuất một số ý kiến như sau:

1) *Cần tiếp tục nghiên cứu hoàn thiện quá trình sản xuất dịch thủy phân và bột đậm thủy phân chứa chondroitin sulfate từ sụn cá mập bằng phương pháp thủy phân sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain ở quy mô lớn để tính toán chi phí phục vụ cho*

việc định hướng thương mại hóa sản phẩm.

2) Cần tiếp tục nghiên cứu đánh giá về các peptid có trong dịch thủy phân sụn cá mập để biết được hoạt tính sinh học của chúng đối với sức khỏe con người.

3) Cần triển khai ứng dụng dịch thủy phân và bột đậm chứa chondroitin sulfate trong sản xuất thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị thoái hóa xương khớp.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. 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).
2. Đinh Hữu Đông, Vũ Ngọc Bội, Nguyễn Thị Mỹ Trang (2020), “Ảnh hưởng của tỷ lệ giữa enzyme alcalase và papain đến quá trình thủy phân sụn cá mập (*Carcharhinus dussumieri*)”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Số 387, Kỳ 12 (6.2020), pp. 60-66 (ISSN 1859-4581).
3. Đinh Hữu Đông, Vũ Ngọc Bội, Nguyễn Thị Mỹ Trang (2020), “Ảnh hưởng của nồng độ enzyme và thời gian đến quá trình thủy phân sụn cá mập (*carcharhinus dussumieri*)”, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Trường Đại học Nha Trang, Số 2.2020, pp. 10-19 (ISSN 1859-2252).
4. Vũ Ngọc Bội, Đinh Hữu Đông, Nguyễn Thị Mỹ Trang (2020), “Ảnh hưởng của một số thông số đến quá trình sấy phun dịch đậm thủy phân từ sụn cá mập (*Carcharhinus dussumieri*)”, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Trường Đại học Nha Trang, Số 3.2020, pp. 10-22 (ISSN 1859-2252).
5. Đinh Hữu Đông, Vũ Ngọc Bội, Nguyễn Thị Mỹ Trang, Nguyễn Anh Tuấn (2020), “Tối ưu hóa quá trình sấy phun dịch thủy phân sụn cá mập (*Carcharhinus dussumieri*)”. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Trường Đại học Nha Trang, Số 3.2020, pp. 112-122 (ISSN 1859-2252).
6. Đinh Hữu Đông, Vũ Ngọc Bội, Nguyễn Thị Mỹ Trang (2021), “Tối ưu hóa quá trình thủy phân sụn cá mập (*Carcharhinus dussumieri*) bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain theo phương pháp mặt đáp ứng”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Số 5, Kỳ 1 (3.2021), pp. 65-73 (ISSN 1859-4581).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng việt

1. Bezborodov A. M., Moxolov V. V., Riabinovich M. L., Nguyễn Văn Uyên, Ngô Kế Sương, Trần Hạnh Phúc, Võ Hồng Nhân và Nguyễn Tiến Thắng (1994), *Công nghệ Sinh học và một số ứng dụng tại Việt Nam*, Tập 2, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Đặng Văn Hợp (2000), *Hoàn thiện qui trình công nghệ chiết xuất protease từ Aspergillus oryzae A₄ và ứng dụng vào sản xuất nước mắm*, Luận án tiến sĩ kỹ thuật, Trường đại học Thủy Sản, Nha Trang.
3. Đặng Văn Hợp, Đỗ Minh Phụng, Vũ Ngọc Bội và Nguyễn Thuần Anh (2010), *Phân tích kiểm nghiệm thực phẩm thủy sản*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
4. Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Thu Thủy và Nguyễn Xuân Sâm (2012), *Công nghệ enzyme*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
5. Lê Minh Châu, Jean Pascal Berge, Nguyễn Thị Mỹ Hương, Khổng Thị Thanh và Vũ Ngọc Bội (2017), “Thủy phân cá trích *Sardina pilchardus* bởi enzyme Protex 51 FP và Protamex”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Số 23, tr. 97-102.
6. Lê Ngọc Tú, La Văn Chúc, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thắng, Bùi Đức Hợi, Lưu Duân và Lê Doãn Diên (1997), *Hóa sinh học công nghiệp*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
7. Lê Ngọc Tú, La Văn Chúc, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thắng, Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lưu Duân và Lê Doãn Diên (2003), *Hóa học Thực phẩm*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
8. Ngọc Ánh, Mạc Thị Hà Thanh (2019), “Nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp sấy phun đến chất lượng sản phẩm bột nhào”, *Tạp chí điện tử và khoa học công nghệ*, Vol 17, No11
9. Nguyễn Cảnh (2004), *Quy hoạch thực nghiệm*, Nxb. Đại học Quốc gia TP. HCM.
10. Nguyễn Hữu Chấn (1983), *Enzyme và xúc tác sinh học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
11. Nguyễn Lâm Dũng, Đào Trọng Hùng và Ngô Khắc Truy (1964), *Nghiên cứu ứng dụng enzyme vào chế biến nước mắm*, Báo cáo tổng kết đề tài cấp tỉnh Quảng Ninh,

Trường Đại học tổng hợp Hà Nội.

12. Nguyễn Thị Dư, Ngô Thị Mai (1991), “Nghiên cứu rút ngắn chu kỳ sản xuất nước mắm 10 – 15 ngày”, *Tạp chí bảo quản và chế biến thủy sản*, số 2, tr. 3-4.

13. Nguyễn Văn Lê (1996), *Nghiên cứu sử dụng proteinase đầu tôm trong chế biến thủy sản*, Luận án phó tiến sĩ khoa học sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học quốc gia Hà Nội, Hà Nội.

14. Nguyễn Văn Long, Võ Sĩ Tuấn (2012), “Tình hình khai thác nguồn lợi cá nhám/mập ở vùng biển từ Quảng Ngãi đến Bình Thuận”, *Tạp chí khoa học và Công nghệ biển*, DOI: 10.15625/jmst.v12i4.2577.

15. Nguyễn Thị Hồng Minh, Nguyễn Thị Thùy Ninh (2011), “Tối ưu hóa quá trình sấy phun dịch cà chua”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, Số 9(6), Tr. 1014 ÷ 1020.

16. Nguyễn Thị Vĩnh, Phạm Thị Trân Châu (1993), “Nghiên cứu một số tính chất của các proteinase P-I và P-II tách từ dịch chiết thịt rắn hổ mang (*Naja naja*)”, *Tạp chí Sinh học* 15(1), tr. 29-34.

17. Phạm Thị Hải Âu, Nguyễn Thúy Hương (2010), *Nghiên cứu ứng dụng công nghệ enzym để sản xuất sản phẩm protein thủy phân từ cá tạp và phế liệu trong nhà máy chế biến cá*, Báo cáo khoa học, Viện Công nghiệp Thực phẩm Hà Nội.

18. Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Lâm Dũng (1983), “*Những hiểu biết mới về enzyme*”, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

19. Phạm Thị Trân Châu, Phan Tiến Hòa và Nguyễn Thị Bảo (1987), “Thành phần và một số tính chất của chế phẩm Bromelain chồi ngọn Dứa tây (*Ananas comosus* L. Group Queen)”, *Tạp chí Sinh học* 9(4), tr. 3–9.

20. Phạm Thị Trân Châu, Phan Thị Hà, Nguyễn Tuyết Mai, Nguyễn Cẩm Vân và Nguyễn Lâm Dũng (1991), “Nghiên cứu enzyme, chất ức chế trypsin nhằm nâng cao chất lượng bột dinh dưỡng cho trẻ em”, *Tạp chí Khoa học*, Số 3, Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội, Hà Nội.

21. 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).

22. Phan Tại Huân, Phạm Đức Toàn và Kha Chấn Tuyền (2014), *Gấc và công nghệ sản xuất tiềm năng*, Báo cáo phân tích xu hướng công nghệ, Trung tâm Thông tin

Khoa học và Công nghệ, Sở Khoa học và Công nghệ, TP. HCM.

23. Trần Cảnh Đình, Võ Hoài Bắc, Nguyễn Lan Anh, Nguyễn Duy Thuần, Nguyễn Bích Thu, Nguyễn Hữu Hoàng và Vũ Xuân Sơn (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.

24. Trần Thị Luyến (1994), *Nghiên cứu qui luật biến đổi của nitơ; acid amin và nâng cao hiệu xuất thu đạm trong sản xuất nước mắm*, Luận án phó tiến sĩ khoa học kỹ thuật, Trường Đại học Thủy sản, Nha Trang.

25. 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 và Kỹ thuật, tập 1, Hà Nội.

26. Võ Hoài Bắc, Đỗ Ngọc Tú, Trần Cảnh Đình và Lê Thị Lan Oanh (2010), “Nghiên cứu tách chiết chondroitin sulfate từ xương sụn cá đuối (*Dasyatis kuhlii*) và cá nhám (*Carcharhinus sorrah*) bằng công nghệ sinh học”, *Tạp chí Viện nghiên cứu Hải sản*, Số 16, tr. 26-30, Hải Phòng.

27. Vũ Ngọc Ân, Lê Đăng Phan (1990), “Nguồn lợi và khả năng khai thác hải sản ở các tỉnh ven biển miền Trung”, *Tạp chí Thủy sản*, Số 4, tr. 7-14, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Hà Nội.

28. Vũ Ngọc Bội (2001), “Nghiên cứu tách chiết và một số đặc tính của proteinase ngoại bào của *Bacillus subtilis*”, *Tạp chí di truyền học và ứng dụng*, Hội di truyền học Việt Nam, Số 1, tr. 9-16.

29. Vũ Ngọc Bội (2003), “Ảnh hưởng của nồng độ ethanol tới quá trình thủy phân cơ thịt cá mòi bằng protease *Bacillus subtilis*”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, Trường Đại học Thủy sản, Số 3, tr. 6-8.

30. Vũ Ngọc Bội (2003), *Nghiên cứu sản xuất protease từ Bacillus subtilis và sử dụng để sản xuất dịch đạm thủy phân từ cá tạp*, Báo cáo đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, Mã số: B2000 - 33 -33, Trường Đại học Thủy sản Nha Trang.

31. Vũ Ngọc Bội (2004), *Nghiên cứu quá trình thủy phân protein cá bằng enzyme protease từ B. subtilis S5*, 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.

32. Vũ Ngọc Bội, Lê Hương Thủy, Phạm Thị Hương và 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, tr. 18-26.

33. Vũ Thị Hằng, Vũ Thị Kim Oanh, Nguyễn Xuân Bắc, Phạm Mai Hương và Nguyễn Thị Hoàn (2015), “Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy tới chất lượng bột màng đỏ hạt gấc”, *Tạp chí khoa học và phát triển*, tập 13, số 5: , tr. 755-763.

34. Vũ Thị Thanh Tâm (2012), “Nghiên cứu quy trình thu nhận Chondroitin sulfate từ nguyên liệu thủy sản bằng phương pháp sinh học”, *Luận văn thạc sĩ*, Trường Đại học Nha Trang.

Tiếng Anh

35. Ambros (1950), “The elastolytic activity of pancreatic extracts”, *Biochem Journal*, Volume 46, issue 4, pp. 384–387.

36. Anlin L., Shuangli X. (2010), “*Preparation and Structure Analysis of Chondroitin Sulfate from Pig Laryngeal Cartilage*”, Department of Bioscience and Biotechnology, Southwest University of Science and Technology Mianyang, Sichuan Province, China, 621010. 978-1-4244-4713-8/10/©2010 IEEE

37. Anair T. Fields et al., (2019), “Application of quality by design for optimization of spray drying process used in drying of Risperidone nanosuspension”, *Elsevier, Powder technology*, Vol 342, pp. 156-165.

38. Andrew et al (2018) “Species composition of the international shark fin trade assessed through a retailmarket survey in Hong Kong”, *Sociesty for Conservation Biology*, <https://doi.org/10.1111/cobi.13043>Citations: 31.

39. Antonilli L., 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.

40. Arun S., Iva Filkova (2002), “*Handbook of Industrial Drying*”, Vol 1, Part II: Industrial Spray Drying Systems, Denmark, pp. 263-305.

41. AOAC (2014), “*Standard method performance requirements for the determination of total chondroitin sulfate in dietary ingredient. and supplements*”. http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/SPDS/SMPR%25202014_009.pdf

42. Agiba A. M. (2017), “Nutraceutical formulations containing glucosamine and chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: emphasis on clinical efficacy and

formulation challenges”, *Int. J. Curr. Pharma. Res.*, Vol. 2, pp. 1-7.

43. Banca. J. Ha, Joney. Y. L. (2003), “The Effect of Chondroitin Sulfate against CCl₄-Induced Hepatotoxicity”, *Biol. Pharm. Bull*, Vol. 6, pp. 622-626.

44. Bascoul C., Garaiova C., Plummer I., Harwood S. F., Caterson . L. and Hughes C. E. (2016). “*Glucosamine hydrochloride but Not chondroitin sulfate prevents cartilage degradation and inflammation induced by interleukin-1 α in bovine cartilage explants*”. *Cartilage* 7, pp. 70-81. <http://dx.doi.org/10.1177/1947603515603762>.

45. Bhathal A., Spryszak M., Louizos C. and Frankel G. (2017), “Glucosamine and chondroitin use in canines for osteoarthritis: A review”, *Open Veterinary Journal*, Vol. 7, No. 1, pp. 36–49. doi:10.4314/ovj.v7i1.6. PMC 5356289. PMID 28331832.

46. Bombara N., Anon M. C. and Pilosof A. M. (1994), “Thermal stability of a neutral protease of *Aspergillus oryzae*”, *Journal of food biotechnology*, No. 18, pp. 31 – 41.

47. Bruce C., Fatemeh M., Michael J. S., Tim E. H., Michael T. B., Stephen. C., Anthony R. and Helen M. (2016), “Modulation of native chondroitin sulphate structure in tissue development and in disease”, *Journal of Cell Science* 97, pp. 411-417.

48. Bruyere O., Reginster J. Y. (2007), “*Glucosamine and chondroitin sulfate as therapeutic agents for knee and hip osteoarthritis*”, *Drugs Aging*, 24(7): pp. 573-580.

49. Collin E. C., Carroll O., Kilcoyne M., Peroglio M., See E., Hendig D., Alin M., Grad S. and Pandit A. (2017), “*Ageing affects 534 chondroitin sulfates and their synthetic enzymes in the intervertebral disc*”, *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2:17049. doi: 535 10.1038/sigtrans.2017.49.

50. Corvisat (1857), *Isolation and Properties of Pepsin and Trypsin*, Current Science Association, Vol 4, issue 6, pp. 370-376.

51. Cheng C. Y., Duan Z. H., Duan W. W., Yang H. and Lei X. G. (2013), “*Extraction of Chondroitin Sulfate from Tilapia Byproducts with Ultrasonic-Microwave Synergistic*”, College of Food Science and Tecknology, HaiNan University, China.

52. Chervan, Munir and Coworker (1984), *Protein hydrolysis*, University of Illinois Foundation, Urbana, IL, US.

53. Corso C. R., et al (2009), “Bioremediation of Dyes in Textile Effluents by *Aspergillus oryzae*”, *Springer*, Vol 7, pp. 384-397.

54. Daniel C. (2017), "Sharks can live a lot longer than researchers realized", Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature, All rights reserved, Vol. 549, 21 September 2017, pp. 316.
55. Dong H., Ahn, Hoon K. and Pack M. (1993), "Cleavage of *Bacillus subtilis* endo- α -1,4-glucanase by *B. megaterium* protease", *Biotechnology letters*, GBR, Vol. 15, No. 2, pp. 127-132.
56. Farndale W. R., Buttle D. J. and Barrett A. J. (1986), "Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue", *Biochim. Biophys. Acta*. 883: pp. 173-177.
57. Garnjanagoonchorn W., Wongekalak L. and Engkagul A., (2007), "Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage", *Chemical Engineering and Processing*, No. 46, pp. 465-471.
58. Goncari .R, Zuber H. (1970), "Thermophilic aminopeptidases: AP I from *Bacillus stearothermophilus*", *Elsevier*, Vol. 19, pp. 544-552.
59. Guan X., Yao H., (2008), "Optimization of viscozyme L assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology", *Food Chemistry*, 106, pp. 345-351.
60. Giu. Q. L., Quang. Z. I. and Jun. F. S (2007), "Optimization of extraction technology of chondroitin sulfate from eggshell membrane", *Food Science, China*, Vol. 28, pp. 283-286.
61. Gonchar A., Auslender V. (1996), "Immobilization of bacterial proteases on water-solved polymer by means of electron beam", *Radiation physics and chemistry*, GBR, Vol. 48, No. 6, pp. 795-797.
62. Hartley B. S. (1960), *Proteolytic enzymes*, Ann., Rev., Biochem., pp. 29-54.
63. Henrotin Y., Marty M. and Mobasheri A. (2014), "What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis?" *Maturitas* 78, pp. 184–187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.04.015>.
64. Jan P. (2002), *Handbook of Industrial Drying*, Vol 1, Part III: Evaporation and Spray Drying in the Dairy Industry, Denmark, pp. 715-743.
65. Julia E., Maxwell S. (1950), *Separation of chondroitin sulfate from cartilage*, Department of Chemistry and the Study Group on Rheumatic Diseases, New York University College of Medicine, New York, pp. 725-730.

66. Jayaraman J. (1998), "*Laboratory manual in biochemistry*", Wiley Eastern Limited, New Delhi.
67. Kang C. W., Shin S. C., You S. J. And An B. K. (2006), "Study on Extraction of Mucopolysaccharide-protein Containing Chondroitin Sulfate from Chicken Keel Cartilage Electrophoresis", *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, Vol. 19, No. 4, pp. 601-604.
68. Kerry T. Y., James M. C. (1970), "*Bacillus subtilis* neutral protease", *Proteolytic enzymes, Methods in enzymology*, Vol. XIX, Academic Press, pp. 569-577.
69. Kunamneni A., Singh S. (2005), "Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of maize starch for higher glucose production". *Biochemical Engineering Journal* 27, 2: pp.179-190.
70. Lin F. W., Devenish R. (1993), "Expression of *Bacillus subtilis* neutral protease gene (nprE) in *Saccharomyces cerevisiae*", *JGM. Journal of general microbiology*, GBR, Vol. 139, No. p.2, pp. 343-347.
71. Maccari F., Galeotti F. and Volpi N. (2015), "Isolation and structural characterization of chondroitin sulfate from bony fishes", *561 Carbohydr. Polym.*, Vol. 20, pp. 129-143. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.059
72. Macano. C. Ch., et al., (2005), "Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional charecterization", *Innovative food science & Emerging technologies*, 5 (4), pp. 420-428.
73. Mohammad R. I. S., et al., (2016), "Optimization of spry drying parameters for pink guava powder using RSM", *Food Science and Biotechnology*, 25, pp. 461-468.
74. Müller & Henle (1839), *Distribution, movements, and habitat use of bull sharks (Carcharhinus leucas) in the Indian river Lagoon system*, Lorida, University of Florida, pp. 130.
75. Nadezhda E. U., Maria I. B., Elena G. P., Nadezhda P. S., Andrey S. D., Eugenia A. T., Natalia A. U., Alexander S. S., Nikolay E. N. and Anatolii I. U. (2018), "Structure and Anti-Inflammatory Activity of a New Unusual Fucosylated Chondroitin Sulfate from *Cucumaria djakonovi*", *Marine Drugs*, Vol. 16, No. 10, pp. 389-396.
76. Nakano 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, pp. 205-208.

77. Rammireva L. V., Overchenko M. B., Serba E. M. and Trifonova V. V. (1997), "Comperative characterization of microbial protease by the extent of hydrolysis of protein substrates", *Applied biochemistry and microbiology*, Vol. 33, No. 1.

78. Renata V. T., Catherine B., Miriam D. and Hubinger B. (2010), "Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray dried açai (*Euterpe oleracea Mart.*) juice produced with different carrier agents", *Food Research International*, Vol. 43, pp. 907-914.

79. Robert M. L. (2009), "Chondroitin sulphate: A complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems", *Complementary Therapies in Medicine*, 17: pp. 56-62.

80. Saenz, et al., (2009), "Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*)", *Food chemistry*, 114, pp. 616-622.

81. Schiraldi N., Restai N. O. F., De R. M. and Cimini D. C. (2013), "Manufacturing chondroitin sulfate: from animal source extraction to 582 biotechnological production In V. H. Pomin (Eds.), *Chondroitin Sulfate: Structure, Uses and Health Implications*, New York: No.va Science Publishers, pp. 41-56.

82. Seda E., Unal Y. (2007), "Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota L.*) by spray drier", *Journal of Food Engineering*, 80, pp. 805-812.

83. See S. F., Hoo L. L. and Bab J. (2011), "Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase", *International Food Research Journal* 18(4): 1359-1365 Program of Food Science, School of Chemical Sciences and Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia.

84. Seung Y. C., Don W. C., Hee S. K., Soo H. C., Gi S. J. and Kyung Y. S. (2003), "A sizeexclusion HPLC method for the determination of sodium chondroitin sulfate in pharmaceutical preparations", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 3, pp. 1229-1236.

85. Somashekar P.L., et al. (2011), "Colorimetric estimation of Chondroitin Sulfate in bulk drug and pharmaceutical formulation using cationic dye Methylene Blue", *Scholars Research Library*, ISSN 0975-413X, Vol 3 (No.1), pp. 90-96.

86. Souich P., Iovu M. and Dumais G. (2008), "Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate", *Osteoarthritis Cartilage*, Vol. 16, (No. 3), pp. 8-14.
87. Siew Y. Q., Ngan K. C. and Peter S. (2007), "The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders", *Chemical Engineering and Processing*, 46 (2007), pp. 386÷392.
88. Shil S. C., You S. J., Anb K. and Kang C. W. (2006), "Study on extraction of mucopolysaccharide-protein containing chondroitin sulfate from chicken keel cartilage", *Asian-australasian journal of animal sciences*, 19(4): pp. 601-604.
89. Shu., et al. (2006), "Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying", *Journal of food engineering*, 76, pp.664-669.
90. Volpi N. (2004), "Disaccharide mapping of chondroitin sulfate of different origins by high performance capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography", *Carbohydr. Polym.*, Vol. 55, pp. 273-281.
91. Volpi N. and Maccari F. (2008), "Quantitative and qualitative evaluation of chondroitin sulfate in dietary supplements", *Food Analytical Methods*, Vol. 1, No. 3, pp. 195-204.
92. Vergés M., Pelletier J., Farran A., Montell E. J. and Pelletier J. P. (2015), "Discrepancies in composition and biological effects of 564 different formulations of chondroitin sulfate", *Molecules*, Vol. 20, No. 3, pp. 4277-4289. doi:10.3390/molecules20034277.
93. Vittajanon M. and Jaroenviriyapap T. (2014), "Production of crude chondroitin sulfate from duck trachea", *International Food Research Journal*, Vol. 21, No. 2, pp.791-797.
94. Wana. L. G, Pang H. Lu, (2007), "Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Neural Development and Regeneration," *Progress in physiological sciences*, China, Vol. 38, pp. 101-105.
95. Xie, J., Ye H. Y. and Luo X. F (2014), "An efficient preparation of chondroitin sulfate and collagen peptides from shark cartilage", *International Food Research Journal* 21(3): 1171-1175 (2014)
96. Yang S., Eaton C. B., McAlindon T. E. and Lapane K. L. (2015), "Effects of glucosamine and chondroitin supplementation on knee osteoarthritis: an analysis with

marginal structural models”, *Arthritis Rheumatol.* (Hoboken, N. J.) 67, 714–723.
doi:<http://dx.doi.org/10.1002/art.38932>.

97. 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, pp. 205 -208.

98. 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.

99. Zafer., et al. (2015), “Optimization of spray drying process in cheese powder production”, *Food and Bioproducts processing*, Vol 93, pp.156-165.