



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.015

ỨNG DỤNG LYSOZYME ĐỂ TẠO CHẾ PHẨM BỘT OLIGOSACCHARIDE TỪ VỎ TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopennaeus vannamei*)

Võ Văn Song Toàn^{1*}, Lê Tấn Hòa¹, Nguyễn Thị Cẩm Giang¹, Kim Thị Thu Xương¹, Trương Thị Thanh Tuyền¹, Lê Ngọc Tuyết¹, Nguyễn Ngọc Phương Vy¹, Dương Thị Hương Giang² và Trần Nhân Dũng¹

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Liên hiệp các Hội Khoa học và Kỹ thuật Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Võ Văn Song Toàn (email: vvstoan@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

The study was conducted to investigate the effects of time, pH, temperature and substrate concentration on biological hydrolyzing chitin by lysozyme extracted from Hisex Brown egg for producing chitin oligosaccharide. The efficiency of hydrolysis in each treatment was evaluated by the generated reducing sugar followed Schales's method. Lineweaver-Burk and Michaelis-Menten equations were also created to determine V_{max} and K_m values. The results indicated that the reducing sugar produced during hydrolysis was significantly affected by time, pH, temperature and substrate concentration ($p < 0.05$). The appropriate conditions for hydrolysis of chitin suspension with lysozyme were determined to be temperature of 65°C, pH of 5.5, time of 12 hours and chitin suspension of 0.1 mg/mL. The values of V_{max} and K_m during hydrolysis were reported to be 0.225 $\mu\text{M}/\text{min}$ and 0.022 mg/mL, respectively. The product from the hydrolysis process of chitin suspension was lyophilized for 48 hours to obtain a powder of soluble oligosaccharide.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng của thời gian, pH, nhiệt độ và nồng độ cơ chất lên quá trình thủy phân chitin bằng lysozyme từ lòng trắng trứng gà Hisex Brown để tạo bột oligosaccharide. Hiệu suất của quá trình thủy phân ở mỗi nghiệm thức được đánh giá bởi hàm lượng đường khử tạo ra theo phương pháp của Schales. Phương trình Lineweaver-Burk và Michaelis-Menten cũng được xây dựng nhằm xác định vận tốc cực đại (V_{max}) và hằng số Michaelis Menten (K_m). Kết quả cho thấy hàm lượng đường khử tạo ra trong quá trình thủy phân bị ảnh hưởng đáng kể bởi thời gian, pH, nhiệt độ và nồng độ cơ chất ($p < 0,05$). Điều kiện thích hợp để thủy phân chitin huyền phù bằng lysozyme được xác định ở nhiệt độ 65°C, pH 5,5 trong thời gian 12 giờ với hàm lượng cơ chất chitin huyền phù là 0,1 mg/mL. Giá trị V_{max} và K_m trong quá trình thủy phân được ghi nhận có giá trị lần lượt là 0,225 $\mu\text{M}/\text{phút}$ và 0,022 mg/mL. Sản phẩm của quá trình thủy phân được đông khô trong 48 giờ và thu nhận được bột oligosaccharide hòa tan.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 26/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Application of lysozyme for producing oligosaccharide powder from whiteleg shrimp shell (*Litopennaeus vannamei*)

Từ khóa:

Chitin huyền phù, *Litopennaeus vannamei*, lysozyme, oligosaccharide, thủy phân

Keywords:

Chitin of suspensions, hydrolysis, *Litopennaeus vannamei*, lysozyme, oligosaccharide

Trích dẫn: Võ Văn Song Toàn, Lê Tấn Hòa, Nguyễn Thị Cẩm Giang, Kim Thị Thu Xương, Trương Thị Thanh Tuyền, Lê Ngọc Tuyết, Nguyễn Ngọc Phương Vy, Dương Thị Hương Giang và Trần Nhân Dũng, 2019. Ứng dụng lysozyme để tạo chế phẩm bột oligosaccharide từ vỏ tôm thẻ chân trắng (*Litopennaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 111-118.

1 GIỚI THIỆU

Ngành tôm là một trong những ngành hàng mũi nhọn đóng góp vào sự phát triển nông nghiệp và kinh tế xã hội đất nước. Tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) đang phát triển khá mạnh trong thời gian gần đây, diện tích nuôi loài tôm này đang mở rộng trong cả nước vì có tốc độ tăng trưởng nhanh và khả năng chống chịu tốt với điều kiện môi trường. Cùng với sự phát triển nuôi thì quá trình chế biến tôm tạo ra khoảng hơn 200.000 tấn phế phẩm vỏ tôm (bao gồm tôm thẻ chân trắng và tôm sú) hàng năm (Trung and Phuong, 2012). Tuy vậy, vỏ tôm là nguồn nguyên liệu tiềm năng trong sản xuất chitin và các dẫn xuất có giá trị từ chitin với hoạt tính sinh học cao được ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực y dược, thực phẩm, nông nghiệp.

Chitin - một polymer sinh học đa dạng có trong tự nhiên - là thành phần cấu trúc chính được tìm thấy trong vỏ của các loại giáp xác như tôm, cua và ghe. Với hoạt tính sinh học cao, chitin đang được ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm, y dược và nông nghiệp (Younes and Rinaudo, 2015). Tuy nhiên, do là polymer có khối lượng phân tử cao, độ tan thấp ở giá trị pH trung tính nên hoạt tính của chitin vẫn còn bị hạn chế (Ahmed *et al.*, 2012). Do đó, dạng cấu trúc oligomer hay chitin oligosaccharide đang được đặc biệt quan tâm do có khả năng tan tốt trong nước với nhiều hoạt tính sinh học như chống oxy hóa, kháng khuẩn và kháng tế bào ung thư (Jeon *et al.*, 2000).

Hiện nay, chitin cũng như chitin oligosaccharide chủ yếu được sản xuất bằng phương pháp hóa học. Tuy nhiên, phương pháp này tạo ra nhiều sản phẩm phụ gây ô nhiễm môi trường (Arbia *et al.*, 2013). Trong khi đó, protease (bromelain và papain) với khả năng thủy phân protein làm sạch vỏ tôm (Mukhin and Novikov, 2001) và muramidase (lysozyme) có khả năng thủy phân liên kết β -(1-4)-N-acetyl-D-glucosamine trong cấu trúc chitin (Nelson and Cox, 2004). Do đó, giải pháp enzyme được sử dụng để tạo ra chế phẩm oligosaccharide sinh học đồng thời góp phần bảo vệ môi trường.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Vỏ tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) được thu tại Công ty Trách nhiệm Hữu hạn Hải sản Việt Hải, Quốc lộ 1 A, xã Long Thạnh, huyện Phụng Hiệp, tỉnh Hậu Giang. Trứng gà Hisex Brown được mua tại Công ty cổ phần sản xuất kinh doanh vật tư và thuốc thú y Vemedim, đường 30 tháng 4, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ. Thân khóm (*Ananas comosus* (L.) Merr) được thu tại ấp Thạnh Thắng, xã Hòa Tiến, thành phố Vị Thanh,

tỉnh Hậu Giang. Nhựa đu đủ (*Carica papaya*) được thu tại số 223, ấp Nhất A, xã Thạnh Hoà, huyện Phụng Hiệp, tỉnh Hậu Giang.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Chuẩn bị nguyên liệu

Trích ly lysozyme: Lysozyme được trích ly và tinh sạch từ lòng trắng trứng gà theo phương pháp của Mai Chí Linh và *ctv.* (2014) bằng cách sử dụng sắc ký trao đổi ion dương SP-Streamline. Phân đoạn F1 sau quá trình tinh sạch sẽ được thu, trữ lại và sử dụng cho nghiên cứu.

Nguyên liệu bột chitin: Vỏ tôm được bảo quản lạnh chuyển về phòng thí nghiệm, rửa nhanh, để ráo, sấy đến trọng lượng không đổi trước khi được nghiền mịn bằng máy nghiền mẫu Retsch Miihle (Đức) với kích thước lỗ 0,75 mm. Bột chitin thô sau khi được loại protein bằng protease thân khóm và nhựa đu đủ sẽ được tiếp tục khử khoáng theo quy trình sinh học theo phương pháp của Nguyễn Văn Thiết và Đỗ Văn Tú (2007). Bột chitin thô được chuyển thành dạng chitin huyền phù theo phương pháp của Nguyễn Thị Hà (2012).

2.2.2 Khảo sát nguyên liệu

Thành phần hóa học cơ bản của vỏ tôm thẻ chân trắng

Bột vỏ tôm được sấy tới trọng lượng không đổi để xác định độ ẩm theo phương pháp của AOAC (2003). Hàm lượng protein được xác định dựa vào phương pháp của Lowry (1951). Hàm lượng chitin được xác định bằng phương pháp đo khối lượng còn sót lại sau khi xử lý vỏ tôm theo quy trình của Phạm Thị Đan Phượng và Trang Sĩ Trung (2012).

Hoạt tính đặc hiệu của lysozyme

Hàm lượng protein hòa tan của lysozyme được phân tích bằng phương pháp đo quang phổ theo Bradford (1976). Hoạt tính của lysozyme được đánh giá qua khả năng làm tan tế bào vi khuẩn *Micrococcus lysodeikticus* theo phương pháp Shugar (1952). Hoạt tính đặc hiệu là tỷ số giữa hoạt tính và hàm lượng protein.

2.2.3 Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng lên quá trình thủy phân chitin huyền phù tạo oligosaccharide bằng lysozyme

Khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian lên quá trình thủy phân chitin huyền phù: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Chitin huyền phù (0,1 mg/mL) được thủy phân bằng lysozyme lòng trắng trứng (100 μ L/mL) trong môi trường dung dịch đệm phosphate 0,05M pH 5,5 ở nhiệt độ 60°C với các mốc thời gian thủy phân từ 0, 4, 8, 12, 16, 20 và 24 giờ.

Khảo sát sự ảnh hưởng tương tác của pH và nhiệt độ lên quá trình thủy phân chitin huyền phù: Thí nghiệm được bố trí theo thể thức thừa số 2 nhân tố (pH và nhiệt độ), 3 mức độ cho nhân tố pH (4,5 - 5,5 - 6,5) và 4 mức độ đối với nhân tố nhiệt độ (45, 55, 65 và 75°C).

Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến tốc độ phản ứng thủy phân chitin huyền phù bằng lysozyme: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại với 6 mức nồng độ chitin huyền phù (0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,025 và 0,03 mg/mL).

Dịch thủy phân sau khi được ly tâm trong 10 phút với tốc độ 10.000 vòng/phút sẽ được đông khô trong 48 giờ để thu nhận bột oligosaccharide.

Nồng độ đường khử sinh ra của sản phẩm thủy phân và bột oligosaccharide là các oligosaccharide hòa tan được xác định theo phương pháp Schales (Imoto and Yagishita, 1971).

2.2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được nhập liệu, lưu trữ, xử lý và vẽ hình bằng phần mềm Microsoft Excel 2007. Giá trị

Bảng 1: Thành phần hóa học vỏ tôm thẻ chân trắng và hoạt tính lysozyme

Nguyên liệu	Vỏ tôm thẻ chân trắng			Lysozyme lòng trắng trứng gà Hisex Brown		
	Âm độ (%)	Chitin (%)*	Protein (%)*	Protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (U)	Hoạt tính đặc hiệu (U/mg)
Chỉ số	68,8 ± 2,00	28,1 ± 0,337	29,5 ± 0,998	94,54 ± 3,21	2.258.333 ± 90.139	23.891 ± 685

Ghi chú: *: Các giá trị được tính trên khối lượng vật chất khô

Hoạt tính đặc hiệu của lysozyme được trích ly và tinh sạch từ lòng trắng trứng gà Hisex Brown là 23.891 U/mg (Bảng 1), thấp hơn so với nghiên cứu của Mai Chí Linh và *ctv.* (2014) là 32.036 U/mg. Trong phương pháp thủy phân sinh học chitin bằng enzyme, ngoài chitinase là loại enzyme có khả năng cắt đặc hiệu với cơ chất chitin thì lysozyme cũng là một enzyme tiềm năng có thể được dùng trong quá trình thủy phân này (Jeon *et al.*, 2000). Với khả năng phân cắt được liên kết β-1,4-glycoside thì việc ứng dụng lysozyme sẽ thuận lợi hơn trong quá trình sản xuất chitin oligosaccharide khi sản phẩm thu được có sản lượng nhiều hơn với mức độ trùng hợp cao hơn.

3.2 Các yếu tố ảnh hưởng lên quá trình thủy phân chitin huyền phù tạo oligosaccharide bằng lysozyme

3.2.1 Sự ảnh hưởng của thời gian lên quá trình thủy phân chitin huyền phù

Hàm lượng đường khử tạo ra trong quá trình thủy phân chitin huyền phù bằng lysozyme có xu hướng tăng dần theo thời gian (Hình 1). Khi thời gian thủy phân tăng từ 4 giờ đến 24 giờ thì hàm lượng đường khử tăng từ 126 μM đến 150 μM.

trung bình, độ lệch chuẩn và sai số chuẩn được tính toán bằng phần mềm Stagraphics Centurion 15. Trung bình các số liệu giữa các thí nghiệm được so sánh bằng phân tích phương sai một nhân tố ANOVA (One Way Anova) và kiểm định LSD với độ tin cậy 95%.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thành phần hóa học vỏ tôm thẻ chân trắng và hoạt tính lysozyme

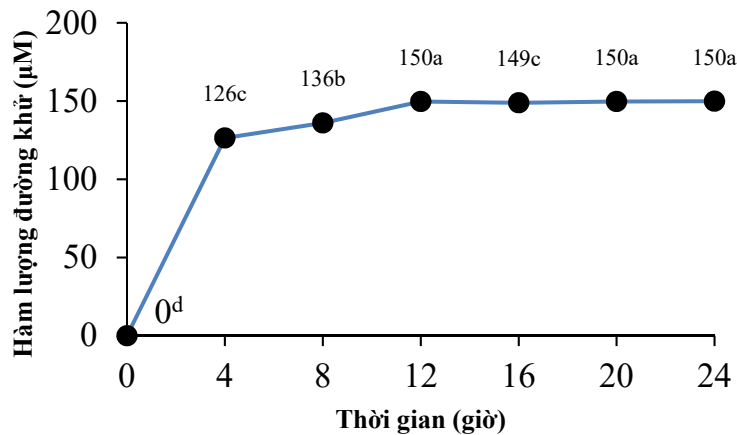
Hàm lượng protein và chitin của vỏ tôm lần lượt là 29,5%, 28,1% (Bảng 1). So với hàm lượng protein trong các nghiên cứu về vỏ tôm của Brasileiro *et al.* (2012) và Phạm Thị Đan Phượng và Trang Sĩ Trung (2012) với các kết quả lần lượt là 12,4% và 24,3% thì hàm lượng protein trong nghiên cứu này cao hơn. Hàm lượng chitin trong vỏ tôm thẻ chân trắng là 28,1% và thấp hơn so với nghiên cứu của Phạm Thị Đan Phượng và Trang Sĩ Trung (2012) là 29,4%. Nhìn chung, các giá trị này chênh lệch không lớn và đều thể hiện rằng chitin là một thành phần chính chiếm hàm lượng lớn trong vỏ tôm thẻ chân trắng.

Nguyên nhân là do khi thời gian phản ứng càng dài thì lysozyme có khả năng tiếp xúc với lượng cơ chất chitin huyền phù càng nhiều, dẫn đến hàm lượng đường khử tạo ra tăng dần. Tuy nhiên, quá trình này không phải là một quá trình tuyến tính, sau 12 giờ thì hàm lượng đường khử đã đạt được giá trị cao nhất là 150 μM, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với thí nghiệm thứ 4 và 8 giờ, sau đó giá trị này tiếp tục giữ nguyên ở các mốc 16, 20 và 24 giờ. Kết quả này chứng tỏ việc tăng thời gian thủy phân chitin huyền phù từ 12 đến 24 giờ sẽ không làm tăng thêm lượng sản phẩm do các sản phẩm này đã ức chế khả năng hoạt động của lysozyme. Cụ thể, với nghiên cứu của Jolleès *et al.* (1968), lysozyme từ lòng trắng trứng gà đã được chứng minh là có thể bị ức chế bởi N-acetylglucosamine (GlcNAc), dimer GlcNAc-GlcNAc và các hợp chất có liên quan đến GlcNAc.

Xu hướng lượng đường khử tăng dần theo thời gian cũng đã từng được ghi nhận bởi các nghiên cứu của Skujins *et al.* (1973) và Pangburn *et al.* (1982) khi các nghiên cứu này lần lượt thủy phân chitin huyền phù và chitin được deacetyl hóa một phần bằng lysozyme. Bên cạnh, với việc sử dụng các mốc thời gian thủy phân ngắn (cao nhất là 180 phút), các nghiên cứu này vẫn chưa thể hiện rõ được sự ảnh

hường của các mốc thời gian lâu hơn lên hoạt tính của lysozyme. Chính vì vậy, với hàm lượng đường khử được tạo ra cao nhất trong thí nghiệm này (150

μM), nghiệm thức thời gian thủy phân 12 giờ đã được chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.



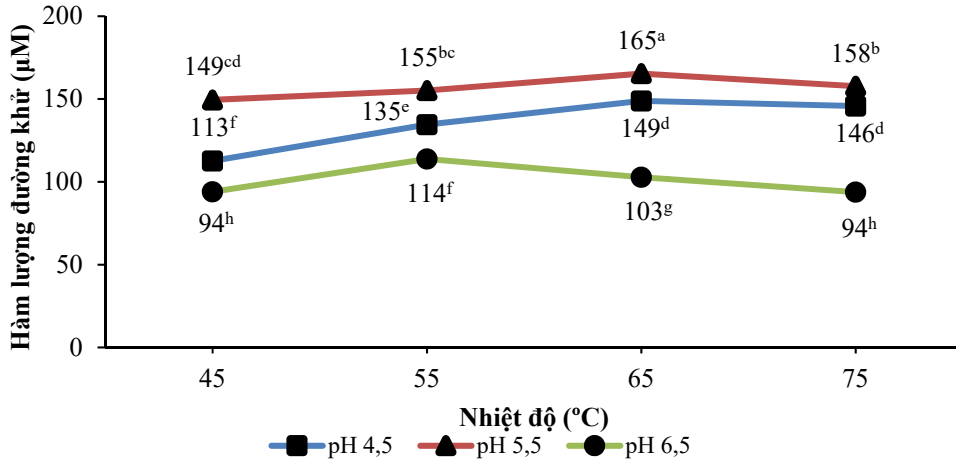
Hình 1: Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng đường khử sinh ra của phản ứng thủy phân chitin huyền phù bằng lysozyme

* Ghi chú: CV (%) = 2,58. Các giá trị có cùng ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

3.2.2 Ảnh hưởng tương tác của pH và nhiệt độ lên quá trình thủy phân chitin huyền phù

Hai nhân tố nhiệt độ và pH đều ảnh hưởng độc lập và tương tác đến quá trình thủy phân chitin

huyền phù khi $p < 0,05$ ở mức độ tin cậy 95%. Theo Fleming và Allision (1922), và Sandow (1926), rằng nhiệt độ và pH được xem là 2 nhân tố chính ảnh hưởng đến cấu trúc, khả năng hoạt động và khả năng chịu nhiệt của lysozyme.



Hình 2: Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hàm lượng đường khử sinh ra trong quá trình thủy phân chitin huyền phù bằng lysozyme

* Ghi chú: CV(%) = 2,93. Các giá trị có cùng ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Quá trình thủy phân chitin huyền phù ở các nghiệm thức pH 5,5 thì tạo ra lượng đường khử cao hơn so với các nghiệm thức pH 4,5 và pH 6,5 (Hình 2). Cụ thể, hàm lượng đường khử ở các mốc nhiệt độ tại pH 5,5 thì có giá trị nằm trong khoảng 149-165 μM, trong khi tại pH 4,5 và pH 6,5 thì các giá trị này lần lượt nằm trong khoảng 113-149 μM và

94-114 μM. Như vậy, pH 5,5 là giá trị pH thích hợp cho lysozyme để thủy phân chitin huyền phù. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Thammasirirak *et al.* (2001) khi nghiên cứu này cho rằng giá trị pH tối ưu cho lysozyme từ lòng trắng trứng gà để thủy phân glycol chitin là vào khoảng pH 5. So với giá trị pH thích hợp để thủy phân thành peptidoglycan ở vi khuẩn là khoảng 6,2 (Smolelis and Hartsell, 1951)

thì lysozyme cần một môi trường có tính acid hơn để thủy phân các liên kết β -1,4-glycoside của cấu trúc chitin. Tóm lại, pH là nhân tố ảnh hưởng trực tiếp đến mức độ ion hóa, cấu trúc và tính ổn định của trung tâm hoạt động cũng như ái lực liên kết giữa cơ chất và enzyme, vì thế các enzyme cũng như lysozyme đều cần môi trường pH thích hợp đối với từng loại cơ chất khác nhau.

Tại giá trị pH 5,5, khi tăng dần nhiệt độ từ 45°C đến 65°C thì hàm lượng đường khử tạo ra tăng dần và đạt giá trị cao nhất tại nhiệt độ 65°C (165 μ M), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại (Hình 2) và vận tốc phản ứng thủy phân chitin huyền phù của lysozyme tăng dần theo nhân tố nhiệt độ. Tuy nhiên, khi nhiệt độ được tăng đến 75°C thì hàm lượng đường khử tạo ra lại giảm xuống còn 158 μ M. Nguyên nhân là do ở nhiệt độ quá cao thì lysozyme có thể bị biến tính dẫn đến tốc độ phản ứng thủy phân giảm dần, tương tự như phát hiện của Fleming và Allision (1922) khi nghiên cứu này gây bất hoạt lysozyme ở nhiệt độ 75°C.

Một xu hướng khác, các nghiệm thức pH 4,5, hàm lượng đường khử có xu hướng tăng dần theo nhiệt độ và duy trì ở giá trị khoảng 149 μ M tại 65°C và 75°C. Xu hướng kết quả này cũng đã được ghi nhận trong nghiên cứu của Thammasirirak *et al.* (2001) khi hoạt tính thủy phân chitin của lysozyme đạt giá trị cao nhất tại khoảng 65 - 75°C trong môi trường pH 4,75. Theo Smolelis and Hartsell (1951) lysozyme có khả năng chịu nhiệt tốt hơn khi được hòa tan trong môi trường đệm có tính acid và enzyme này chỉ bị mất hoàn toàn hoạt tính ở nhiệt độ cao khi giá trị pH lớn hơn 7. Do đó, so với các nghiệm thức ở pH 4,5 và pH 5,5 thì lysozyme ở môi trường pH 6,5 có khả năng chịu nhiệt kém hơn, dẫn đến hàm lượng đường khử tạo ra ở vùng pH này giảm dần sau mốc nhiệt độ 65°C.

Những kết quả trên cho thấy, để đảm bảo lysozyme có thể thủy phân tốt chitin huyền phù, nghiệm thức pH 5,5 ở nhiệt độ 65°C đã được chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo của nghiên cứu.

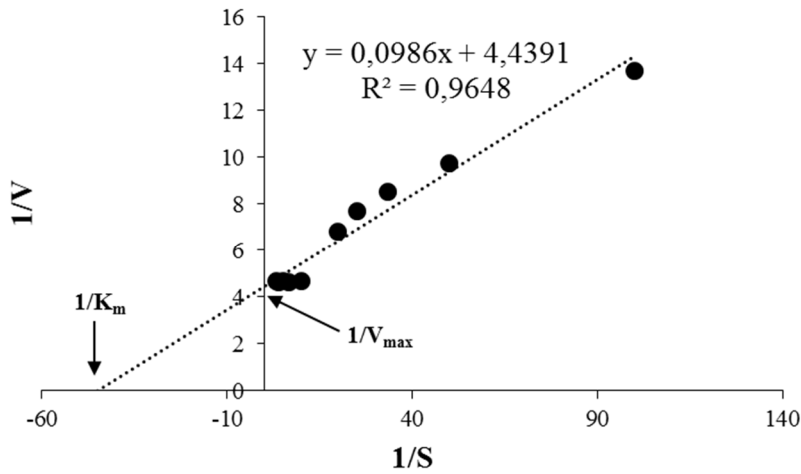
3.2.2 Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất chitin huyền phù lên hoạt tính lysozyme

Khi tăng dần nồng độ cơ chất chitin huyền phù, vận tốc thủy phân của lysozyme tăng dần và đạt giá trị cao nhất là 0,2150 μ M/phút tại nồng độ 0,1 mg/mL (Hình 3), khác biệt có ý nghĩa thống kê so

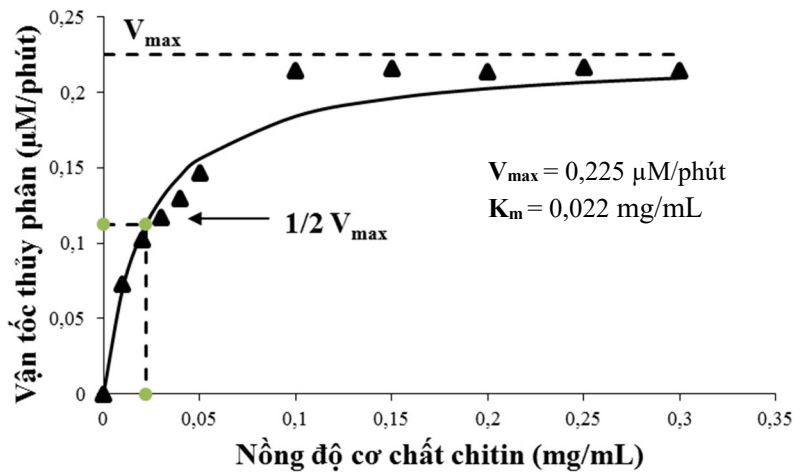
với các nghiệm thức có nồng độ cơ chất từ 0,01 đến 0,05 mg/mL. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ cơ chất từ 0,1 mg/mL đến 0,3 mg/mL thì hoạt tính lysozyme gần như không tăng thêm khi vận tốc thủy phân ở các nghiệm thức này khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê. Nguyên nhân do khi nồng độ cơ chất thấp, lượng lysozyme có trong phản ứng sẽ ngay lập tức kết hợp với các cơ chất để tạo thành phức chất “enzyme-cơ chất” rồi bắt đầu thủy phân tạo sản phẩm. Vận tốc thủy phân sẽ đạt được giá trị cực đại khi toàn bộ lượng enzyme liên kết được với cơ chất và vận tốc này sẽ không tăng thêm dù lượng cơ chất có được bổ sung tiếp tục (Michaelis and Menten, 1913).

Sự ảnh hưởng của nồng độ cơ chất chitin huyền phù lên tốc độ thủy phân của lysozyme được thể hiện ở Hình 3 theo 2 phương trình Lineweaver-Bur và Michaelis-Menten. Có thể thấy rằng, nồng độ cơ chất chitin huyền phù và tốc độ thủy phân của lysozyme có mối tương quan chặt chẽ với nhau khi hệ số R^2 ở phương trình Lineweaver-Bur có giá trị là 0,965. Vận tốc thủy phân của lysozyme phụ thuộc rất nhiều vào nồng độ chitin huyền phù có trong phản ứng. Ngoài ra, tốc độ thủy phân của lysozyme còn được biểu diễn dưới dạng một hàm của nồng độ cơ chất với hình dạng đường cong theo phương trình Michaelis-Menten (Hình 3B), tuân theo phản ứng bậc một (first order kinetic) ở các nghiệm thức có nồng độ cơ chất thấp và phản ứng bậc không (zero order kinetic) ở các nghiệm thức có nồng độ cơ chất cao. Giá trị vận tốc cực đại (V_{max}) và hằng số Michaelis-Menten (K_m) trong quá trình thủy phân chitin huyền phù được ghi nhận có giá trị lần lượt là 0,225 μ M/phút và 0,022 mg/mL. So với nghiên cứu của Pangburn *et al.* (1982) về quá trình thủy phân của lysozyme trên cơ chất chitin được khử một phần gốc acetyl (partially deacetyled chitin) thì tốc độ phản ứng thủy phân của lysozyme trên cơ chất chitin huyền phù được thể hiện trong nghiên cứu này chậm hơn. Nguyên nhân có thể là do tính chất khác nhau của 2 loại cơ chất. Trong khi chitin huyền phù là dạng chitin có khối lượng phân tử nhỏ lơ lửng trong môi trường phản ứng thì chitin được khử một phần gốc acetyl là dẫn xuất của chitin có khả năng hòa tan được trong nước. Do đó, cơ chất này đã hỗ trợ tích cực cho quá trình thủy phân của lysozyme.

Những kết quả trên, với vận tốc thủy phân cực đại là 0,225 μ M/phút, nồng độ chitin huyền phù 0,1 mg/mL được xem là nồng độ thích hợp cho quá trình thủy phân chitin huyền phù bằng lysozyme.



A



B

Hình 2: Sự phụ thuộc tốc độ phản ứng của lysozyme vào nồng độ cơ chất chitin huyền phù theo phương trình Lineweaver-Burk (A) và Michaelis-Menten (B)

* Ghi chú: CV (%) = 7,69

Sản phẩm thủy phân được đông khô 48 giờ thu được bột chitin oligosaccharide dưới dạng bột màu trắng. Kết quả đánh giá cảm quan cho thấy, bột chitin oligosaccharide nhẹ, mịn và có thể tan được trong nước. Kết quả mô tả này phù hợp với nghiên cứu của Ngo *et al.* (2009) khi nghiên cứu này đã tiến

hành sản xuất bột chitin oligosaccharide với các khối lượng phân tử khác nhau từ chitin công nghiệp. Với khả năng vượt trội hơn so với chitin là có thể hòa tan được trong nước, Jeon *et al.* (2000) cho rằng chitin oligosaccharide sẽ phá vỡ đi giới hạn trong ứng dụng của chitin đối với các lĩnh vực khác, đặc biệt là trong y dược.



Hình 4: Bột vỏ tôm (A); chitin (B) và chitin oligosaccharide (C)

4 KẾT LUẬN

Điều kiện thích hợp để thủy phân chitin huyền phù bằng lysozyme để tạo chế phẩm oligosaccharide là ở nhiệt độ 65°C, pH 5,5 trong thời gian 12 giờ. Vận tốc thủy phân chitin huyền phù với nồng độ 0,1 mg/mL của lysozyme lòng trắng trứng gà đạt vận tốc cực đại là 0,225 $\mu\text{M}/\text{phút}$, và giá trị hằng số K_m đạt được là 0,022 mg/mL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmed, A.B.A., R.M. Taha, S. Mohajer, M.E. Elaagib. and S.K. Kim., 2012. Preparation, properties and biological applications of water soluble chitin oligosaccharides from Marine Organisms. *Russian Journal of Marine Biology*, 3(4): 351-358.
- AOAC International, 2003. Official methods of analysis of AOAC International. 17th edition. 2nd revision. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities.
- Arbia, W., L. Arbia, L. Adour and A. Amrane, 2013. Chitin extraction from Crustacean shells using biological methods – a review. *Food technology and Biotechnology*, 51(1): 12-25.
- Bradford, M.M, 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brasileiro, O.L., J.M.O. Cavalheiro, J.P.S. Prado, A.G. Anjos and T.T.B. Cavalheiri, 2012. Determination of the chemical composition and functional properties of shrimp waste protein concentrate and lyophilized flour. *Ciencia e Agrotecnologia*, 36(2): 189-194.
- Dutta, P.K., J. Dutta and V.S. Tripathi, 2004. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63: 20-31.
- Fleming, A. and V.D. Allison, 1922. Observations on a Bacteriolytic Substance (“Lysozyme”) Found in Secretions and Tissues. *International Journal of Experimental Pathology*, 3(5): 252-260.
- Imoto, T. and K. Yagishita, 1971. A simple activity measurement of lysozyme. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35(7): 1154-1156.
- Jeon, Y., F. Shahidi and S. Kim, 2000. Preparation of chitin and chitosan oligomers and their application in physiological functional foods. *Food Reviews International*, 16(2): 159-176.
- Jolleès, P., J.S. Blancard, D. Charlemagne, A.C. Dianoux, J. Jollès and J.L. Le Baron, 1968. Comparative behaviour of six different lysozymes in the presence of an inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 151(2): 532-534.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1): 265-275
- Mai Chí Linh, Võ Minh Nhật và Trần Văn Nhật, 2014. Tạo chế phẩm bột lysozyme từ lòng trắng trứng gà. *Nghiên cứu khoa học sinh viên. Đại học Cần Thơ*, 50 trang
- Michaelis, L. and M.L. Menten, 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z.* 49: 333-369.
- Mukhin, V. A. and V.Y. Novikov, 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from crustaceans of the Barents Sea. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37: 538-542.
- Nelson, D.L. and M.C. Cox, 2004. *Lehninger Principles of biochemistry*. Fourth edition. Book News. Portland. 1130 pp.
- Ngo, D. N., S.H. Lee, M.M. Kim and S.K. Kim, 2009. Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in RAW 264.7 cells. *Journal of functional foods*, 1: 188-198.

- Nguyễn Thị Hà, 2012. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chủng *Aspegillus protuberus* sinh tổng hợp enzyme chitinase được phân lập từ rừng ngập mặn Cần Giờ. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 22(b): 26-35.
- Nguyễn Văn Thiết và Đỗ Ngọc Tú, 2007. Nghiên cứu tách chiết chitin từ đầu - vỏ tôm bằng các phương pháp sinh học. Tạp chí Khoa Học và Công Nghệ Trường Đại học Cần Thơ?. 45(4): 43-50.
- Pangburn, S.H., P.V. Trescony and J. Heller, 1982. Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials*, 3: 105-108.
- Phạm Thị Đan Phượng và Trang Sĩ Trung, 2012. Tính chất của chitin và chitosan từ vỏ tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) khử protein bằng phương pháp hóa học và sinh học. Tạp chí Trường Đại học Cần Thơ. 3:48-52.
- Sandow, A., 1926. The antibacterial activity of egg white. *Experimental Biology and Medicine*, 24: 172-175.
- Shugar, D., 1952. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochimica et biophysica acta*, 8(3): 302-309.
- Skujins, J., A. Pukite and A.D. McLaren, 1973. Adsorption and reactions of chitinase and lysozyme on chitin. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 2(2): 221-228.
- Smolelis, A.N. and S.E. Hartsell, 1951. Factors affecting the lytic activity of lysozyme. *Journal of bacteriology*. 63(5): 665-674.
- Thammasirirak, S., T. Torikata, K. Takami, K. Murata and T. Araki, 2001. Purification and characterization of goose type lysozyme from Cassowary (*Casuarus casuarus*) egg white. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65(3): 584-592.
- Trung, T.S. and P.T.D. Phuong, 2012. Bioactive compounds from by-products of shrimp processing industry in Vietnam. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20(1): 194-197.
- Younes, I. and M. Rinaudo, 2015. Review: Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, Properties and Application. *Marine Drug*, 13: 1133-1174.