

**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**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Chuyên ngành: Công nghệ chế biến thủy sản

Mã số : 9540105

KHÁNH HÒA – 2021

Công trình được hoàn thành tại Trường Đại học Nha Trang

**Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Vũ Ngọc Bội
PGS.TS. Nguyễn Anh Tuấn**

Phản biện 1: GS.TS. Nguyễn Anh Dũng

Phản biện 2: PGS.TS. Nguyễn Thị Mỹ Hương

Phản biện 3: PGS.TS. Ngô Đại Nghiệp

**Luận án được bảo vệ tại Hội đồng đánh giá luận án cấp Trường tại
Trường Đại học Nha Trang
vào hồi 8 giờ 00 ngày 26 tháng 11 năm 2021**

**Có thể tìm hiểu luận án tại: Thư viện Quốc gia
Thư viện Trường Đại học Nha Trang**

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 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.*

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN 1
PGS.TS. Vũ Ngọc Bội

NGHIÊN CỨU SINH

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN 2
PGS. TS. Nguyễn Anh Tuấn

Đinh Hữu Đông

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Chondroitin sulfate (CS) 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. Chondroitin sulfate còn làm tăng sản xuất chất nhầy và khả năng bôi trơn của dịch khớp, đảm bảo chức năng vận động linh hoạt của khớp. Chondroitin sulfate còn có vai trò bảo vệ sụn khớp bằng cách ức chế các enzyme phá hủy sụn khớp. Vì vậy, chondroitin sulfate được sử dụng để hỗ trợ điều trị các bệnh lý về xương khớp, hạn chế quá trình thoái hoá khớp. Ngoài ra, chondroitin sulfate cũng góp phần nuôi dưỡng và tái tạo các tế bào của giác mạc mắt.

Chondroitin sulfate chủ yếu được thu nhận từ các nguồn nguyên liệu tự nhiên. Trong đó, sụn cá mà đặc biệt là sụn cá mập thường có hàm lượng chondroitin sulfate cao hơn các loại động vật khác. Chính vì thế, người ta thường sử dụng sụn cá trong hỗ trợ điều trị các bệnh xương khớp. Chondroitin sulfate thường liên kết với protein bằng liên kết o-glycosid tạo thành một proteoglycan nằm trong cấu trúc của mô sụn nên con người rất khó hấp thụ. 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. Tuy vậy, việc chỉ thu nhận chondroitin sulfate dẫn đến sự lãng phí nguồn các chất tự nhiên từ sụn cá và hiệu quả sử dụng không cao. 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 chondroitin sulfate và các chất từ sụn cá định hướng sử dụng làm thực phẩm giúp hỗ trợ điều trị bệnh lý xương khớp và chống thoái hóa xương khớp. Do vậy, Luận án tiến hành: *“Nghiên cứu sản xuất bột đậm thủy phân chứa chondroitin sulfate từ sụn cá mập trắng (Carcharhinus dussumieri) bằng enzyme protease”*.

2. Mục tiêu của luận án

Tận dụng nguồn nguyên liệu còn lại - sụn cá mập tươi trong chế biến

tạo dịch thủy phân và bột đậm chứa chondroitin sulfate và các chất tự nhiên từ sụn cá mập (*C. dussumieri*) bằng công nghệ enzyme protease thân thiện với môi trường định hướng sử dụng làm thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị chống thoái hóa xương khớp.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

3.1. Đối tượng nghiên cứu

Sụn cá mập trắng (*C. dussumieri*) khai thác tại vùng biển Khánh Hòa.

3.2. Phạm vi nghiên cứu

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 đậm thủy phân chứa chondroitin sulfate.*

4. Phương pháp nghiên cứu

Luận án sử dụng các phương pháp nghiên cứu cơ bản của Hoá sinh học, vi sinh vật có sự hỗ trợ của các lý thuyết toán học để phát hiện ra các tính chất mới, các mối quan hệ giữa các đại lượng và kiểm chứng các giả thuyết. Các kết quả thí nghiệm đều được xử lý thống kê, kiểm định so sánh các giá trị trung bình giữa các nhóm bằng phần mềm Box-Behnken, ANOVA, Minitab 20 và JMP 10. Ngoài ra luận án cũng sử dụng các phương pháp thường sử dụng trong phân tích cấu trúc các chất để phân tích cấu trúc của chondroitin sulfate.

5. Các đóng góp mới về khoa học

- 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 đậm thủy phân chứa chondroitin sulfate. Kết quả nghiên cứu của luận án có ý nghĩa về khoa học và làm phong phú thêm các hiểu biết về khả năng sử dụng protease trong thủy phân sụn cá mập.

- Luận án đã xác định được hỗn hợp enzym alcalase - papain là tác nhân thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập (*C. dussumieri*) và xác định được các thông số tối ưu cho quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain. Mặt khác, luận án cũng xác định được các số thông số tối ưu cho quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập. Kết quả nghiên cứu của luận án khi được áp dụng trong thực tế sẽ góp phần tạo ra sản phẩm thực phẩm có chứa chondroitin sulfate ứng dụng làm thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị các bệnh lý về xương khớp và chống thoái hóa khớp.

- Luận án cũng xác định được cấu trúc của chondroitin sulfate từ sụn cá mập (*C. dussumieri*) là một hỗn hợp gồm 2 đồng phân, bao gồm chondroitin - 4 - sulphate với mảnh cấu trúc đặc trưng là GlcA-GalNAc-4SO₃⁻ và chondroitin - 6 - sulphate với mảnh cấu trúc đặc trưng là GlcA-GalNAc-6 SO₃⁻.

6. Kết cấu của luận án

Luận án gồm 155 trang, 38 trang phụ lục, 8 trang liệt kê 93 tài liệu tham khảo. Nội dung luận án gồm 3 chương, trong đó có 17 bảng và 101 đồ thị, hình ảnh.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. GIỚI THIỆU VỀ CHONDROITIN SULFATE VÀ ỨNG DỤNG

*** Cấu trúc của 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. Các gốc đường này có thể được sulphate hóa hay không bị sulphate hoá, 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 $10.000 \div 100.000$ Dalton.

CS thường gắn với các protein bằng liên kết o-glycosid tạo thành một phức chất proteoglycan (PG). CS 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. GAG là thành phần chính của mô sụn. PG 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.

*** Kỹ thuật thu nhận chondroitin sulfate**

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. 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, ...). Phương pháp này đã được áp dụng để thu CS từ sụn gà, sụn bò. 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 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. 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 và tách CS ra khỏi các polysaccharid khác.

*** Ứng dụng của chondroitin sulfate**

CS đã được sử dụng rộng rãi như một chế phẩm thực phẩm bổ sung dinh dưỡng 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. 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 phím nước mắt trước giác mạc, tăng cường độ đàn hồi của thấu kính, chống tình trạng khô mắt. 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. Ngoài ra CS còn 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. 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, vẩy nến, chàm, luput ban đỏ, ... Nhiều nghiên cứu cho thấy CS có khả năng tăng cường kháng viêm, ức chế sự tiết các cytokine tiền viêm và các gốc oxy hóa tự do.

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

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. 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, ...

Đặc khu hành chính Hồng Kong của Trung Quốc, một trong những trung tâm thương mại mua bán vây cá mập lớn nhất thế giới. 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. 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. Hiện có rất ít quốc gia đánh cá lưu giữ dữ liệu một cách chính xác về việc đánh bắt cá mập theo loài.

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. 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. 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 và sản lượng khai thác. 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.

*** 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, 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, ... Các sản phẩm từ sụn cá mập được quảng cáo là nguồn bổ sung chất dinh dưỡng và khoáng chất tốt cho sức khỏe con người.

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

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, việc sử dụng hóa chất như NaOH trong thủy phân sẽ làm cho sản phẩm không “xanh” và “sạch”. Vì vậy, việc nghiên cứu tìm kiếm các biện pháp thủy phân sụn động vật bằng enzyme protease thân thiện với môi trường là hướng nghiên cứu cần thiết.

Ở Việt Nam hiện 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 bằng phương pháp sử dụng chế phẩm enzyme protease từ *B. subtilis* B26 để thủy phân. Tuy nhiên thời gian thủy phân kéo dài và chưa xác định được cấu trúc của CS. Mặt khác nghiên cứu này cũng chỉ dừng ở việc kết tủa thu nhận chondroitin sulphate và chưa có ứng dụng cụ thể.

1.4. GIỚI THIỆU VỀ KỸ THUẬT SẤY PHUN

Sấy là quá trình làm bốc hơi nước ra khỏi vật liệu ở dạng lỏng dưới tác dụng của nhiệt độ. Trong quá trình sấy, nước được tách ra khỏi vật liệu nhờ sự khuếch tán do chênh lệch độ ẩm giữa bề mặt và bên trong vật liệu, chênh lệch áp suất hơi riêng phần của nước tại bề mặt vật liệu và môi trường xung quanh.

Nguyên liệu của quá trình sấy phun thường là 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.

Trên thế giới và Việt Nam có nhiều công trình công bố về nghiên cứu sấy phun dịch chiết từ 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. Sấy phun là kỹ thuật sấy có thể bảo tồn các chất

trong thực phẩm tốt nhất và thích hợp cho việc làm khô các loại dịch thực phẩm. Do vậy, luận án định hướng sử dụng kỹ thuật sấy phun để sấy dịch thủy phân từ sụn cá mập.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU

* **Sụn cá mập:** Cá mập (*C. dussumieri*) 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, 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

* **Enzyme protease:** các enzyme protease: neutrase là chế phẩm protease thương mại do công ty Advanced enzyme Technologies Ltd - India sản xuất và cung cấp tại Việt Nam. Alcalase và flavourzyme là chế phẩm protease thương mại do hãng Novozyme - Đan Mạch cung cấp. Papain thương mại do Merck - Đức sản xuất.

* **Chất mang:** các chất mang: maltodextrin và saccharose do Nhật Bản sản xuất. Gum arabic thực phẩm do Trung Quốc sản xuất.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

*** Các phương pháp nghiên cứu protease và chondroitin sulfate**

- Xác định hoạt độ protease theo phương pháp Anson.
- Định lượng CS bằng phương pháp so màu theo Farndale và cộng sự.
- Phương pháp xác định hiệu suất thu hồi chondroitin sulfate trong quá trình thủy phân và sản xuất bột đậm được tính bằng tỷ lệ phần trăm (%) giữa tổng lượng CS có trong dịch thủy phân sụn cá mập hoặc bột đậm so với tổng lượng chondroitin sulfate có trong nguyên liệu sụn cá mập hoặc dịch thủy phân.

*** Các phương pháp phân tích hóa học**

- Định lượng protein hòa tan theo phương pháp Lowry.
- Định lượng N_{aa} theo phương pháp Sorensen.
- Định lượng N_{NH_3} theo phương pháp chưng cất lôi cuốn theo hơi nước.
- Định lượng lipid theo phương pháp Soxhlett.
- Xác định hàm lượng nước: theo phương pháp sấy đến khối lượng không đổi ở $105^{\circ}C$ theo TCVN 1867:2001.
- Xác định hàm lượng tro: hàm lượng tro được xác định bằng phương pháp nung đến khối lượng không đổi ở $600^{\circ}C$ theo TCVN 5611 - 1991.
- Xác định thành phần ion kim loại bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS.
- Định lượng peptid theo phương pháp dựa vào đường chuẩn tyrosine.
- Xác định thành phần và hàm lượng acid amin bằng phương pháp sắc ký lỏng theo AOAC 994.12 (2012).
- Xác định năng lượng dinh dưỡng: theo CAC/GL-2/1985 (Rev.1-1993) FAO.

*** Các phương pháp phân tích cấu trúc của chondroitin sulfate**

Phân tích nhóm chức trong CS bằng kỹ thuật phân tích phổ hồng ngoại (IR) và cấu trúc của chondroitin sulfate phân tích bằng phổ 1H -NMR, phổ ^{13}C -NMR, phổ HSQC, phổ COSY, phổ HMBC, xác định tính chất nhiệt của CS bằng phân tích nhiệt quét vi sai bù năng lượng

DSC-60.

*** Phương pháp định lượng vi sinh vật**

Xác định hàm lượng vi sinh vật: tổng số vi khuẩn hiếu khí, tổng số bào tử nấm men, nấm mốc, *Coliforms*, *Salmonella* bằng phương pháp đếm khuẩn lạc.

2.3. 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 – Benkhen 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 3. 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

Tiến hành lấy mẫu sụn 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 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.

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

3.1.2. Nghiên cứu lựa chọn enzyme protease thủy phân sụn cá mập

Tiến hành thí nghiệm thủy phân hỗn hợp sụn cá mập bằng các enzyme protease khác nhau: neutrase, alcalase, flavourzyme, papain và hỗn hợp enzyme alcalase và papain theo tỷ lệ 1/1. 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} cho thấy sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase + papain để thủy phân sụn cá mập sẽ tốt hơn so với các loại enzyme khác. Vì vậy hỗn hợp enzyme alcalase + papain được lựa chọn để thủy phân sụn cá mập cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.3. Nghiên cứu xác định tỷ lệ giữa enzyme alcalase và papain đến quá trình thủy phân sụn cá mập

Tiến hành thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain với tỷ lệ alcalase/papain khác nhau và 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 theo thời gian thủy phân cho thấy tỉ lệ hỗn hợp enzyme alcalase/papain bằng 60/40 là phù hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập.

3.1.4. Nghiên cứu xác định nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase và papain đến quá trình thủy phân sụn cá mập

Quá trình nghiên cứu thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain với nồng độ hỗn hợp enzyme trong khoảng 0,1% ÷ 0,5%, bước nhảy là 0,1%. Kết quả phân tích cho thấy nồng độ hỗn hợp enzyme alcalase - papain thích hợp là 0,3%.

3.1.5. Nghiên cứu xác định tỉ lệ nước bổ sung đến quá trình thủy phân sụn cá mập

Tiến hành thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain với lượng nước bổ sung khác nhau cho thấy sử dụng tỉ lệ sụn/nước bằng 50/50 là phù hợp.

3.1.6. Nghiên cứu xác định pH thích hợp cho quá trình thủy phân sụn cá mập

Tiến hành thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain ở các pH khác nhau cho thấy tự nhiên (pH= 6,8) là phù hợp.

3.1.7. Nghiên cứu xác định nhiệt độ thích hợp đến quá trình thủy phân sụn cá mập

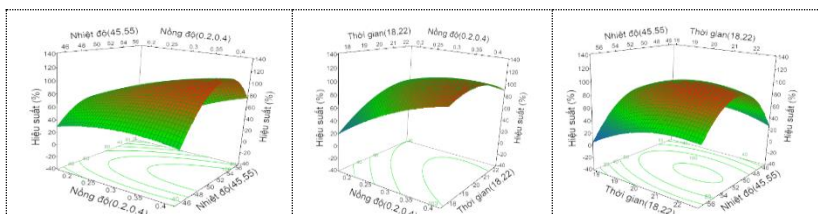
Kết quả thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzym alcalase - papain ở các nhiệt độ thủy phân khác nhau *cho thấy sử dụng hỗn hợp enzyme alcalase - papain với nhiệt độ thủy phân sụn cá mập ở 50⁰C là thích hợp.*

3.1.8. Nghiên cứu xác định thời gian thích hợp đến quá trình thủy phân sụn cá mập

Tiến hành thí nghiệm thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase-papain và tiến hành đánh giá hàm lượng protein hòa tan, hàm lượng peptid, hàm lượng N_{aa}, N_{NH3} và hàm lượng chondroitin sulfate theo thời gian thủy phân cho thấy khoảng thời gian thích hợp cho quá thủy phân sụn cá mập trong khoảng 20 ÷ 22 giờ.

3.1.9. Tối ưu hóa quá trình thủy phân

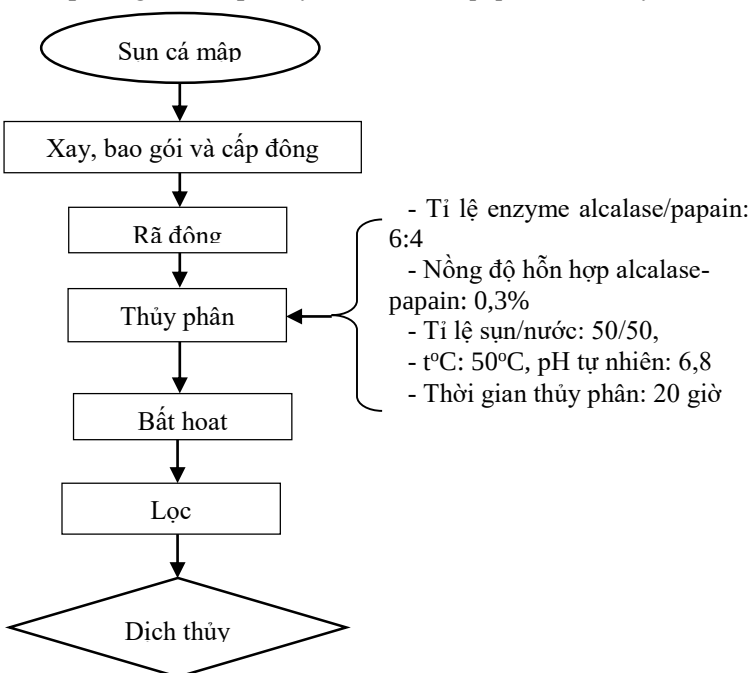
Sử dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm trực giao cấp I để tiến hành tối ưu hóa quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase + papain (Hình 3.2) cho thấy điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase + papain để thu nhận chondroitin sulfate: nồng độ enzyme alcalase – papain là 0,3%, nhiệt độ thủy phân là 50⁰C, thời gian thủy phân là 20 giờ. Khi đó hiệu suất thủy phân đạt 96,97% và hàm lượng chondroitin sulfate, hàm lượng nitơ tổng của dịch thủy phân lần lượt là 40,5 mg/mL và 7,46 g/lit dịch thủy phân.



Hình 3.2. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nồng độ enzyme (X1), nhiệt độ (X2) và thời gian (X3) đến hiệu suất thủy phân tạo chondroitin sulfate cao

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 3.3.



Hình 3.3. Sơ đồ quy trình thủy phân sụn cá mập bằng hỗn hợp enzyme alcalase - papain

* Thuyết minh quy trình

+ **Sụn cá mập:** 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 $80,7 \pm 1,12\%$.

+ **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.

+ **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%, tỷ 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 sủ 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 (hình 3.4).



Hình 3.4. 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

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 trình bày ở bảng 3.2 ÷ 3.4 cho thấy dịch thủy phân sụn cá mập ở dạng lỏng, sánh, có màu vàng nhạt, mùi vị đặc trưng và rất giàu năng lượng 20,42 Kcal/100ml, giàu khoáng chất, đặc biệt giàu Magie: 205,49 mg/lít và kẽm 7,63mg/lít - đây là những khoáng chất rất cần cho sức khỏe của con người. Ngoài ra dịch thủy phân có chứa 18 acid amin 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. Kết quả phân tích cũng cho thấy dịch thủy phân sụn cá mập 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.

Bảng 3.2. 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/100 ml	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 3.3. 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 3.4. 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

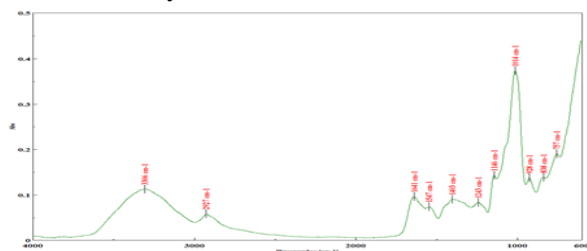
(Neg: không phát hiện)

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.

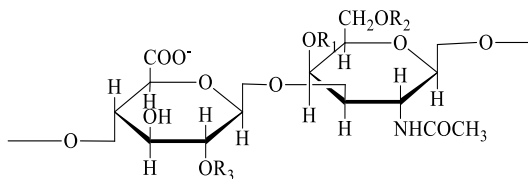
* Dự đoán nhóm chức trong cấu trúc của chondroitin sulfate bằng phổ FT-IR

Kết quả phân tích phổ FTIR tại Trung tâm Công nghệ Bức xạ - Viện Hạt nhân Đà Lạt trình bày ở hình 3.5.



Hình 3.5. Kết quả xác định các nhóm chức của chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân từ sụn cá mập dựa vào phổ FTIR

Từ kết quả trên có thể dự đoán nhóm chức trong cấu trúc của chondroitin sulfate của dịch thủy phân sụn cá mập dựa ở hình 3.6.



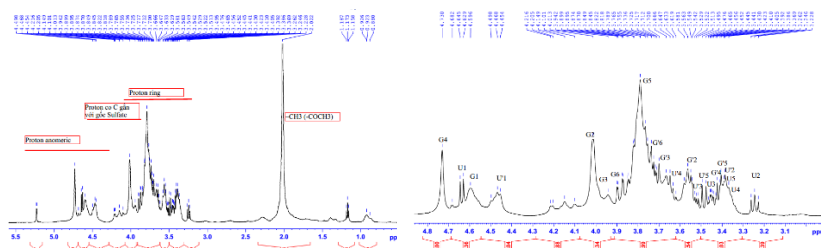
Hình 3.6. Dự đoán nhóm chức trong cấu trúc chondroitin sulfate từ sụn cá mập

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

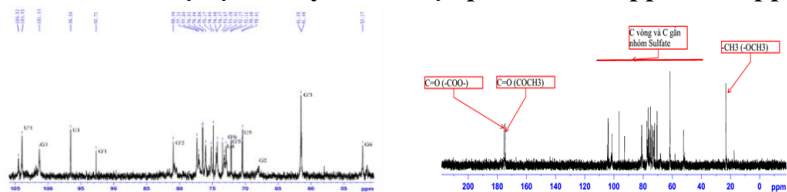
$R_1 = \text{SO}_3^-$, $R_2 = R_3 = \text{H}$: Chondroitin - 4 - sulfate (CSA)

$R_2 = \text{SO}_3^-$, $R_1 = R_3 = \text{H}$: Chondroitin - 6 - sulfate (CSC) acetyl-D-galactosamine (GalNAc) qua liên kết glucozit (1-3).

Để xác định cấu trúc chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân sụn cá mập, luận án tiến hành phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$, phổ $^{13}\text{C-NMR}$, phổ HSQC, phổ COSY, phổ HMBC. Kết quả phân tích ở các hình 3.7÷3.12.



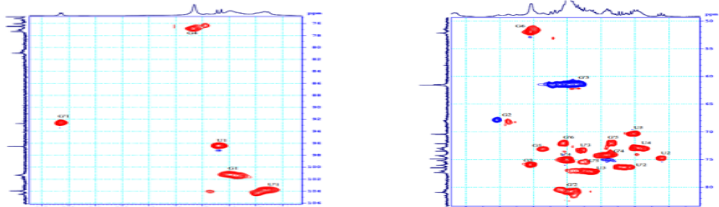
Hình 3.7. Tín hiệu cấu trúc chondroitin sulfate thu được bằng phổ ¹H-NMR với độ dịch chuyển hóa học proton từ 0,0ppm ÷ 5,2ppm



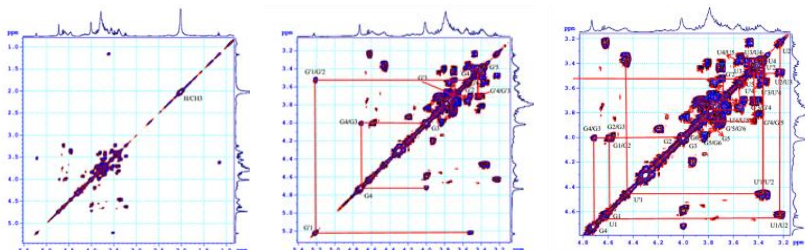
Hình 3.8. Tín hiệu cấu trúc chondroitin sulfate thu được bằng phổ ¹³C-NMR với độ dịch chuyển hóa học proton từ 0ppm ÷ 200ppm

Bảng 3.5. Bảng gán các tín hiệu dị nhân của H/C trên phổ HSQC

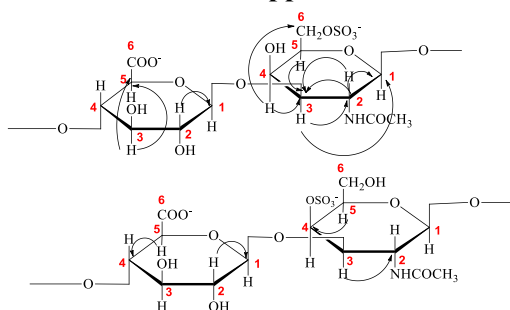
H/C	GlcA (U)		GlcA (U')		GalNAc-6S (G)		GalNAc-4S (G')	
H1/C1	4,63/96,54	U1	4,46/103,95	U'1	4,59/101,33	G1	5,23/92,71	G'1
H2/C2	3,24/74,40	U2	3,41/76,46	U'2	4,01/68,23	G2	3,78/80,94	G'2
H3/C3	3,45/77,33	U3	3,65/77,33	U'3	3,94/76,04	G3	3,78/61,45	G'3
H4/C4	3,38/72,93	U4	3,89/74,89	U'4	4,73/77,09	G4	3,61/74,27	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



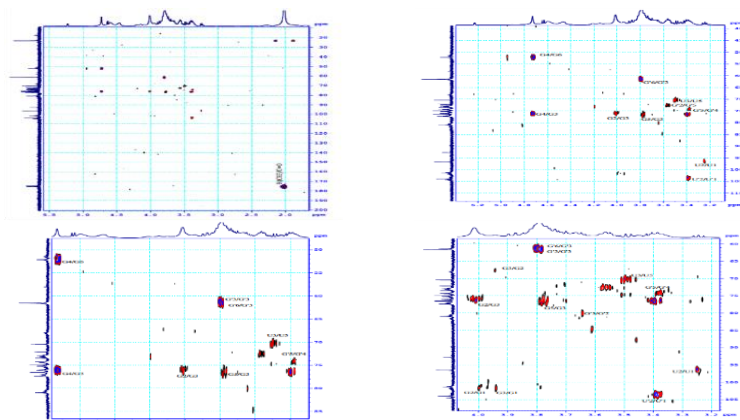
Hình 3.9. Tín hiệu cấu trúc chondroitin sulfate bằng phổ HSQC dựa vào độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 3,1÷4,5ppm và C từ 50 ÷ 85ppm



Hình 3.10. Tín hiệu cấu trúc chondroitin sulfate bằng phổ COSY dựa vào độ dịch chuyển hóa học proton của H từ 3,1÷4,5ppm và C từ 50 ÷ 85ppm

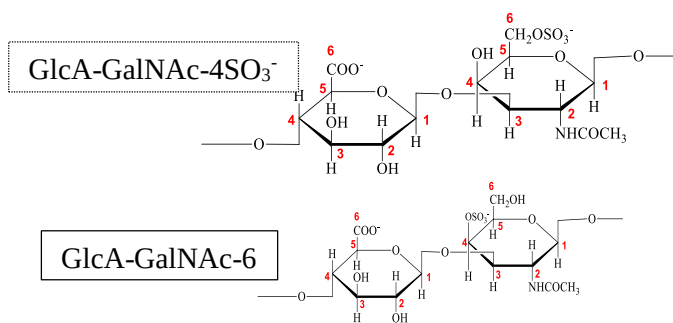


Hình 3.11. Cấu trúc chondroitin sulfate thu được bằng phổ HMBC



Hình 3.12. Cấu trúc chondroitin sulfate thu được bằng phổ HMBC

Từ kết quả phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$, phổ $^{13}\text{C-NMR}$, phổ HSQC, phổ COSY, phổ HMBC có thể khẳng định cấu trúc của chondroitin sulfate từ sụn cá mập (*C. dussumieri*) là một hỗn hợp gồm 2 đồng phân, bao gồm chondroitin - 4 - sulphate (CSA) (GlcA-GalNAc-4S) với mảnh cấu trúc đặc trưng là GlcA-GalNAc-4SO₃⁻ và chondroitin - 6 - sulphate (CSC) (GlcA-GalNAc-6S) với mảnh cấu trúc đặc trưng là GlcA-GalNAc-6 SO₃⁻ (Hình 3.11)



Hình 3.13. Cấu trúc chondroitin sulfate có trong bột đậm thủy phân từ sụn cá mập

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

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

Tiến hành sấy phun tạo bột đậm thủy phân từ dịch thủy phân sụn cá mập với các mang khác nhau: maltodextrin, gum arabic, saccharose. Sau khi sấy phun thu chế phẩm bột đậm và lấy mẫu xác định hàm lượng nitơ tổng, hàm lượng chondroitin sulfate, hiệu suất thu hồi sản phẩm. Kết quả phân tích cho thấy maltodextrin là chất mang phù hợp quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate và các thành phần khác có trong dịch thủy phân sụn cá mập.

3.3.2. Xác định tỉ lệ maltodextrin bổ sung đến hiệu suất thu hồi chondroitin và bột đậm

Kết quả 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, với tỷ lệ maltodextrin sử dụng khác nhau cho thấy tỷ lệ maltodextrin bổ sung

12% là thích hợp.

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

Tiến hành 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 cho thấy tỉ lệ maltodextrin bổ sung thích hợp là 12%.

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

Kết quả 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 12% và nhiệt độ buồng sấy thay đổi trong khoảng: 70°C÷90°C cho thấy nhiệt độ buồng sấy 80°C là phù hợp với quá trình sấy phun 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 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 trong khoảng 10mL/phút÷14mL/phút cho thấy tốc độ bơm nhập liệu 12 mL/phút là phù hợp.

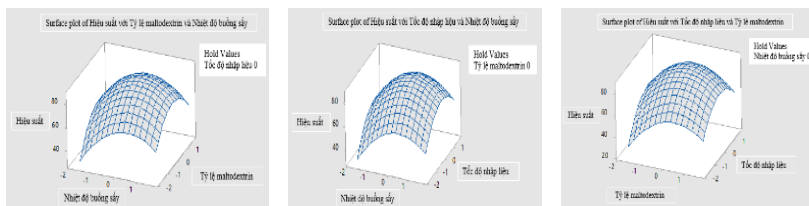
3.3.5. Xác định áp suất buồng sấy

Từ những phân tích về quá trình sấy phun tạo bột đậm từ dịch thủy phân sụn cá mập theo các thông số thích hợp đã chọn với áp suất buồng sấy thay đổi trong khoảng 2,1bar ÷2,9bar cho thấy áp suất buồng sấy 2.5bar là phù hợp.

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

Tiến hành tối ưu hóa quá trình sấy phun tạo bột đậm chứa chondroitin sulfate từ dịch thủy phân sụn cá mập theo phương pháp quy hoạch tâm xoay (hình 3.12) xác định các thông số tối ưu: nhiệt độ buồng sấy là 80°C, tỷ lệ maltodextrin bổ sung là 12%, tốc độ bơm nhập liệu 12

ml/phút. Từ các thông số tối ưu này, luận án đã tiến hành sản xuất thử bột đậm thủy phân và xác định được hiệu suất sấy phun tính theo hàm lượng chondroitin đạt 87,81% so với hàm lượng chondroitin sulfate có trong dịch thủy phân, tương ứng với hàm lượng chondroitin sulfate có trong bột đậm là 203 mg/g và hàm lượng nitơ tổng là, 50mg/g bột.



Hình 3.14. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối tương quan giữa nhiệt độ buồng sấy (X4), tỷ lệ maltodextrin (X5) và tốc độ nhập liệu (X6) đến hiệu suất thu chondroitin sulfate cao

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

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

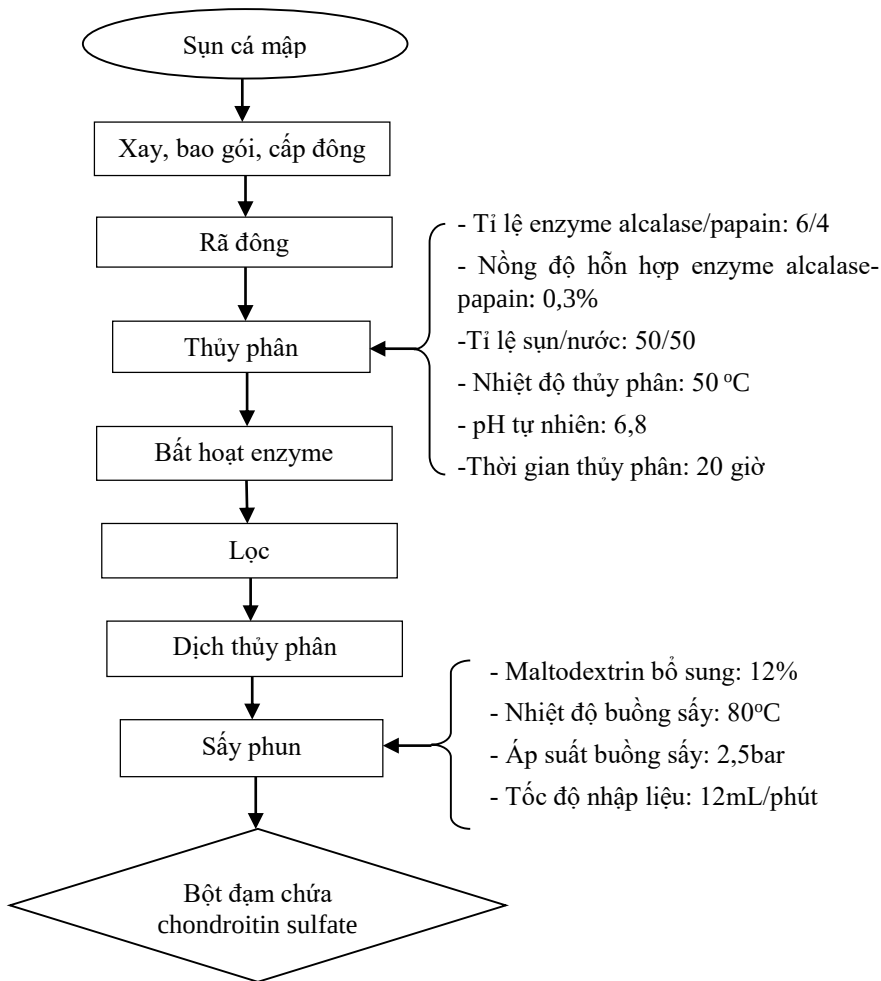
Từ các kết quả nghiên cứu ở trên cho phép đề xuất quy trình sản xuất bột đậm chứa chondroitin sulfate từ sụn cá mập trình bày ở hình 3.15.

*** Thuyết minh quy trình**

+ **Sụn cá mập:** 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 $80,7 \pm 1,12\%$.

+ **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.

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



Hình 3.15. Sơ đồ quy trình quy trình sản xuất bột đậm chứa chondroitin sulfate từ sụn cá mập trắng bằng enzyme protease

+ **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%, tỷ 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 sủ 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.

+ **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 bột đậm thu được có màu vàng sáng.

*** 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 3.6 ÷ 3.7 và hình 3.16.

Bảng 3.6. Kết quả một số chỉ tiêu hóa học của bột đậm thủy phân

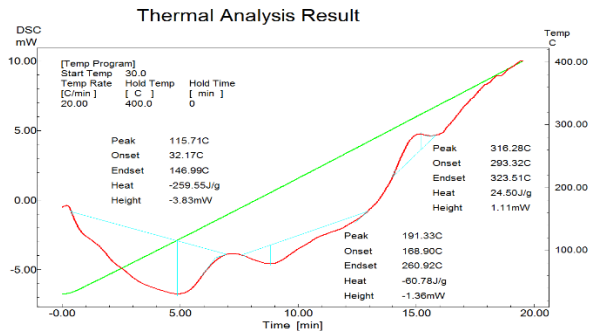
STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả
1	Hàm lượng chondroitin sulfate	mg/g	203
2	Nitơ tổng	g/100g	5.04
3	Tro tổng số	g/100g	3.95
4	Độ ẩm	%	4,27

Bảng 3.7. 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)



Hình 3.16. Giải đồ phân tích nhiệt vi sai của bột đậm chứa chondroitin sulfate

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), (ISSN 1859-4581).