

Preliminary study on chemical mechanism of decrease of tetrodotoxin content in ovaries of a puffer fish *Lagocephalus inermis* (Temminck & Schlegel, 1850) fermented with rice bran

Le Ho Khanh Hy*, Pham Xuan Ky, Dao Viet Ha, Nguyen Thu Hong, Phan Bao Vy, Doan Thi Thiet, Nguyen Phuong Anh

Institute of Oceanography, VAST, Vietnam

*E-mail: lehokhanhhy@gmail.com

Received: 21 September 2017; Accepted: 16 December 2017

©2019 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

Abstract

Tetrodotoxins in salted and fermented ovaries with rice bran of a puffer fish *Lagocephalus inermis* (Temminck & Schlegel, 1850) during five months were determined by high-performance liquid chromatography with fluorometric detector (HPLC- FLD). The analysed results showed that the original ovaries contained only tetrodotoxin with content of 7.59 µg/g fresh weight. 4,9-Anhydrotetrodotoxin - an isomer which is less toxic than tetrodotoxin has been found in all ovary samples since the second month. Tetrodotoxin in the ovaries disappeared in the 4th month of the experiment. In addition, 4,9-anhydrotetrodotoxin level in ovaries increased during fermentation. The present study contributes to clarifying the chemical mechanism of decreasing tetrodotoxin content in fermented ovary of puffer fish.

Keywords: 4,9-anhydrotetrodotoxin, fermentation, *Lagocephalus inermis*, ovaries, rice bran, tetrodotoxin.

Nghiên cứu bước đầu về cơ chế hóa học của sự suy giảm hàm lượng tetrodotoxin ở trứng cá nóc răng mỏ chim *Lagocephalus inermis* (Temminck & Schlegel, 1850) được lên men bằng cám gạo

Lê Hồ Khánh Hỷ*, Phạm Xuân Kỳ, Đào Việt Hà, Nguyễn Thu Hồng, Phan Bảo Vy, Đoàn Thị Thiết, Nguyễn Phương Anh

Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

*E-mail: lehokhanhhyy@gmail.com

Nhận bài: 21-9-2017; Chấp nhận đăng: 16-12-2017

Tóm tắt

Tetrodotoxin trong trứng cá nóc răng mỏ chim *Lagocephalus inermis* (Temminck & Schlegel, 1850) ủ muối và bổ sung cám gạo trong 5 tháng đã được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò huỳnh quang (HPLC-FLD). Kết quả phân tích cho thấy mẫu trứng ban đầu chứa tetrodotoxin với hàm lượng 7,59 µg/g mẫu tươi. Sau khi ủ 2 tháng, 4,9-anhydrotetrodotoxin, một đồng phân có độc tính thấp hơn tetrodotoxin, đã xuất hiện cùng với sự suy giảm hàm lượng tetrodotoxin trong các mẫu trứng lên men. Hàm lượng tetrodotoxin trong trứng mất hoàn toàn sau 4 tháng thí nghiệm. Đồng thời với sự suy giảm hàm lượng tetrodotoxin là sự gia tăng hàm lượng 4,9-anhydrotetrodotoxin trong trứng cá lên men. Nghiên cứu này góp phần làm sáng tỏ một phần cơ chế hóa học về sự suy giảm hàm lượng của tetrodotoxin ở trứng cá nóc trong quá trình lên men.

Từ khóa: 4,9-anhydrotetrodotoxin, cám gạo, *Lagocephalus inermis*, lên men, tetrodotoxin, trứng cá nóc.

GIỚI THIỆU

Trữ lượng cá nóc ở Việt Nam ước tính gần 40.000 tấn/năm, chiếm 2–6% tổng sản lượng hải sản khai thác [1]. Sử dụng cá nóc làm thực phẩm là tập quán lâu đời của người dân ở một số nước Châu Á như Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc, Philippines, Malaysia và Việt Nam do cá nóc có thịt trắng và mùi vị thơm ngon. Thông thường, người dân vùng ven biển Việt Nam có thói quen sử dụng cá nóc làm thực phẩm với nhiều hình thức chế biến khác nhau như làm cá khô, nước mắm hay chả cá. Tuy nhiên, nhiều loài cá nóc có chứa độc tố tetrodotoxins (TTXs). Với liều thấp từ 1–2 mg, TTX đã gây ra hiện tượng tê liệt, có thể dẫn đến tử vong ở người trưởng thành với khối

lượng cơ thể khoảng 75 kg [2]. Do có một số tính chất hóa học khá đặc biệt như bền nhiệt, bền ở môi trường axit nên độc tố này không bị phân hủy, biến tính trong quá trình xử lý ở nhiệt độ cao hay ở nhiệt độ rất thấp, do đó có thể tồn tại ngay cả trong thức ăn đã được nấu chín (xào, luộc, hấp...), hay trong sản phẩm cấp đông, đóng hộp. Khi con người ăn phải thức ăn có chứa độc tố TTX sẽ có các triệu chứng tê, ngứa môi và bên trong miệng; yếu, liệt cơ hoành và cơ ngực; hạ huyết áp; khó thở (do liệt cơ hô hấp); trụy tim mạch và có thể dẫn đến tử vong.

Việc loại bỏ TTXs trong sản phẩm cá nóc độc là một thử thách đối với các nhà khoa học. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng quá trình

lên men có thể làm suy giảm hoặc loại bỏ hoàn toàn độc tố TTXs ở sản phẩm cá nóc. Đào Việt Hà và Shigeru Sato (2013) [3] xác định sau 12 tháng thí nghiệm lên men nước mắm cá nóc độc Chấm Cam *Torquigener gloerfelti*, hàm lượng độc tố TTX trong sản phẩm đã giảm một lượng đáng kể. Ở vùng Hokuriku tại Nhật Bản, người dân sử dụng phương pháp muối truyền thống và sản phẩm lên men có tên là “Nukazuke” hoặc “Kasuzuke” từ buồng trứng cá nóc độc. Buồng trứng cá nóc được cho thêm cám gạo hoặc bã rượu Sake từ 18 tháng đến 24 tháng sau khi đã ướp muối trong 6 tháng đến 12 tháng trong điều kiện nhiệt độ 20–25°C [4]. Bằng cách xử lý này, độc tính của buồng trứng giảm đáng kể đến mức có thể được sử dụng làm thực phẩm [4, 5]. Các công bố tiếp theo của Kobayashi et al., (1995, 2003, 2004) [6–8] cũng cho thấy có sự suy giảm độc tính TTX trong quá trình lên men trứng cá nóc nhưng chưa đưa ra được lý giải thích hợp. Những nghiên cứu trước đây về độc tính ở trứng cá nóc lên men đã sử dụng các phương pháp phân tích như thử nghiệm sinh học trên chuột (MBA) [4, 5], hoặc đo điện sinh học ở kênh ion Na⁺ của tế bào thần kinh của chuột [9]. Những phương pháp này không nêu rõ cơ chế của sự suy giảm hàm lượng của độc tố. Một số nhận định của Kobayashi et al., (1995, 2003, 2004) [6–8] cho rằng sự suy giảm độc tính của trứng cá nóc độc trong quá trình lên men có thể do tác động của vi sinh vật: Hoặc do vi sinh vật phân hủy hoặc sự sinh trưởng của chúng dẫn đến sự kiềm hóa môi trường lên men, là yếu tố gây nên sự không bền vững cấu trúc hóa học của TTX, chứ không phải trực tiếp phá hủy cấu trúc TTX. Giả thiết này vẫn chưa có bằng chứng rõ ràng. Một giả thiết khác được đề cập, đó là sự suy giảm độc tính còn có thể diễn ra theo cơ chế hóa học. Nakamura và Yasumoto (1985) [10] đã xác định được độc tính của TTX là 4.500 MU/mg, trong khi đó, độc tính của 4-*epi*TTX là 790 MU/mg và 4,9-*anhydro*TTX là 92 MU/mg. Trong các điều kiện nhất định, TTX có thể được chuyển sang axit tetrodonic hoặc sang các dạng 4-*epi*TTX và 4,9-*anhydro*TTX [11]. Theo đó, có thể sự suy giảm độc tính tổng số trong quá trình lên men là do sự chuyển đổi TTX sang dạng đồng phân ít độc

hơn nói trên. Cho đến nay, các nghiên cứu vẫn chưa làm sáng tỏ về sự chuyển hóa hóa học của TTX ở trứng cá nóc lên men. Trong nghiên cứu này, kết quả phân tích thành phần, hàm lượng của TTX và một số đồng phân (bao gồm 4-*epi*TTX và 4,9-*anhydro*TTX) bằng HPLC-FLD trong trứng lên men của cá nóc răng mỏ chim *Lagocephalus inermis*, một trong những loài có độc tính cao được trình bày nhằm góp phần làm sáng tỏ phần nào nhận định này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Mẫu trứng

Cá nóc răng mỏ chim *Lagocephalus inermis* được thu mua tại bến cá vùng biển Vạn Ninh tỉnh Khánh Hòa vào tháng 4/2016. Mẫu cá được bảo quản bằng đá lạnh, sau đó vận chuyển về phòng thí nghiệm để giải phẫu thu toàn bộ buồng trứng. Buồng trứng thành thực của 2 cá thể với tổng trọng lượng 11,5 kg được trộn đều, xay nhuyễn và phân tích hàm lượng độc tố trước khi sử dụng trong các thí nghiệm lên men.

Cám gạo

Cám gạo chưa tách dầu theo tiêu chuẩn hạng 1 đã xử lý được mua tại cơ sở sản xuất lúa gạo, đảm bảo yêu cầu chất lượng qua đánh giá cảm quan theo tiêu chuẩn 10TCN 864:2006 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. Trước khi sử dụng trong các thí nghiệm lên men, cám gạo được sấy từ nhiệt độ thường lên đến 125–135°C và giữ trong khoảng 3 giây, tiếp theo hạ nhiệt độ đến 97–99°C trong 3 phút, sau đó để nguội [12, 13].

Muối NaCl (Công ty TNHH Muối Thanh Tâm, Việt Nam)

Đạt tiêu chuẩn của Bộ Y tế-Quyết định 809/YTĐT.

Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm lên men trứng cá nóc

Thí nghiệm lên men trứng cá nóc được bố trí theo Ozawa (1986) [5] với một số bước thay đổi, bao gồm rút ngắn giai đoạn ủ muối trước khi bổ sung cám gạo từ 7 tháng ở nhiệt độ 20–25°C xuống 2 tháng ở nhiệt độ 30–35°C. Thời gian bắt đầu bố trí thí nghiệm từ tháng 5/2016; kết thúc thí nghiệm vào tháng 10/2016.

Lô đối chứng-lên men bằng muối ăn: Cân lần lượt 60 g trứng cá nóc đã xay nhuyễn cho vào 3 hũ nhựa PVC khác nhau. Bổ sung vào mỗi hũ muối ăn NaCl theo tỉ lệ khối lượng 3 trứng:1 muối (20 g muối/hũ). Số lần lặp lại thí nghiệm n=3, các hũ mẫu lô đối chứng được đánh số theo thứ tự từ 1–3. Thí nghiệm được bố trí vào tháng 5/2016.

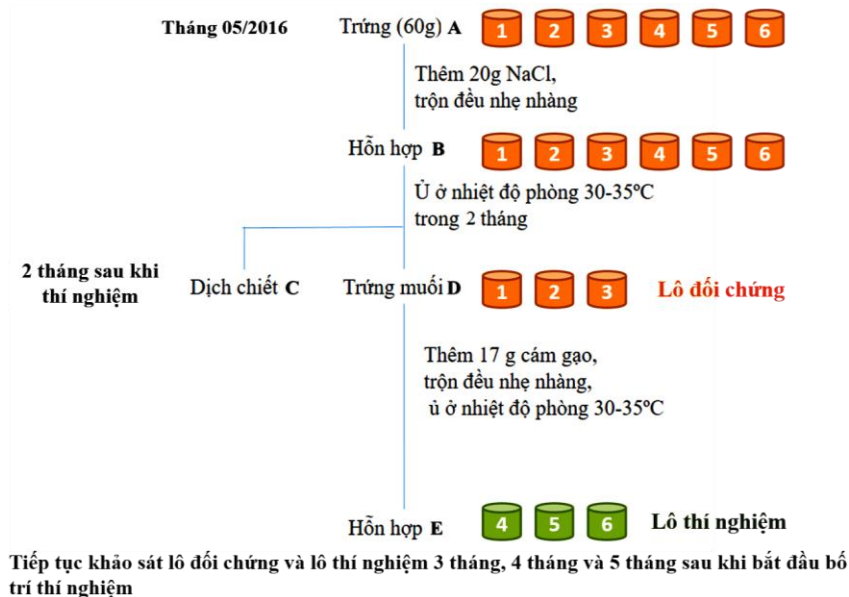
Lô thí nghiệm-lên men bằng hỗn hợp muối và cám gạo: Lô thí nghiệm được bố trí ban đầu tương tự lô đối chứng. Cân lần lượt 60 g trứng cá nóc đã xay nhuyễn cho vào 3 hũ nhựa PVC khác nhau. Bổ sung vào mỗi hũ muối ăn NaCl theo tỉ lệ khối lượng 3 trứng:1 muối (20 g muối/hũ). Số lần lặp lại thí nghiệm n=3, các hũ

mẫu lô thí nghiệm được đánh số theo thứ tự từ 4–6. Thí nghiệm được bố trí vào tháng 5/2016.

Sau 2 tháng lên men bằng NaCl tương tự như lô đối chứng, vào tháng 7/2016 lô thí nghiệm được bổ sung cám gạo theo tỉ lệ theo khối lượng 1:3,5 (tức 17 g cám gạo/hũ). Trước khi bổ sung cám gạo, toàn bộ dịch thu từ mẫu (gần 1 ml) ở 3 hũ của lô thí nghiệm và 3 hũ của lô đối chứng được phân tích độc tố.

Sau đó, cả 2 lô đối chứng và thí nghiệm sẽ được phân tích hàm lượng độc tố vào các tháng tiếp theo: tháng 8, tháng 9, tháng 10 năm 2016.

Quy trình thí nghiệm được mô tả tóm tắt theo sơ đồ sau (hình 1).



Hình 1. Sơ đồ tóm tắt quy trình lên men trứng cá nóc răng mỏ chim *L. inermis* bằng cám gạo

Thu mẫu trong thí nghiệm lên men

Toàn bộ các mẫu trứng trong các lô thí nghiệm được thu định kỳ để phân tích hàm lượng TTXs. Đồng thời, pH của các mẫu trứng trong các lô thí nghiệm cũng được đo. Theo định kỳ hàng tháng, kể từ thời gian bắt đầu thí nghiệm, khoảng 2–3 g trứng trong mỗi hũ thí nghiệm được thu thập tại 3 vị trí khác nhau của mỗi hũ (trên bề mặt, lớp giữa và lớp gần đáy). Trộn đều mẫu để phân tích độc tố.

Xác định giá trị pH của mẫu nghiên cứu

Xác định pH mẫu trứng bằng cách cắm trực tiếp điện cực của máy đo pH (Mettler Toledo)

vào các mẫu trứng ở những vị trí khác nhau như trên bề mặt, lớp giữa và lớp gần đáy.

Tính toán và xác định pH dịch thu từ mẫu bằng cách đo pH dịch chiết pha loãng với nước cất 2 lần.

Xác định hàm lượng độc tố

Tách chiết độc tố: Các mẫu được phân tích và tách chiết độc tố bao gồm mẫu trứng cá nóc sau xay nhuyễn, các lô thí nghiệm và đối chứng (2–3 g đối với mẫu trứng, hỗn hợp; 0,2 ml ≈ 0,2 g đối với dịch chiết) theo thời gian hàng tháng. Độc tố TTXs được tách chiết trong axit axetic (Merck) 1% với tỷ lệ 1:4 (g:ml), đun sôi

cách thủy trong 15 phút, ly tâm (3.000 g × 30 phút) để thu nhận dịch trong. Dịch trong này được lọc qua màng lọc Millipore 10k Da trước khi dùng để xác định độc tố TTXs bằng HPLC-FLD.

Phân tích độc tố: Thành phần và hàm lượng độc tố TTX và 2 đồng phân *4-epi*TTX (*4epi*) và *4,9-anhydro*TTX (*Anh*TTX) trong các mẫu thí nghiệm được phân tích bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò huỳnh quang (HPLC-FLD, Shimadzu), cột Wakosil-II 5C18 (4,6 mm × 250 mm) theo Yotsu et al., (1989) [14]. Hỗn hợp độc tố chuẩn TTXs (TTX: 12,3 μM, *4-epi*TTX: 7,5 μM, *4,9-anhydro*TTX: 13,1 μM) do trường Đại học Kitasato, Nhật Bản cung cấp. Hàm lượng độc tố trong mẫu được tính toán dựa vào hàm lượng độc tố chuẩn TTXs tính trên 1 g trứng cá nóc trong mẫu phân tích. Kết quả hàm lượng độc tố được chuyển đổi qua độc tính MU/g theo Nakamura và Yasumoto (1985) [10], cụ thể như sau: 1 mg TTX tương ứng với 4.500 MU, 1 mg *4-epi*TTX tương ứng với 790 MU, 1 mg *4,9-anhydro*TTX tương ứng với 92 MU; trong

đó 1 MU hay còn gọi là một đơn vị chuột, là lượng độc tố cần thiết để giết một con chuột 20 g trong 15 phút thông qua tiêm đường bụng [15].

Xử lý số liệu

Hàm lượng độc tố TTXs (μg/g), độc tính (MU/g), giá trị pH được thể hiện bằng giá trị trung bình ± SE. Phân tích quan hệ hàm lượng giữa TTX, *4epi*-TTX và *4,9-anhydro*TTX bằng phương pháp hồi quy tuyến tính trên phần mềm Excel 2013. Sự sai khác hàm lượng độc tố TTXs trong các mẫu nghiên cứu trong cùng lô theo thời gian được thực hiện bằng phân tích ANOVA một chiều, độ tin cậy 95% (p < 0,05), tiếp theo kiểm định sự khác biệt của các giá trị trung bình bằng phép thử Tukey.

Sự sai khác hàm lượng độc tố TTXs giữa 2 lô đối chứng và thí nghiệm ở tháng thứ 3 được phân tích bằng Student t-test.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Giá trị pH của các mẫu trứng cá lên men theo thời gian

Bảng 1. Giá trị pH của các mẫu trứng cá lên men theo thời gian (các kí hiệu B, C, D, E tương ứng với mẫu đã được trình bày trong hình 1)

| Mẫu | Thời gian thí nghiệm (tháng) | | | | |
|---------------------------------|------------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 5/2016 | 7/2016 | 8/2016 | 9/2016 | 10/2016 |
| Hỗn hợp trứng muối B | 5,00 ± 0,01 | 5,06 ± 0,04 | - | - | - |
| Dịch chiết C | - | 5,75 ± 0,07 | - | - | - |
| Trứng muối D | - | - | 5,14 ± 0,05 ^a | 6,08 ± 0,09 ^a | 6,84 ± 0,08 ^a |
| Hỗn hợp trứng muối và cám gạo E | - | - | 4,66 ± 0,06 ^b | 6,10 ± 0,04 ^a | 6,85 ± 0,07 ^a |

Ghi chú: “-”: Không có số liệu; Các ký tự a, b khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa của giá trị trung bình pH (p < 0,05).

Bảng 1 trình bày giá trị pH của các mẫu trứng cá nóc trong thí nghiệm lên men theo thời gian. Theo đó, có thể nhận thấy pH của các mẫu trứng có xu hướng tăng theo thời gian thí nghiệm nhưng nằm trong khoảng axit đến trung tính. Sau 2 tháng, pH của hỗn hợp trứng muối B hầu như không thay đổi so với ban đầu. Dịch chiết C từ hỗn hợp trứng muối B có pH cao hơn là 5,75 ± 0,07. Ở tháng thứ 3 (tháng 8/2016), pH trứng muối D (5,14 ± 0,05) cao hơn giá trị pH hỗn hợp trứng muối và cám gạo E (4,66 ± 0,06). Sự khác biệt trên (p < 0,05) có thể là do cám gạo chứa nhiều thành phần dinh dưỡng, giàu chất xơ

hòa tan cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật, đặc biệt khả năng sinh axit lactic cao trong quá trình lên men [12] đã làm giảm pH của mẫu có chứa cám gạo. Sau một tháng bổ sung cám gạo vào hỗn hợp trứng muối, cám gạo có thể đã kích thích sự phát triển của vi khuẩn probiotics có hoạt tính sinh axit lactic và làm cho pH của hỗn hợp trở nên có tính axit hơn trứng muối. Ở các tháng thứ 4 và thứ 5, pH của trứng muối D và hỗn hợp bổ sung cám gạo E không có sự khác biệt (giá trị trung bình 6,08–6,10 tháng thứ 4 và giá trị trung bình 6,84–6,85 tháng thứ 5, p > 0,05). Ở giai đoạn này, quá trình kiềm hóa xảy

ra từ từ và sau 5 tháng, pH tăng từ 5 đến 6,85. So với các nghiên cứu trước đây, kết quả ghi nhận xu hướng tăng dần theo thời gian của giá trị pH trong thí nghiệm này tương tự với kết quả của một số nghiên cứu khác. Kobayashi et al., (1995) [6] đã ghi nhận pH của hỗn hợp trứng ủ muối thay đổi từ 5,44–6,28 trong 1 năm. Ở một nghiên cứu khác, Kobayashi et al., (2003, 2004) [7, 8] cho thấy pH của hỗn hợp trứng bổ sung cám gạo tăng từ 6,6–7,4 trong 30 ngày.

Hàm lượng TTXs trong mẫu trứng cá lên men theo thời gian

Hàm lượng TTXs trong mẫu trứng cá ủ muối

Hàm lượng TTX, AnhTTX và tổng độc tính quy đổi của các mẫu trứng cá ủ muối theo thời gian được trình bày trong bảng 2, hình 2. Sắc ký đồ HPLC của TTXs mẫu chuẩn và mẫu trứng ủ muối đại diện được trình bày trong hình 3.

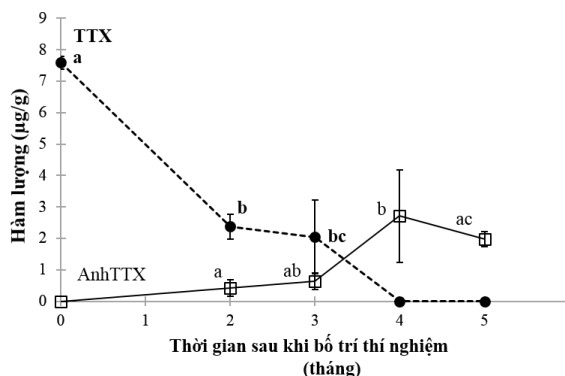
Bảng 2. Hàm lượng độc tố TTXs ($\mu\text{g/g}$) và độc tính (MU/g) của các mẫu trứng cá ủ muối và dịch chiết theo thời gian

| Thời gian thí nghiệm | Hàm lượng và độc tính TTX | | Hàm lượng và độc tính AnhTTX | | % Hàm lượng TTX so với ban đầu |
|-----------------------------|---------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| | $\mu\text{g/g}$ | MU/g | $\mu\text{g/g}$ | MU/g | |
| Tháng 5/2016 | $7,59 \pm 0,20^a$ | $34,17 \pm 0,88^a$ | 0 | 0 | 100 |
| 2 tháng sau khi thí nghiệm* | $2,38 \pm 0,39^b$ | $10,74 \pm 1,78^b$ | $0,42 \pm 0,25^a$ | $0,04 \pm 0,02^a$ | 31 |
| 3 tháng sau khi thí nghiệm | $2,05 \pm 1,18^{bc}$ | $9,23 \pm 5,32^{bc}$ | $0,64 \pm 0,27^{ab}$ | $0,06 \pm 0,02^{ab}$ | 27 |
| 4 tháng sau khi thí nghiệm | 0 | 0 | $2,71 \pm 1,47^b$ | $0,25 \pm 0,13^b$ | 0 |
| 5 tháng sau khi thí nghiệm | 0 | 0 | $1,98 \pm 0,24^{ac}$ | $0,18 \pm 0,02^{ac}$ | 0 |

Ghi chú: “*”: Thu mẫu dịch chiết: Sau 2 tháng ủ muối, hàm lượng TTX trong toàn bộ 1 ml dịch chiết là $3,64 \pm 1,91 \mu\text{g}$ (bằng 0,8% tổng hàm lượng TTX ban đầu) và AnhTTX là $0,54 \pm 0,13 \mu\text{g}$; Các chữ cái a, b, c khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa của giá trị trung bình hàm lượng và độc tính của mỗi độc tố ($p < 0,05$).

Theo bảng 2, mẫu trứng cá nóc ban đầu chỉ chứa một độc tố là TTX ($7,59 \pm 0,20 \mu\text{g/g}$ có độc tính tương đương $34,17 \pm 0,88 \text{ MU/g}$). Tuy nhiên, sau 2 tháng ủ muối, ở các mẫu trứng muối và dịch chiết của lô đối chứng có sự xuất hiện của đồng phân AnhTTX so với cơ chất ban đầu. Song song với sự xuất hiện đồng phân này, hàm lượng TTX có sự suy giảm rõ rệt so với mẫu ban đầu. Cụ thể, sau 2 tháng của thí nghiệm, chỉ phát hiện được hàm lượng TTX chiếm 31% so với ban đầu trong mẫu trứng muối và 0,8% so với ban đầu trong mẫu dịch chiết thu từ mẫu trứng. Điều đó cho thấy sự suy giảm hàm lượng hay độc tính TTX theo dịch chiết ra ngoài mẫu trứng không đáng kể. Tuy nhiên, một hàm lượng nhất định của AnhTTX trong cả mẫu trứng muối đã được ghi nhận ($0,42 \pm 0,25 \mu\text{g/g}$) (bảng 2) và mẫu dịch từ trứng ($0,54 \pm 0,13 \mu\text{g/ml}$) (bảng 2*) ở lô đối chứng vào thời điểm này. Như vậy, có sự xuất hiện của đồng phân AnhTTX so với mẫu trứng ban đầu. Kết quả này cho phép nhận định, sự suy giảm độc tính TTX của hỗn hợp trứng

muối sau 2 tháng có thể do sự chuyển hóa của TTX sang AnhTTX trong điều kiện thí nghiệm.

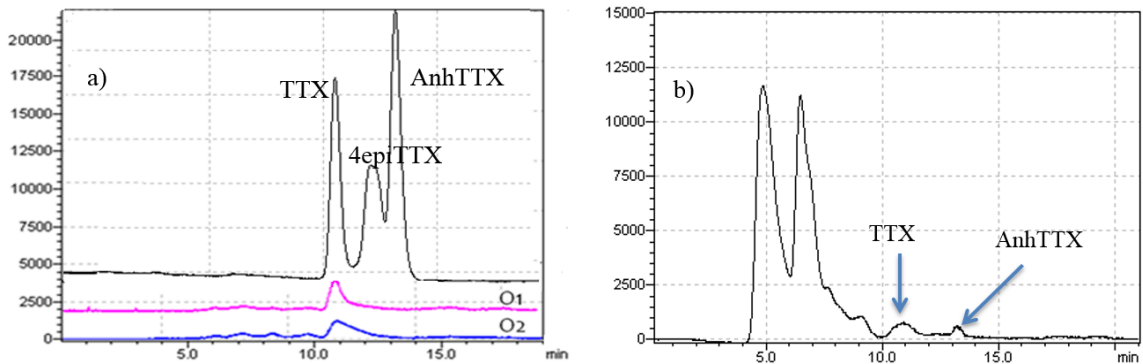


Hình 2. Hàm lượng TTX và AnhTTX ($\mu\text{g/g}$) theo thời gian của các mẫu trứng muối; Các chữ cái a, b, c khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa của giá trị trung bình hàm lượng của mỗi độc tố ($p < 0,05$)

Sang tháng thứ 3, hàm lượng TTX trong các mẫu ở lô đối chứng tiếp tục suy giảm còn $2,05 \pm 1,18 \mu\text{g/g}$ (còn 27% hàm lượng TTX ban đầu),

trong khi hàm lượng AnhTTX lại tăng, đạt đến $0,64 \pm 0,27 \mu\text{g/g}$. Từ tháng thứ 4, không phát hiện TTX trong mẫu trứng muối (hàm lượng bằng 0), trong khi hàm lượng AnhTTX gia tăng đáng kể, đạt giá trị $2,71 \pm 1,47 \mu\text{g/g}$. Tuy nhiên, sang tháng thứ 5, hàm lượng AnhTTX suy giảm còn $1,98 \pm 0,24 \mu\text{g/g}$. Đặc biệt, kết quả phân tích HPLC cho thấy ở tất cả các mẫu của lô đối

chứng đều xuất hiện thêm 1 đỉnh của một chất lạ có thời gian lưu khoảng phút thứ 5, trước đỉnh của TTX (hình 3). Do đó, nguyên nhân dẫn đến hiện tượng suy giảm rõ rệt của AnhTTX vào tháng thứ 5 có thể một phần vì không còn tiền chất TTX và tiếp tục bị phân hủy hoặc được chuyển hóa thành chất khác theo một cơ chế chưa được biết đến.



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC của: a) TTXs chuẩn và mẫu trứng ban đầu (O₁, O₂); b) Mẫu trứng ủ muối sau 2 tháng

Hàm lượng TTXs trong mẫu trứng cá của lô thí nghiệm (trứng cá ủ muối bổ sung cám gạo)

Hàm lượng TTX, AnhTTX và tổng độc tính quy đổi của các mẫu trứng cá ủ muối bổ sung

cám gạo theo thời gian được trình bày trong bảng 3, hình 4. Sắc ký đồ HPLC của TTXs mẫu chuẩn và mẫu trứng ủ muối bổ sung cám gạo đại diện được trình bày trong hình 5.

Bảng 3. Hàm lượng độc tố TTXs ($\mu\text{g/g}$) và độc tính (MU/g) của các mẫu trứng cá ủ muối bổ sung cám gạo theo thời gian

| Thời gian thí nghiệm | Hàm lượng và độc tính TTX | | Hàm lượng và độc tính AnhTTX | | % Hàm lượng TTX so với ban đầu |
|----------------------------|---------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| | $\mu\text{g/g}$ | MU/g | $\mu\text{g/g}$ | MU/g | |
| Tháng 05/2016 | $7,59 \pm 0,20^a$ | $34,17 \pm 0,88^a$ | 0 | 0 | 100 |
| 2 tháng sau khi thí nghiệm | $3,00 \pm 1,05^b$ | $13,51 \pm 4,76^b$ | $0,45 \pm 0,26^a$ | $0,04 \pm 0,02^a$ | 39 |
| 3 tháng sau khi thí nghiệm | $1,87 \pm 0,53^{bc}$ | $8,43 \pm 2,37^{bc}$ | $1,92 \pm 0,55^b$ | $0,18 \pm 0,05^b$ | 25 |
| 4 tháng sau khi thí nghiệm | 0 | 0 | $3,58 \pm 1,44^c$ | $0,51 \pm 0,13^c$ | 0 |
| 5 tháng sau khi thí nghiệm | 0 | 0 | $3,44 \pm 0,45^{bc}$ | $0,32 \pm 0,04^{bc}$ | 0 |

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa của giá trị trung bình hàm lượng và độc tính của mỗi độc tố ($p < 0,05$).

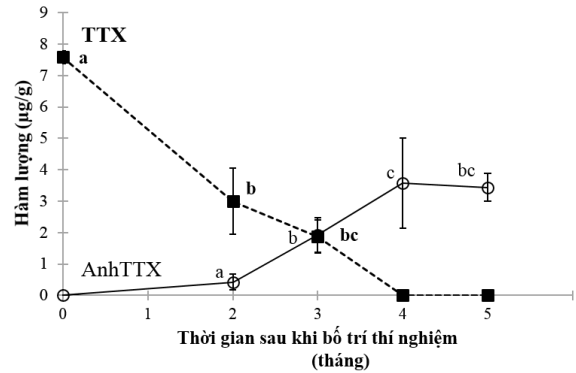
Theo bảng 3, từ hỗn hợp trứng muối có hàm lượng TTX ban đầu $7,59 \pm 0,20 \mu\text{g/g}$ mẫu tươi, sau 2 tháng thí nghiệm, hàm lượng TTX còn lại chiếm 39% so với ban đầu. Trong mẫu trứng muối sau 3 tháng lên men, hàm lượng TTX ở lô thí nghiệm đã suy giảm đến $1,87 \pm 0,53 \mu\text{g/g}$ (bảng 3) (chỉ còn 25% hàm lượng

TTX ban đầu, suy giảm 14% so với tháng thứ 2). Thêm vào đó, hàm lượng AnhTTX ở lô thí nghiệm trong thời điểm này tăng đến $1,92 \pm 0,55 \mu\text{g/g}$ (bảng 3).

Mặc dù không có sai khác về hàm lượng trung bình ở thời điểm 3 tháng sau khi thí nghiệm ở cả 2 lô đối chứng và thí nghiệm theo

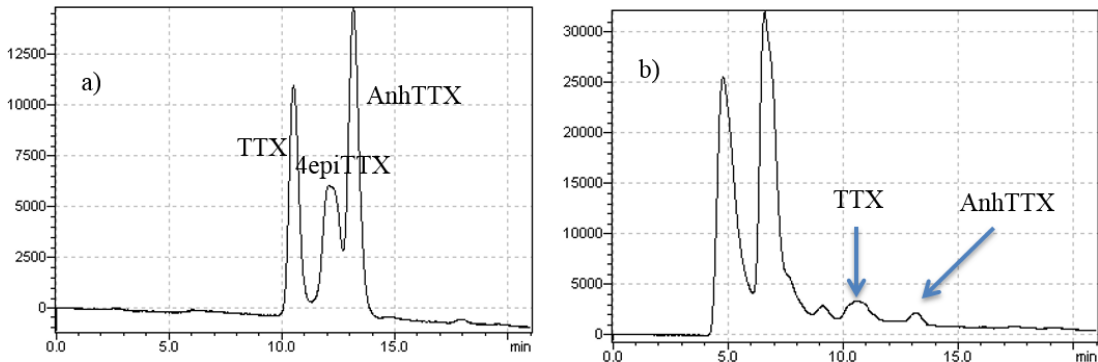
thông kê ($p = 0,42$ đối với hàm lượng TTX, $p = 0,07$ đối với hàm lượng AnhTTX), khi bổ sung thêm cám gạo, hàm lượng TTX có xu hướng suy giảm nhanh hơn cùng với xu hướng gia tăng nhanh hơn của AnhTTX. Nguyên nhân của cơ chế này chưa được hiểu rõ và sẽ được nghiên cứu sâu hơn trong thời gian tới. Sang tháng thứ tư, không phát hiện được TTX trong khi hàm lượng AnhTTX được ghi nhận với giá trị $5,58 \pm 1,44 \mu\text{g/g}$ trong các mẫu của lô thí nghiệm. Ở tháng thứ 5, hàm lượng AnhTTX suy giảm so với tháng thứ 4 ($3,44 \pm 0,45 \mu\text{g/g}$). Mặc khác, trong nghiên cứu này, phân tích hồi qui tuyến tính giữa hàm lượng TTX và AnhTTX ở cả 2 lô đối chứng và thí nghiệm cho thấy hàm lượng TTX và AnhTTX không có sự tương quan chặt chẽ ($R^2 = 0,4$ ở lô đối chứng (hình 6a) và $R^2 = 0,44$ ở lô thí nghiệm (hình 6b)). Điều này cho thấy tỉ lệ chuyển đổi từ TTX sang AnhTTX theo cơ chế hóa học có sự khác nhau theo thời gian. Hơn nữa, có thể một phần TTX

khác bị suy giảm liên quan gián tiếp đến vi sinh vật hoặc được chuyển sang các chất khác.



Hình 4. Hàm lượng TTX và AnhTTX ($\mu\text{g/g}$) theo thời gian của các mẫu trứng muối và cám gạo;

Các chữ cái a, b, c khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa của giá trị trung bình hàm lượng của mỗi độc tố ($p < 0,05$)



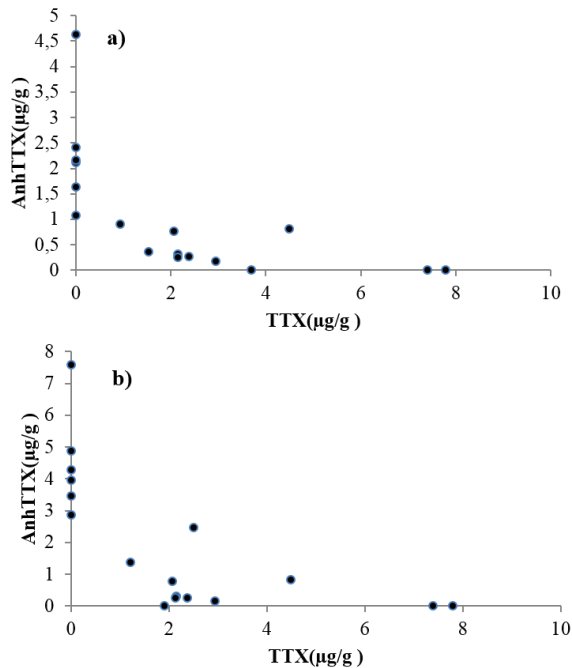
Hình 5. Sắc kí đồ HPLC của: a) TTXs chuẩn; b) Mẫu trứng muối bổ sung cám gạo sau 3 tháng

Trong nghiên cứu này, điều đặc biệt là không phát hiện thấy sự hiện diện của đồng phân 4-epiTTX trong tất cả các mẫu trứng. Theo sơ đồ chuyển hóa của Zhang et al., (2012) [11], TTX trong điều kiện nhất định bị đồng phân hóa thành 4-epiTTX , sau đó, đồng phân AnhTTX hình thành do sự mất đi 1 phân tử H_2O từ đồng phân 4-epiTTX . Như vậy, về lý thuyết phải có mặt của 4-epiTTX cùng với AnhTTX. Tuy nhiên, trong điều kiện thí nghiệm này, sau 2 tháng ủ muối, hỗn hợp trứng muối có thể đã tạo ra một môi trường khan nước, vì vậy 4-epiTTX được hình thành từ TTX trong các mẫu trứng đã chuyển đổi hoàn toàn thành AnhTTX do 4-epiTTX không bền

vững hóa học trong môi trường này. Đó có thể là lý do không thấy sự có mặt của 4-epiTTX trong toàn bộ mẫu trứng lên men.

Khi quan sát sắc kí đồ HPLC của trứng muối từ tháng thứ 2 và ở trứng ủ muối bổ sung cám gạo từ tháng thứ 3 trở đi, đều thấy có sự hình thành của các đỉnh ở khoảng phút thứ 5, trước TTX (hình 3, 5). Theo nghiên cứu của Osmino et al., (2002) [16], với cùng phương pháp phân tích độc tố, đỉnh này được xác định là acid tetrodonic (TDA) - một chất hoàn toàn không có độc tính [17]. Hơn nữa, Zhang et al., (2012) [11] cũng đã chứng minh cơ chế chuyển đổi của TTX sang đồng phân TDA. Từ những kết quả trên và dựa vào tỷ lệ suy giảm của hàm

lượng TTX và sự gia tăng hàm lượng AnhTTX của các mẫu trứng, TTX ban đầu trong các mẫu trứng có thể chỉ chuyển hóa một phần sang dạng AnhTTX, một phần TTX khác có thể chuyển đổi sang TDA. Tuy nhiên giả thiết này cần được kiểm chứng thêm bằng HPLC-MS, hoặc HPLC sử dụng chuẩn TDA.



Hình 6. a) Đồ thị biểu diễn tương quan giữa hàm lượng AnhTTX (µg/g) và hàm lượng TTX (µg/g) của các mẫu trứng của lô đối chứng; b) Đồ thị biểu diễn tương quan giữa hàm lượng AnhTTX (µg/g) và hàm lượng TTX (µg/g) của các mẫu trứng của lô thí nghiệm

KẾT LUẬN

Hàm lượng TTX ở trứng cá nóc ủ muối và lên men bổ sung cám gạo suy giảm theo thời gian và biến mất hoàn toàn sau 4 tháng thí nghiệm, đồng thời là sự gia tăng hàm lượng AnhTTX. Nghiên cứu bước đầu cho thấy quá trình chuyển đổi hóa học từ TTX trong quá trình lên men trứng cá sang đồng phân ít độc hơn là AnhTTX và có thể có sự biến đổi sang axit tetrodonic.

Lời cảm ơn: Bài báo này có kết quả từ đề tài cấp cơ sở 2016 do Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam tài

trợ kinh phí. Các tác giả xin cảm ơn ThS. Nguyễn Thu Thảo, Phòng Động vật có xương sống, Viện Hải dương học đã định danh loài cá *Lagocephalus inermis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Hữu Phụng, 1999. Danh mục các loài cá biển Việt Nam. Tập 5. *Nxb. Nông nghiệp*.
- [2] Noguch, T., and Arakawa, O., 2008. Tetrodotoxin–distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Marine drugs*, 6(2), 220–242.
- [3] Đào Việt Hà và Shigeru Sato, 2013. Độ tính tetrodotoxin trong sản phẩm nước mắm chế biến từ cá nóc độc Chấm Cam *Torquigener gloerfelti*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ biển* 13(3), 263–267.
- [4] Ozawa, C., 1983. Toxicity of puffer roe pickled in rice-bran. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 24(3), 258–262.
- [5] Ozawa, C., 1986. Sodium bicarbonate-accelerated detoxification of puffer [Takifugu porphyreus] ovaries during pickled product processing. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- [6] Kobayashi, T., Okuzumi, M., and Fujii, T., 1995. Microflora of fermented puffer fish ovaries in rice-bran “fugunoko nukazuke”. *Fisheries science*, 61(2), 291–295.
- [7] Kobayashi, T., Kimura, B., and Fujii, T., 2003. Possibility of toxin declination by microbiological metabolism during manufacture of puffer fish ovaries fermented with rice bran. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*, 69, 782–786.
- [8] Kobayashi, T., Nagashima, Y., Kimura, B., and Fujii, T., 2004. Mechanism of the decrease of tetrodotoxin activity in modified seawater medium. *Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 45(2), 76–80.
- [9] Anraku, K., Nonaka, K., Yamaga, T., Yamamoto, T., Shin, M. C., Wakita, M., Hamamoto, A., and Akaike, N., 2013. Removal of toxin (tetrodotoxin) from

- puffer ovary by traditional fermentation. *Toxins*, 5(1), 193–202.
- [10] Nakamura, M., and Yasumoto, T., 1985. Tetrodotoxin derivatives in puffer fish. *Toxicon*, 23(2), 271–276.
- [11] Zhang, X., Huang, X., and Lin, W., 2012. Stable pharmaceutical composition of freeze-dried tetrodotoxin powder. U.S. Patent No 8,124,608.
- [12] Hoàng Văn Tuấn, Phạm Hương Sơn, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Thị Lại, 2013. Nghiên cứu ảnh hưởng của dịch chiết cám gạo đến hoạt tính của vi khuẩn Probiotics. *Tạp chí Sinh học*, 35, 195–199.
- [13] Randall, J. M., Sayre, R. N., Schultz, W. G., Fong, R. Y., Mossman, A. P., Tribelhorn, R. E., and Saunders, R. M., 1985. Rice bran stabilization by extrusion cooking for extraction of edible oil. *Journal of Food Science*, 50(2), 361–364.
- [14] Yotsu, M., Endo, A., and Yasumoto, T., 1989. An improved tetrodotoxin analyzer. *Agricultural and biological chemistry*, 53(3), 893–895.
- [16] Pires Jr, O. R., Sebben, A., Schwartz, E. F., Largura, S. W., Bloch Jr, C., Morales, R. A., and Schwartz, C. A., 2002. Occurrence of tetrodotoxin and its analogues in the Brazilian frog *Brachycephalus ephippium* (Anura: Brachycephalidae). *Toxicon*, 40(6), 761–766.
- [17] Noguchi, T., Ali, A. E., Arakawa, O., Miyazawa, K., Kanoh, S., Shida, Y., Nishio, S., and Hashimoto, K., 1991. Tetrodonic acid-like substance; a possible precursor of tetrodotoxin. *Toxicon*, 29(7), 845–855.
- [18] Llewellyn, L. E., and Endean, R., 1989. Toxins extracted from Australian specimens of the crab, *Eriphia sebana* (Xanthidae). *Toxicon*, 27(5), 579–586.
- [19] Simpson, L. L. (Ed.), 2012. Neurotoxins: Their Pathophysiological Actions. *Springer Science & Business Media*. 347 p.