Nghiên cứu điều kiện thu nhận Chondroitin Sulfate (CS) từ sự thủy phân sụn ức gà bằng enzyme Alcalase 2.4L

Study of Glycosaminoglycans Sulphate (GAGs) Recovery Efficiency from the Hydrolysis of Chicken Kneel Cartilage by Alcalase 2.4L

Nguyễn Thị Ngọc Bình*, Trịnh Thị Thừa Ân, Nguyễn Uy Thứ, Đống Thị Anh Đào

Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

Đến Tòa soạn: 20-6-2016; chấp nhận đăng: 28-02-2017

Tóm tắt

Glycosaminoglycans sulphate (GAGs) thuộc nhóm proteoglycans là một loại polysaccharide phức tạp trong cơ thể động vật. Một thành phần chính của GAGs là Chondroitin sulfate (CS) được sử dụng trong điều trị viêm khớp, chống thoái hóa khớp. Glycosaminoglycans sulphate có thể được thu nhận từ các mô sụn động vật: bò, heo, gà, cá mập,v.v…. Do đó việc thu nhận Glycosaminoglycans sulphate từ nguồn phụ phẩm của công nghiệp thực phẩm sẽ có ý nghĩa thiết thực ở Việt Nam để thay thế hàng ngoại nhập. Nghiên cứu này nhằm xác định điều kiện thủy phân tối ưu sụn ức gà bằng enzyme Alcalase 2.4 L để hiệu suất thu nhận Glycosaminoglycans sulphate đạt cao nhất. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân thu nhận Chondroitin sulfate bằng Alcalase là pH = 7,0; nhiệt độ = 54 °C; hàm lượng enzyme/cơ chất = 4%v/w_{pro} và thời gian = 212 phút. Khi đó, hàm lượng Glycosaminoglycans sulfate (%) đạt theo mô hình tối ưu là 27,78% so với chất khô. Chế phẩm Glycosaminoglycans sulfate dạng bột đạt hàm lượng Glycosaminoglycans sulfate là 53,61%; hàm lượng Chondroitin sulfate được kiểm bằng phương pháp HPLC đạt 37,32% so với lượng bột thành phẩm (tính theo chất khô).

Từ khóa: Chondroitin sulfate, Glycosaminoglycans, Alcalase, sụn ức gà, thủy phân.

Abstract

Glycosaminoglycans sulphate (GAGs) belonging to a family of proteoglycans are complex natural polysacchrides in animals. Chondroitin sulfate (CS) is a major class of Glycosaminoglycans sulphate used for treatment of arthritis, especial osteoarthritis. Glycosaminoglycans sulphate can be extracted from cartilage of as cows, pigs, chicken, sharks, etc. The extraction of Glycosaminoglycans sulphate from agricultural waste sources for food supplements is meaningful for Vietnam to substitute the exported material. Our research is aimed to determine the optimal condition of hydrolysis of chicken keel cartilage by Alcalase 2.4 L to obtain Glycosaminoglycans sulphate. The optimal values for the hydrolysis process are pH at 7,0; temperature at 54^{0}C; the ratio of enzyme and substances at 4 %v/w_{pro} and hydrolysis time of 212 minutes. Meanwhile, Glycosaminoglycans sulphate sulfate content are obtained according to the predictions of the model at 27,78% (dry weight of raw material). Glycosaminoglycans sulphate powder product was found to be Glycosaminoglycans sulphate: 53,61% (dry basis); Chondroitin sulfate determined by HPLC: 37,32% (dry basis).

Keywords: Chondroitin sulfate, Glycosaminoglycan, Alcalase, chicken keel cartilage, hydrosis.

1. Giới thiệu

GAGs là một polysaccharide mạch dài và thẳng, mỗi đơn vị bao gồm một hexosamin (N-acetylglucosamin hoặc N-acetylgalactosamin) và một acid uronic (acid glucuronic hoặc iduronic). Glycosaminoglycan (GAGs) bao gồm 5 loại polysaccharide: Chondroitin sulfate (CS), Heparan sulfate, Keratan sulfate, Dermatan sulfate và acid Hyaluronic (HA) [1]. Chondroitin Sulphate là hợp chất hữu cơ thuộc nhóm mucopolysaccharide hay proteoglycan, là một cấu tạo từ các đơn vị cơ bản là disaccharide acid D-glucuronic (GlcA) và N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc), các gốc đường này được sulfate hóa tại các vị trí và số lượng khác nhau [2]. Nguồn ngoại sinh CS đối với cơ thể đa phần được trích ly từ động vật, và được chế biến thành thực phẩm chức năng Chondroitin sulfate dạng viên nén hoặc dạng bột có thể kết hợp cùng với Glucosamin sulfate, là một loại thực phẩm chức năng được sử dụng phổ biến có tác dụng hỗ trợ điều trị các bệnh thoái hóa khớp và viêm xương khớp; cũng như có vai trò quan trọng trong sự tái tạo, làm chậm quá trình lão hóa của lớp sụn khớp, xương, giác mạc mắt và thành động mạch [3], [4], [5]. Cơ chế tác dụng của CS trong việc làm giảm bệnh lý xương khớp bằng cách ức chế enzyme elastase, chất gây thoái hóa sụn khớp, và kích thích quá trình tổng hợp các proteoglycan. Những thử

* Địa chỉ liên hệ: Tel: (+84) 935 357 826
Email: ng0c.13inh.nguyen@gmail.com

nghiệm lâm sàng cũng chứng tỏ được tính kháng viêm nhiễm của CS, CS ức chế hoạt động của TNF-α làm giảm bệnh viêm ruột (IBD) và bệnh vảy nến (Osterman MT. và Lichtenstein GR. (2007)) [6]. TNF-α có thể liên kết với CS (E) với nồng độ cao, có thể ức chế biểu hiện của những phân tử pro-inflammatory, làm giảm IL-1β tạo ra sự hoán vị của NF-κB và TNF-α tạo ra NF-κB [7]. CS cũng ức chế biểu hiện của những phân tử tiền viêm, làm giảm IL-1β tạo ra sự hoán vị của NF-κB và TNF-α tạo ra NF-κB kháng viêm cho cơ thể theo ghi nhận của C. Jomphe và các cộng sự (2007) [8]. Tại Việt Nam đã có các nhà nghiên cứu Võ Hoài Bắc, Đỗ Ngọc Tú cùng các cộng sự (2010) đã nghiên cứu thủy phân sụn cá đuối và cá mập bằng enzym protease ngoại bào của 3 chủng vi khuẩn B26, Bio2, MF34, được phân lập từ 11 chủng giống vi khuẩn có khả năng sinh enzym protease ngoại bào loài vi sinh trên cơ chất xương sụn. Nhóm tác giả đã nghiên cứu điều kiện trích ly tối ưu CS bởi từng loại protease của 3 chủng vi khuẩn trên, cho kết quả protease của chủng B26 và MF34 có hoạt tính cao nhất tại pH 8,5; ở 50 ^{o}C. Hàm lượng CS trong xương sụn cá nhám (*Carcharhinus Sorrah*) theo đạt khoảng 8,6 % và tương ứng là 6,02 % trong xương sụn cá đuối (*Dasyatis Kuhlii*) [9].

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Sụn ức gà được thu nhận từ giống gà thịt công nghiệp từ 8 – 10 tháng tuổi. Sau khi xử lý làm sạch phần thịt bám thì sụn ức được bảo quản lạnh đông ở – 18 ^{o}C cho đến khi sử dụng. Enzyme Alcalase 2.4L (Novozymes, USA) được sản xuất từ vi khuẩn *Bacillus Licheniformis*. Chondroitin Sulfate chuẩn β-glucuronic acid-(1→3)-N-acetyl-β-galactosamine-4-sulfate-(1→4) được mua từ Sigma-Aldrich Co. LLC.

2.2. Bố trí thí nghiệm

Sụn ức gà được loại sạch những mảng thịt bám, được ngâm trong dung dịch muối 3%. Sau đó xay sụn bằng máy xay thành những mẫu nhỏ kích thước khoảng 1,0 x 1,0 mm. Mẫu sụn xay được phối trộn với nước ở tỷ lệ nhất định, được gia nhiệt, thời gian 15 phút. Mẫu được làm nguội, thủy phân trong bể điều nhiệt có lắc đảo 120 vòng/phút nhằm tăng khả năng tương tác giữa enzyme và cơ chất cho quá trình thủy phân hiệu quả hơn. Các điều kiện khảo sát: Tỷ lệ sụn:nước (1:4; 1:6; 1:8; 1:10; 1:12), pH (5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0), nhiệt độ (45, 50, 55, 60, 65 và 70 ^{o}C), hàm lượng enzyme/cơ chất (0, 1, 2, 3, 4, 5% v/w_{pro}), với hoạt độ enzyme 1560 IU, thời gian thủy phân (60, 120, 180, 240, 300 phút).

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Xác định thành phần cơ bản của sụn ức gà

Phân tích các thành phần cơ bản (độ ẩm, protein tổng, lipid, carbohydrate tổng, tro) theo đối tượng phân tích thuộc nhóm thịt và các sản phẩm thịt. Xác định các thành phần của nguyên liệu: độ ẩm theo TCVN 8135:2009 (tương đương ISO 1442:1997), hàm lượng protein tổng thông qua hàm lượng Nitơ tổng theo phương pháp Kjedahl TCVN 8314:2009 (tương đương ISO 937:1978), hàm lượng lipid tổng theo phương pháp trích ly Soxhlet TCVN 8316:2009 (tương đương ISO 1443:1973), carbohydrate tổng theo TCVN 4295 – 86, tổng theo TCVN 7142:2002.

2.3.2. Xác định hoạt tính của enzyme Alcalase 2.4L

Hoạt tính của enzyme Alcalase được xác định theo phương pháp Anson 1937, dựa vào sự thủy phân cơ chất casein. Định lượng sản phẩm tạo thành trong phản ứng màu với thuốc thử Folin, kết quả phân tích dựa vào đồ thị chuẩn tyrosine. Hoạt độ enzyme (U/ml) được tính bằng lượng enzyme giải phóng 1.0 µmol tyrosine từ casein tối thiểu trong một phút điều kiện thí nghiệm (35.5 ^{o}C; pH = 7.5).

2.3.3. Xác định thành hàm lượng GAGs sulfate

Hàm lượng GAGs sulfate trích ly từ sụn ức gà được xác định bằng phương pháp so màu với 1,9-Dimethylmethylene blue theo Farndale và các cộng sự (1986), sử dụng chất chuẩn là Chondroitin-4-sulfate (CS4), hấp thu ở bước sóng 525 mm [10]. Chuẩn bị dung dich CS4 chuẩn với nồng độ 1 mg/ml, xây dựng đường chuẩn biểu diễn sự thay đổi của các giá trị OD được đo ở bước sóng 525 mm theo sự thay đổi nồng độ CS4 (0, 1, 2, 4, 6 và 8 µg/ml). Dựa vào số đọc OD, đối chiếu với đồ thị CS4 chuẩn để tính ra lượng GAGs sulfate trong dịch nghiên cứu.

2.3.4. Phân tích thống kê số liệu

Tất cả các kết quả thực nghiệm được phân tích bằng phần mềm Stagraphics Centurion (Phiên bản 15.2.11.10). Mỗi khảo sát được thực hiện trong ba lần. Phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) với kiểm định LSD được sử dụng để xác định sự khác biệt ý nghĩa ($\rho < 0.05$) giữa các trung bình [14]. Quy hoạch thực nghiệm cấp 2 tâm xoay và tối ưu hóa các yếu tố pH, nhiệt độ, hàm lượng enzyme/cơ chất và thời gian thủy phân, bằng phần mềm Modde 5.0

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Thành phần cơ bản của sụn ức gà

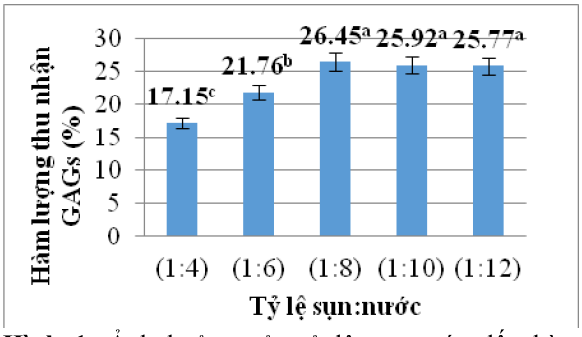
Bảng 1. Thành phần dinh dưỡng của sụn ức gà

STT	Thành phần	Hàm lượng %
1	Ẩm	81.89±1.12
2	Protein	10.45±0.21
3	Lipid	0.25±0.34
4	Tro tổng	0.57±0.12
5	Tổng Carbohydrat	6.84±0.35

Kết quả phân tích ở bảng 1 cho thấy nguyên liệu dùng cho nghiên cứu có hàm lượng các thành phần cơ bản trong sụn ức gà tươi như sau: 81.89±1.12% ẩm, 10.45±0.21% protein, 0.25±0.34% lipid, 0.57±0.12% tro tổng, 6.34±0.35% tổng carbohydrat. Kết quả này cho thấy có điểm tương đồng theo công bố của S.C. Shin và cộng sự (2006): 82.85% ẩm, 11.78% protein, 0.29% lipid. Bên cạnh đó hàm lượng carbohydrat tổng là 6.84±0.35% thì cao hơn so với các giá trị theo công bố của S.C. Shin và cộng sự (2006) là 3.87% [11]. Sự khác biệt về vùng chăn nuôi, chế độ dinh dưỡng, thời tiết, khí hậu,… có thể là nguyên nhân dẫn đến một số khác biệt về hàm lượng các thành phần như trên.

3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ sụn: nước đến hàm lượng thu nhận GAGs

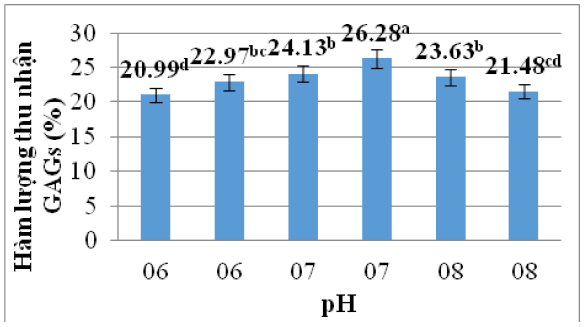
Khi tỷ lệ sụn:nước là 1:4 thì hàm lượng GAGs (HL_{GAGs}, %) đạt giá trị thấp nhất là 17,15±0,50%, khi tăng tỷ lệ sụn:nước lên 1:6 thì H_{GAGs} (%) đạt giá trị là 21,76±0,49%. Với tỷ lệ sụn:nước lên 1:8 thì HL_{GAGs} (%) tăng đáng kể và đạt giá trị cao nhất là 26,45±1,00%. Khi tiếp tục tăng thêm lượng nước với tỷ lệ sụn:nước là 1:10 và 1:12 thì HL_{GAGs} (%) có xu hướng ổn định không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê $p < 0,05$, giá trị thu được lần lượt là 25,92±0,78% và 25,77±1,31%. Điều này được giải thích là khi lượng nước thấp, khả năng tiếp xúc của enzyme với cơ chất hạn chế, mức độ linh động của enzyme thấp dẫn tới HL_{GAG} (%) thấp. Mặc khác, khi tăng lượng nước đến một mức độ nhất định thì khả năng tiếp xúc của enzyme và cơ chất dần đạt mức tối đa, protein trong proteoglycan từ sụn bị thủy phân ở mức độ triệt để với cùng hàm lượng enzyme sử dụng do đó giải phóng hàm lượng là cao nhất. Càng tăng lượng nước trong phản ứng thủy phân thì càng làm loãng nồng độ enzyme nên khả năng tiếp xúc với cơ chất hạn chế dẫn tới HL_{GAGs} (%) cũng không tăng lên và không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa ($p < 0,05$). Theo nghiên cứu của W. Garnjanagoonchorn và các cộng sự (2007) và của S.C. Shin và các cộng sự (2006) có kết quả cũng tương ứng với kết quả của thí nghiệm là từ các tỷ lệ 1:8 đến 1:10.



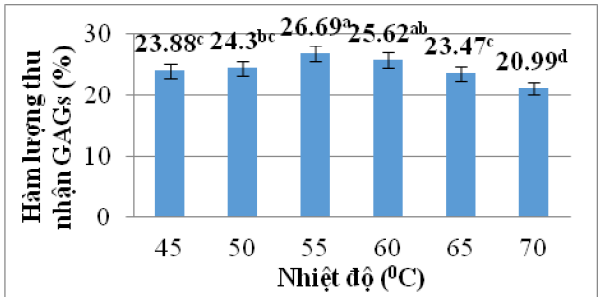
Hình 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ sụn-nước đến hàm lượng thu nhận GAGs

3.3. Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng thu nhận GAGs

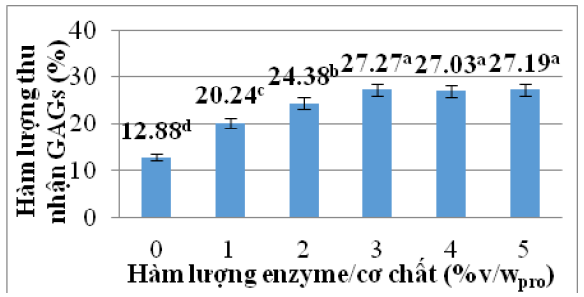
Khi pH ở mức 5,5 và thì hàm lượng GAGs (HL_{GAGs}, %) đạt giá trị thấp nhất là 20,99±0,52% giá trị này không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ so với mức pH = 8,0 là 21,48±0,52%. Khi pH ở các mức là 6,0; 6,5 và 7,5 thì HL_{GAGs} (%) là 22,97±1,03%; 24,13±0,76% và 23,63±0,76%, ba giá trị này không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê $p < 0,05$. Bên cạnh đó ở mức pH là 6,0 và 8,0 thì hàm lượng thu nhận GAGs (%) cũng không khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Và ở mức pH là 7,0 thì hàm lượng thu nhận GAGs (%) đạt giá trị cao nhất là 26,28±1,74%, và có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê so với giá trị của các mức pH còn lại. Khi mức pH càng cao thì mức độ thủy phân càng giảm, điều này chứng tỏ khoảng pH trung tính (pH = 7) là thích hợp cho enzyme alcalase 2.4L hoạt động để thủy phân sụn ức gà đạt kết quả cao nhất.



Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng thu nhận GAGs



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng thu nhận GAGs sulfate



Hình 4. Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme/cơ chất đến hàm lượng thu nhận GAGs

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng thu nhận GAGs

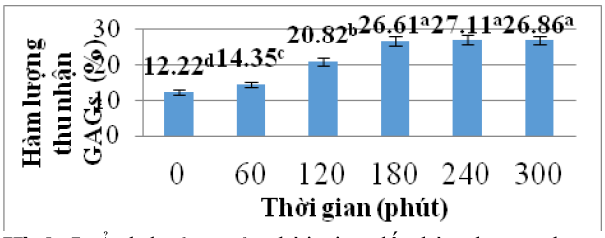
Dựa vào hình 3 cho thấy khi tăng nhiệt độ từ 45^0C đến 55^0C thì hàm lượng GAGs (HL_{GAGs}, %) tăng 1,12 lần (từ 23,88±0,76% lên 26,69±0,80%). Tuy nhiên khi nhiệt độ tiếp tục tăng trên 55^0C thì mức độ thủy phân giảm dẫn tới giảm HL_{GAGs} (%), cụ thể ở các mức nhiệt độ 60^0C, 65^0C và 70^0C các giá trị đạt được là 25,62±1,37%; 23,47±0,76%; 20,99±0,38%. Điều này có thể giải thích là do khi nhiệt độ tăng cao enzyme sẽ bị biến tính làm giảm hoặc mất hoạt tính, sự biến tính là bất thuận nghịch nên khó phục hồi vì enzyme bản chất là protein. Ở mức nhiệt độ 55^0C thì HL_{GAGs} (%) là 26,69±0,80% không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ so với mức nhiệt độ 60^0C là 25,62±1,37%. Do vậy ở mức nhiệt độ 55^0C được chọn mức để làm cơ sở cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.5. Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme/cơ chất đến hàm lượng thu nhận GAGs

Từ kết quả hình 4 cho thấy hàm lượng enzyme/ cơ chất (v/w_{pro}) trong quá trình thủy phân có ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng thu nhận GAGs. Ở mức hàm lượng enzyme/cơ chất là 3%, 4% và 5% thì hàm lượng GAGs (HL_{GAGs}, %) cao hơn các mức thấp hơn, ở các mức này không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ với các giá trị lần lượt là 27,27±1,63%; 27,03±1,24%;27,19±1,52%. Điều này có thể giải thích là do lượng cơ chất có trong nguyên liệu là không đổi nên khi tăng hàm lượng enzyme/cơ chất ($\%v/w_{pro}$) tới một giới hạn nhất định thì lượng [ES] không đổi do đó tốc độ phản ứng đạt đến giá trị cực đại và duy trì ổn định theo mô hình của Michaelis Menten. Vì thế chọn hàm lượng enzyme/ cơ chất (v/w_{pro}) là 3% để tiết kiệm chi phí enzyme.

3.6. Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng thu nhận GAGs

Khi tăng thời gian từ mức 60 (phút) lên 180 (phút) thì hàm lượng GAGs (HL_{GAGs}, %) tăng lên 2,24 lần (11,89±0,74% lên 20,82±1,38%). Tuy nhiên, tiếp tục tăng thời gian thì HL_{GAGs} (%) có xu hướng ổn định như ở mức 180 (phút) và tiếp theo là 240 (phút) và 300 (phút) thì các giá trị HL_{GAGs} (%) lần lượt là 20,82±1,38%; 27,11±1,41% và 26,86±1,12%. Các giá trị này không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê $p < 0,05$. Nguyên nhân là do lượng sản phẩm tạo thành cao ức chế quá trình thủy phân của enzyme, và lượng cơ chất thủy phân bị giảm dần theo thời gian thủy phân; trong điều kiện này các protease cũng giảm hoạt tính và có thể xảy ra sự tự phân cắt lẫn nhau của protease. Theo kết quả trên và tính toán để tiết kiệm thời gian cho thấy thời gian thủy phân tốt nhất là 180 phút đến 300 phút.



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng thu nhận GAGs

3.7. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân sụn ức gà

Bảng 2. Các yếu tố thí nghiệm trong tối ưu hóa quá trình thủy phân đến hàm lượng thu nhận GAGs (%)

Yếu tố thí nghiệm	Các mức yếu tố				
	- α	**-1**	**0**	**1**	**+ α**
Độ pH (x_1)	6.0	6.5	7	7.5	8.0
Nhiệt độ thủy phân (x_2, ^{0}C)	45	50	55	60	65
Hàm lượng enzyme/cơ chất (x_3, $\%v/w_{pro}$)	1	2	3	4	5
Thời gian thủy phân (x_4, phút)	60	120	180	240	300
Các mức của biến mã hóa: mức trên: +1, mức cơ sở: 0, mức dưới: -1, α = 2.					

Số thí nghiệm được tính theo công thức:

$$N = 2^k + 2k + n_0 = 2^4 + 2x4 + 7 = 31$$

Trong đó:

- k: Số yếu tố thí nghiệm (k = 4)
- n_0: Số thí nghiệm tại tâm (n_0 = 7)

Ma trận thực nghiệm thể hiện sự kết hợp của các mức yếu tố được trình bày ở bảng 3.

Tiến hành thí nghiệm theo ma trận bảng 3, kết quả thí nghiệm là phù hợp khi tiến hành quy hoạch thực nghiệm bằng phần mềm Modde 5.0 với hệ số biến thiên của phương trình hồi quy là $R^2 = 0,951 > 0,8$; giá trị biến thiên ảo $Q^2 = 0,748 > 0,5$ và độ sai lệch của chúng là 0,203 thuộc [0,2 ; 0,3], các giá trị hồi quy là có ý nghĩa và mô hình đáng tin cậy với mức ý nghĩa là 5% [12].

Phương trình hồi quy thực nghiệm có dạng sau:

$$CS\ (\%) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 + b_1^2x_1^2 + b_2^2x_2^2 + b_3^2x_3^2 + b_4^2x_4^2$$

$$= 26,9557 + 0,534583x_1 + 0,529584x_2 + 1,33625x_3 + 0,640418x_4 - 0,641875x_1x_2 - 0,623125x_1x_3 - 0,923125x_2x_3 - 0,645492x_1^2 - 1,00549x_2^2 - 0,716743x_3^2 - 0,62174x_4^2\ (*)$$

Phương trình biến thiên theo số thực như sau:

CS (%) = – 407,994084 + 55,076718Z_1 + 6,8811978Z_2 + 24,514833Z_3 + 0,0728474Z_4 – 0,25675Z_1Z_2 – 1,24625Z_1Z_3 – 0,184625Z_2Z_3 – 2,581968Z_1^2 – 0,0402196Z_2^2 – 0,716743Z_3^2 – 0,0001722Z_4

Trong đó:

Z_1: Biến thực của giá trị pH

Z_2: Biến thực của giá trị nhiệt độ thủy phân (^{0}C)

Z_3: Biến thực của giá trị hàm lượng enzyme/cơ chất (%v/w_{pro})

Z_4: Biến thực của giá trị thời gian thủy phân (phút)

Tính tương thích của phương trình hồi quy được kiểm tra bằng phần mềm Modde 5.0. Phương trình hồi quy sẽ tương thích với thực nghiệm nếu kết quả phân tích "Lack of Fit" là không có ý nghĩa thống kê [13].

Bảng 3. Ma trận thí nghiệm 4 yếu tố

Thí nghiệm	Biến mã hóa				Biến thực			
	x_1	x_2	x_3	x_4	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4
N1	-1	-1	-1	-1	6.5	50	2	120
N2	1	-1	-1	-1	7.5	50	2	120
N3	-1	1	-1	-1	6.5	60	2	120
N4	1	1	-1	-1	7.5	60	2	120
N5	-1	-1	1	-1	6.5	50	4	120
N6	1	-1	1	-1	7.5	50	4	120
N7	-1	1	1	-1	6.5	60	4	120
N8	1	1	1	-1	7.5	60	4	120
N9	-1	-1	-1	1	6.5	50	2	240
N10	1	-1	-1	1	7.5	50	2	240
N11	-1	1	-1	1	6.5	60	2	240
N12	1	1	-1	1	7.5	60	2	240
N13	-1	-1	1	1	6.5	50	4	240
N14	1	-1	1	1	7.5	50	4	240
N15	-1	1	1	1	6.5	60	4	240
N16	1	1	1	1	7.5	60	4	240
N17	-2	0	0	0	6	55	3	180
N18	2	0	0	0	8	55	3	180
N19	0	-2	0	0	7	45	3	180
N20	0	2	0	0	7	65	3	180
N21	0	0	-2	0	7	55	1	180
N22	0	0	2	0	7	55	5	180
N23	0	0	0	-2	7	55	3	60
N24	0	0	0	2	7	55	3	300
N25	0	0	0	0	7	55	3	180
N26	0	0	0	0	7	55	3	180
N27	0	0	0	0	7	55	3	180
N28	0	0	0	0	7	55	3	180
N29	0	0	0	0	7	55	3	180
N30	0	0	0	0	7	55	3	180
N31	0	0	0	0	7	55	3	180

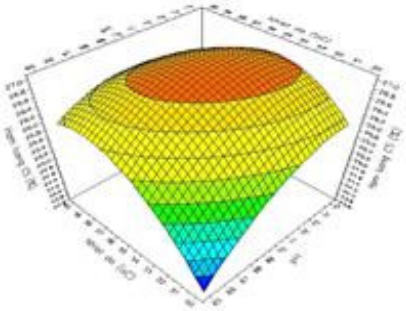
Bảng 4. Kết quả kiểm tra tính tương thích của hệ số phương trình hồi quy

Source	Degree of Freedom (DF	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F value	P value	
Regressior	14	145.087	10.3634	22.274	0.000	Có ý nghĩa
Residual	16	7.4442	0.465262			
Lack of Fit	10	6.45082	0.645082	3.8963	0.055	Không ý nghĩa
Pure Error	6	0.99337	0.165562			
Total Corrected	30	152.531	5.08437			

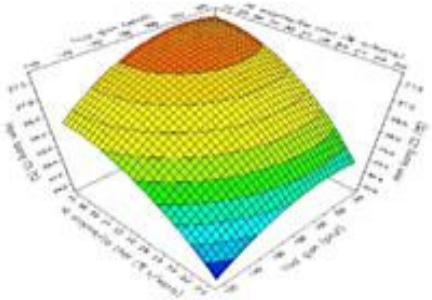
Kết quả bảng 4 cho thấy kiểm định "Lack of Fit" là không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) nên phương trình hồi quy có sự tương thích cao với thực nghiệm. Như vậy, mô hình thống kê này có thể sử dụng để dự đoán điều kiện tối ưu của quá trình thủy phân.

3.8. Kết quả kiểm chứng giá trị dự đoán HL_{GAGs} (%) tối ưu hóa từ mô hình với giá trị thực nghiệm

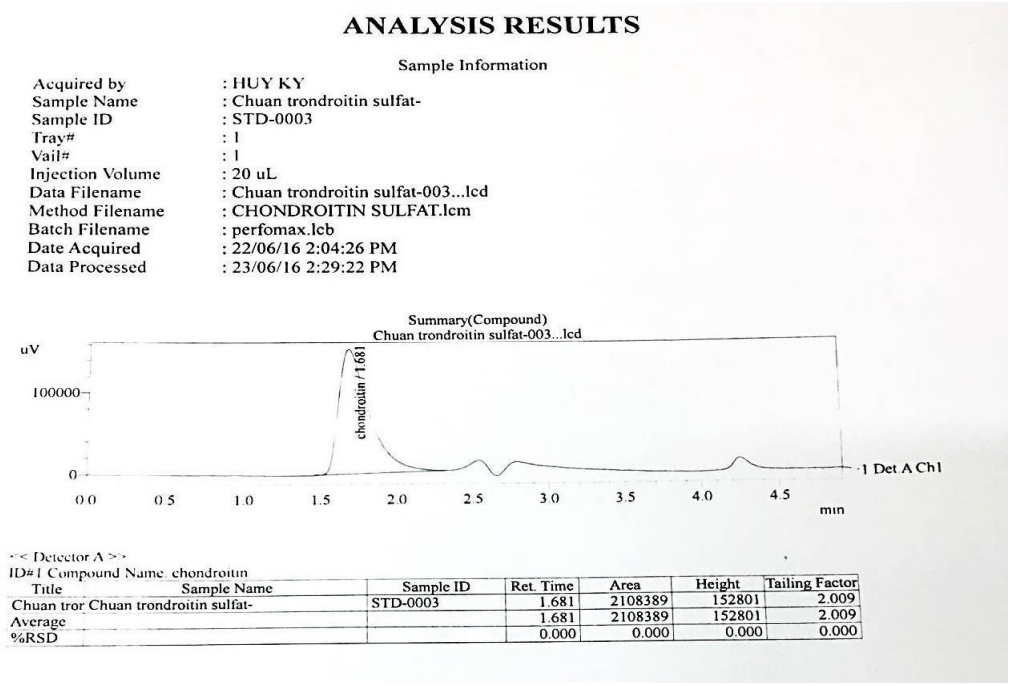
Điều kiện tối ưu hóa cho quá trình thủy phân được xác định bởi phần mềm Modde 5.0 cho thấy tại điều kiện pH = 7,0301; nhiệt độ = 54,187^{0}C; hàm lượng enzyme/cơ chất = 3,9942% (v/w_{pro}) và thời gian = 211,592 (phút) thì HL_{GAGs} (%) cao nhất là 27,7779%.



Hình 6. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ thủy phân đến hàm lượng thu nhận GAGs



Hình 7. Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme/cơ chất và thời gian thủy phân đến hàm lượng thu nhận GAGs



ANALYSIS RESULTS

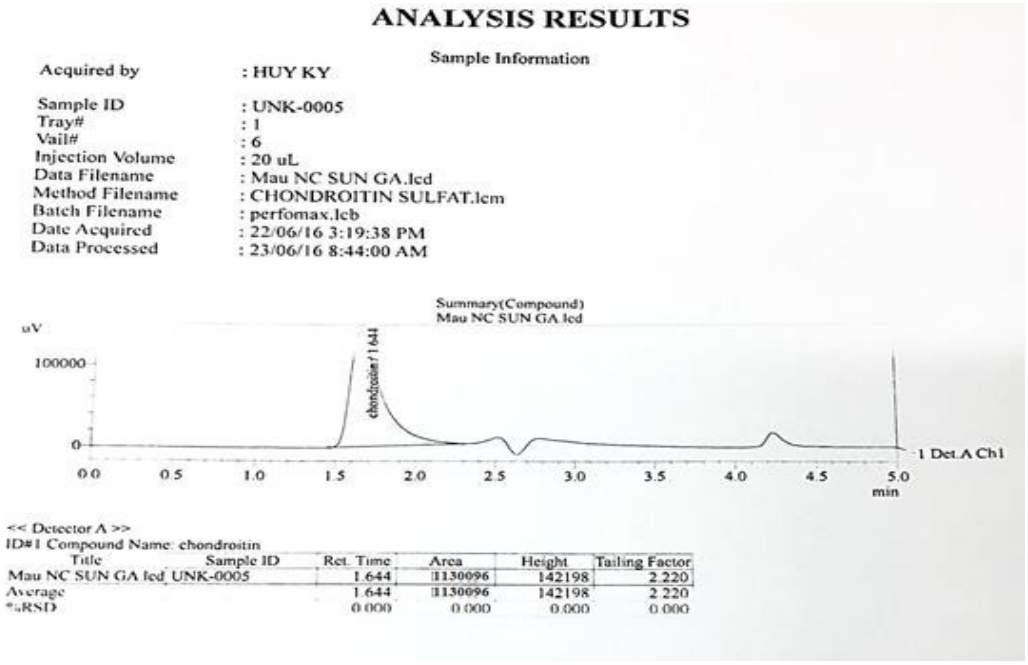
Sample Information

Acquired by	: HUY KY
Sample Name	: Chuan trondroitin sulfat-
Sample ID	: STD-0003
Tray#	: 1
Vail#	: 1
Injection Volume	: 20 uL
Data Filename	: Chuan trondroitin sulfat-003...lcd
Method Filename	: CHONDROITIN SULFAT.lcm
Batch Filename	: perfomax.lcb
Date Acquired	: 22/06/16 2:04:26 PM
Data Processed	: 23/06/16 2:29:22 PM

<< Detector A >>
ID#1 Compound Name: chondroitin

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor
Chuan tror	Chuan trondroitin sulfat-	STD-0003	1.681	2108389	152801	2.009
Average			1.681	2108389	152801	2.009
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000

Hình 8. Phổ đồ chuẩn CS bằng phương pháp HPLC



ANALYSIS RESULTS

Sample Information

Acquired by	: HUY KY
Sample ID	: UNK-0005
Tray#	: 1
Vail#	: 6
Injection Volume	: 20 uL
Data Filename	: Mau NC SUN GA.lcd
Method Filename	: CHONDROITIN SULFAT.lcm
Batch Filename	: perfomax.lcb
Date Acquired	: 22/06/16 3:19:38 PM
Data Processed	: 23/06/16 8:44:00 AM

<< Detector A >>
ID#1 Compound Name: chondroitin

Title	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor
Mau NC SUN GA.lcd	UNK-0005	1.644	1130096	142198	2.220
Average		1.644	1130096	142198	2.220
%RSD		0.000	0.000	0.000	0.000

Hình 9. Phổ đồ chế phẩm GAGs bằng phương pháp HPLC

Để kiểm chứng chính xác các giá trị nhận được từ phương trình hồi quy, tiến hành thí nghiệm lập lại 3 lần với các thông số tương đương điều kiện ở trên cho quá trình thủy phân sụn ức gà. Các điều kiện như sau: pH = 7,0; nhiệt độ = 54^0C; hàm lượng enzyme/cơ chất = 4% (v/w_{pro}) và thời gian = 212 (phút). Hàm lượng thu nhận GAGs sulfate (%) từ phương trình hồi quy là 27,78 (%) và từ thực nghiệm là 27,74 ± 0,46 (%) không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), cho thấy rằng phương trình hồi quy xây dựng ở trên là phù hợp với thực tiễn thí nghiệm.

Chế phẩm GAGs được sấy chân không thành dạng bột (hàm ẩm: 10,18%) đạt hàm lượng GAGs sulfate là 53,61%; hàm lượng CS được kiểm bằng phương pháp HPLC theo kết quả tính toán từ hình 8 và hình 9 đạt 37,32% so với lượng bột thành phẩm (tính theo chất khô).

4. Kết luận

Sụn ức gà là một loại phụ phẩm trong công nghiệp giết mổ gia cầm được xem là nguồn tiềm năng thu nhận GAGs sulfate. Chế phẩm đạt độ tinh sạch GAGs sulfate 53,61%; trong đó hàm lượng CS đạt 37,32% so với lượng bột thành phẩm (tính theo chất khô) với điều kiện trích ly tối ưu enzyme: pH = 7,0; nhiệt độ = 54^0C; hàm lượng enzyme/cơ chất = 4% (v/w_{pro}), hoạt độ alcalase 2.4L là…. và thời gian = 212 (phút). Hàm lượng thu nhận GAGs sulfate (%) thu nhận được là 27,74 ± 0,46 (%) so với chất khô nguyên liệu. Cần có những nghiên cứu tinh sạch CS sụn ức gà, làm nguyên liệu trong ngành công nghiệp dược phẩm tạo ra các loại thực phẩm chức năng, giảm giá thành sản phẩm hơn sản phẩm ngoại nhập.

Lời cảm ơn

Để hoàn thành tốt kết quả công trình nghiên cứu này, lời đầu tiên xin chân thành cảm ơn Bộ môn Công nghệ thực phẩm, Khoa kỹ thuật hóa học, Trường Đại học Bách Khoa TP.HCM đã tạo điều kiện thuận lợi về trang thiết bị và cơ sở vật chất giúp nhóm nghiên cứu thực hiện đề tài đúng tiến độ. Cảm ơn quý thầy cô Bộ môn công nghệ thực phẩm đã truyền đạt những kinh nghiệm quý báu cho nhóm chúng tôi trong suốt thời gian học vừa qua.

Tài liệu tham khảo

[1]. Johanne Martel-Pelletier, Aina Farran, Eulàlia Montell, Josep Vergés and Jean-Pierre Pelletier (2015) Discrepancies in Composition and Biological Effects of Different Formulations of Chondroitin Sulfate. Molecules 20, 4277-4289.

[2]. J.C.F. Kwok et al (2012) Chondroitin sulfate: A key molecule in the brain matrix. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, vol. 44, 582-586.

[3]. Tadahisa Mikami et al (2013) Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1830, 4719–4733.

[4]. D. Uebelhart et al (1998) Effects of oral chondroitin sulfate on the progression of knee osteoarthritis: a pilot study. Osteoarthritis and cartilage, 39-466.

[5]. D. Uebelhart et al (2004) Intermittent treatment of knee osteoarthritis with oral chondroitin sulfate: a one-year, randomized, double-blind, multicenter study versus placebo. Osteoarthritis Cartilage, vol. 12, 269-276.

[6]. M.T. Osterman et al (2007) Current and future anti-TNF therapy for inflammatory bowel disease. Curr Treat Options Gastroenterol, vol. 10, 195-207.

[7]. J.W. Cho et al (2007) Curcumin attenuates the expression of IL-1β, IL-6, and TNF-α as well as cyclin E in TNF-α-treated HaCaT cells; NF-κB and MAPKs as potential upstream targets. International journal of molecular medicine, vol. 19, 469-474.

[8]. C. Jomphe et al (2007) Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in interleukin-1beta stimulated chondrocytes. Basic Clin Pharmacol Toxicol, vol. 102, 59-65.

[9]. V.H. Bắc et al (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, vol. 16, 26-30.

[10]. W.R. Farndale, D.J. Buttle, A.J. Barrett (1986) Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. Biochimca Biophysica Acta 883, 173–177.

[11]. S.C. Shin et al (2006) Study on Extraction of Mucopolysaccharide-protein Containing Chondroitin Sulfate from Chicken Keel Cartilage. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, vol. 19, 601-604.

[12]. C.Y. Cheng et al, "Optimization of microwave-assisted extraction of chondroitin sulfate from tilapia byproduct by response surface methodology," Consumer Electronics, Communications and Networks (CECNet), 2011 International Conference on, pp. 1462-1465, 2011.

[13]. C. Kun-Nan and C. Ming-Ju, "Statistical Optimization: Response Surface Methodology Optimization in Food Engineering," in Optimization in Food Engineering, Ferruh Erdogdu, Ed. New York, USA: Taylor & Francis Group, 2008, ch. 6, pp. 115-141.

[14]. AOAC, Official Methods of Analysis: The Association of Offiial Analytical Chemists. Washington DC, USA, 1999.