

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG HYALURONIC ACID TRONG MỘT SỐ PHÉP PHỤ LIỆU BA LOẠI CÁ VÀ NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG ENZYME ĐỂ TÁCH CHIẾT

Võ Hoài Bắc*, Trần Thị Hồng, Nguyễn Thị Mai Phương, Lê Văn Trường

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *vh_bac@yahoo.com

TÓM TẮT: Trong nghiên cứu này, hàm lượng hyaluronic acid (HA) từ sụn cá nhám (*Carcharhinus sorrah*), sụn cá đuối (*Dasyatis kuhlii*) và da cá ba sa (*Pangasius bocourti*) tươi được xác định tương ứng là 1,5 ($\pm 0,27$)%; 1,2 ($\pm 0,19$)%; 0,34 ($\pm 0,09$)%, hàm lượng HA từ sụn cá nhám, cá đuối và da cá ba sa khô được xác định tương ứng là 4,7 ($\pm 0,32$)%; 4,3 ($\pm 0,35$)% và 0,7 ($\pm 0,08$)%. Chúng tôi đã xác định được các điều kiện tối ưu cho hoạt động của enzyme ENV (Neutrased của hãng Novozyme, Đan Mạch, có hoạt tính ~ 1 IU/ml), thủy phân sụn và da cá để chiết rút HA: xương sụn cá nhám (nhiệt độ: 60°C; pH: 6; thời gian thủy phân: 18 giờ; tỷ lệ thủy phân: 1,25 IU ENV/30g sụn tươi). Xương sụn cá đuối (nhiệt độ: 65°C; pH: 6; thời gian thủy phân: 30 giờ; tỷ lệ thủy phân: 1,5 IU ENV/30g sụn tươi). Da cá ba sa: (nhiệt độ: 65°C; pH: 6; thời gian thủy phân: 30 giờ, tỷ lệ thủy phân: 1,5 IU ENV/15g da cá ba sa tươi).

Từ khóa: Da cá basa, hyaluronic acid, protease, sụn cá đuối, sụn cá nhám.

MỞ ĐẦU

Hiện nay, HA đã được sử dụng rộng rãi trong các loại chế phẩm bổ sung dinh dưỡng khác nhau và đang ngày càng được mở rộng ứng dụng trong hỗ trợ điều trị nhiều loại bệnh. Ở Việt Nam đã và đang nhập khẩu thuốc chứa thành phần HA để điều trị bệnh viêm khớp, chống lão hóa, xóa nếp nhăn làm đẹp da như (Duovital của CHLB Đức, Havital-HA drink của Thụy Sĩ với giá thành rất cao), nhưng chưa có đơn vị nào trong nước sản xuất được HA để phục vụ trong y dược.

Ngành chế biến thủy sản trong nước và trên thế giới hàng năm thải ra một lượng lớn các phụ phẩm cần được xử lý hoặc chế biến tiếp. Phụ phẩm thủy sản thường là nội tạng, đầu, xương, da... Để giải quyết một lượng lớn phụ phẩm như hiện nay, tại Việt Nam và trên thế giới đang có xu hướng tận thu phần phụ phẩm để chế biến thành các sản phẩm có giá trị gia tăng. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy các nguyên liệu từ sụn và da của động vật như: trong sụn lợn [11], sụn cá [5], da của lợn [12], da cá đuối *Raja radula* [3] đều có thành phần HA. Hàm lượng HA từ sụn và da không cao so với các nguồn nguyên liệu từ mào gà hay vi khuẩn, nhưng việc nghiên cứu tận thu HA từ phế thải da cá ba sa và sụn cá đuối, các nhám từ các nhà máy chế biến thủy sản của Việt Nam không những giải quyết vấn đề ô nhiễm môi

trường mà còn làm tăng giá trị của thủy sản và các nguồn nguyên liệu từ biển.

Mục đích của nghiên cứu này là điều tra khả năng thu nhận HA từ xương sụn cá đuối, cá nhám và da cá ba sa sống tại các vùng biển Việt Nam bằng công nghệ sinh học. Việc sử dụng enzyme thay thế các chất hóa học rất cần thiết vì giảm độ độc hại trong khi sản xuất cũng như tăng chất lượng của chế phẩm HA. Nghiên cứu chiết rút HA từ nguyên liệu thủy sản sẽ là bước khởi đầu tạo ra công nghệ sản xuất thực phẩm chức năng chứa HA tại Việt Nam để ứng dụng trong y dược.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Xương sụn cá đuối (*Dasyatis kuhlii*), cá nhám (*Carcharhinus sorrah*) được thu thập từ phế thải ở các nhà máy chế biến thủy sản Hải Phòng do Viện nghiên cứu Hải sản, Hải Phòng cung cấp. Da cá ba sa (*Pangasius bocourti*) được thu thập từ phế thải của các nhà máy chế biến thủy sản, vùng đồng bằng sông Cửu Long, do công ty Dược Hậu Giang cung cấp. Enzyme Neutrased của hãng Novozyme, Đan Mạch (ENV) (có hoạt tính ~ 1 IU/ml). Hyaluronic acid chuẩn (hãng Sigma) và hyaluronidase (có hoạt tính 400 unit/mg; hãng Sigma).

Chuẩn bị mẫu: mẫu sụn tươi và da cá được luộc sôi 15 phút, loại bỏ thịt bám dính, sau đó được xay nhỏ, trộn đều để mẫu là thể đồng nhất

để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo. Mẫu sụn khô được sấy khô ở 60°C từ mẫu sụn tươi sau khi đã được loại bỏ phần thịt cá.

Chiết xuất HA từ sụn và da cá bằng papain: HA được chiết xuất từ sụn theo Garnjanagoonchorn et al. (2007) [2]. 10 g xương sụn nghiền nhỏ được thêm vào 40 ml nước khử ion, 1 ml NaN_3 0,02%. Papain được bổ sung vào hỗn dịch theo tỉ lệ 4mg enzyme/g sụn và ủ ở nhiệt độ 65°C, pH=7, thời gian 48 giờ để sụn được thủy phân hoàn toàn. Dịch sau thủy phân được tủa ethanol 80% để thu HA.

Chiết xuất HA từ da cá được thực hiện theo phương pháp của Mansour et al. (2009) [3]. Lấy 10 g da cá nghiền nhỏ được thêm vào 500 ml đệm acetate 0,1M, pH=6, bổ sung 1020 mg papain và ủ ở nhiệt độ 60°C, thời gian 24 giờ để da cá được thủy phân hoàn toàn. Dịch sau thủy phân được tủa ethanol 80% để thu HA.

Chiết xuất HA từ sụn và da cá bằng ENV: 10 g xương sụn, da cá nghiền nhỏ, thêm vào 40 ml nước khử ion, 1 ml NaN_3 0,02%. Enzyme ENV được bổ sung vào hỗn dịch để thủy phân xương sụn cá đuối, cá nhám và da cá basa. Dịch sau thủy phân được tủa ethanol 80% để thu HA có trong mẫu.

Định tính các thành phần của HA

Định tính glucuronic acid: glucuronic acid là một trong 2 monomer cấu tạo nên HA. Xác định sự có mặt của glucuronic acid bằng phản ứng màu với carbazole (dung dịch chuyển từ không màu sang nâu đỏ) theo phương pháp của Bitter & Miur (1962) [1].

Định tính N-acetyl-D-glucosamine: N-acetyl-D-glucosamine là monomer thứ 2 của HA. Việc phát hiện sự hiện diện của gốc N-acetyl-D-glucosamine trong HA được thực hiện theo phương pháp của Reissig [8]. HA sau khi tách chiết từ các nguồn sụn được thủy phân bằng hyaluronidase (ở 37°C, pH= 5,35; 45 phút). Sản phẩm thủy phân được kiểm hóa trong môi trường borate pH 9,1; 100°C trong 15 phút. Ông chứa 0,25 ml HA sau thủy phân được cho thêm 0,05 ml K_3BO_3 0,2M đun sôi ở 100°C trong 3 phút, sau đó làm lạnh nhanh trong đá, cho tiếp 1,5 ml thuốc thử DMAB, trộn đều và để ở nhiệt độ 37°C trong 20 phút, tiếp theo ở nhiệt độ phòng sau 2 giờ. Sự thay đổi màu của

hỗn hợp trước phản ứng và sau phản ứng từ không màu sang hồng hay đỏ (tùy nồng độ) chứng tỏ sự hiện diện của N-acetyl-D-glucosamine.

Định lượng HA: HA được định lượng theo phương pháp của Reissig et al. (1955) [8]. HA tách chiết từ các nguồn khác nhau được thủy phân bằng hyaluronidase như mô tả trong phương pháp định tính N-acetyl-D-glucosamine. Dịch màu sau phản ứng được đánh giá trên máy quang phổ ở bước sóng 585 nm. Hàm lượng HA của các mẫu nghiên cứu được tính toán dựa trên đồ thị chuẩn của HA.

Xác định hoạt độ protease: Hoạt độ ENV được đánh giá theo phương pháp Anson cải tiến (Pietrowa et al, 1966) [7].

Xác định nhiệt độ thủy phân tối ưu của ENV với sụn và da cá: 10g sụn hoặc da cá nghiền nhỏ sau đó bổ sung 40ml nước khử ion, 0,3 IU enzyme ENV. Mẫu được ủ ở nhiệt độ từ 30-80°C trong 6 giờ, ½ mẫu sau thủy phân được tủa bằng TCA nồng độ cuối cùng là 5%, ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 20 phút, thu dịch trên và xác định hàm lượng tyrosine bằng phương pháp Anson cải tiến (Pietrowa et al, 1966). ½ mẫu sau thủy phân còn lại được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 20 phút để thu dịch. Dịch sau ly tâm được tủa bằng ethanol tỉ lệ (dịch/ethanol=1/4) và để qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau đó ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 20 phút để thu tủa. Hàm lượng HA trong tủa được xác định bằng phương pháp Reissig et al. (1955) [8]. Mẫu đối chứng được làm như mẫu thí nghiệm nhưng bất hoạt enzyme bằng đun sôi ở 100°C trong 3 phút.

Xác định pH tối ưu: Với cùng một điều kiện thủy phân giống nhau, nhiệt độ đã được tối ưu ở trên, chỉ thay đổi pH của đệm (pH từ 4-8). Mẫu đối chứng làm như mẫu thí nghiệm nhưng bất hoạt enzyme bằng đun sôi ở 100°C trong 3 phút. Xác định khả năng thủy phân protein trong sụn, da và hàm lượng HA trong các mẫu sau thủy phân tương tự như đã mô tả ở trên.

Xác định thời gian thủy phân tối ưu: Với các điều kiện thủy phân tối ưu đã được xác định ở trên (nhiệt độ, pH) và cùng 1 nồng độ enzyme, tiến hành thủy phân ở các thời gian khác nhau (6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 và 48 giờ).

Xác định khả năng thủy phân protein trong sụn, da và hàm lượng HA trong các mẫu sau thủy phân tương tự như đã mô tả ở trên.

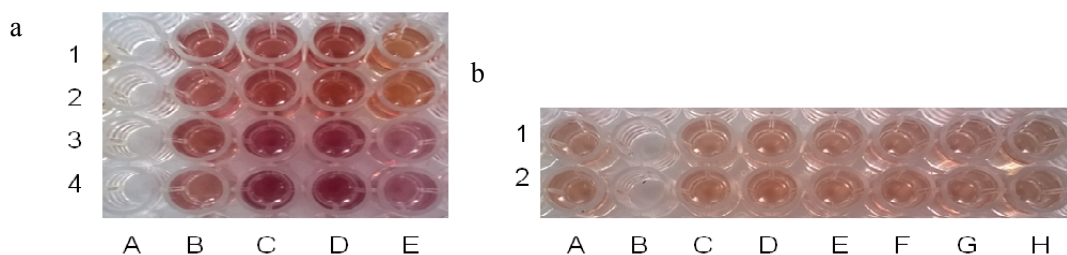
Xác định nồng độ enzyme thủy phân tối ưu: Với các điều kiện thủy phân tối ưu (nhiệt độ, pH, thời gian) đã được xác định, tiến hành phản ứng ở các nồng độ enzyme khác nhau. (0,5 IU; 0,75 IU; 1,0 IU; 1,25 IU; 1,5 IU; 1,75 IU; 2 IU) enzyme ENV thủy phân 30g xương sụn cá hoặc 15g da cá ba sa, bổ sung 120ml dung dịch đệm thích hợp). Xác định khả năng thủy phân protein trong sụn, da và hàm lượng HA trong các mẫu sau thủy phân tương tự như đã mô tả ở trên.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Định tính HA trong các mẫu sụn cá đuối (*Dasyatis kuhlii*), cá nhám (*Carcharhinus sorrah*) và da cá ba sa (*Pangasius bocourti*) ở Việt Nam

HA được cấu tạo bởi hai loại đường

D-glucuronic acid và N-acetyl-D-glucosamine liên kết xen kẽ nhau, do đó để xác định sự có mặt của HA trong các mô động vật ta có thể định tính hai gốc đường này. Với mục đích định tính HA trong các mẫu sụn và da cá, HA được chiết xuất theo như mô tả trong phần phương pháp, papain của hãng Sigma được sử dụng để thủy phân các mẫu trong thí nghiệm này. Dịch chiết xuất HA thu được được xử lý với hyaluronidase để giải phóng D-glucuronic acid và N-acetyl-D-glucosamine. Kết quả định tính cho thấy, màu của mẫu HA chuẩn và các mẫu sụn và da cá chuyển từ không màu sang đỏ nâu (đối với phản ứng định tính glucuronic acid) và từ không màu sang màu hồng (đối với phản ứng định tính N-acetyl-D-glucosamine) trong khi mẫu đối chứng âm không đổi màu (hình 1). Kết quả này cho thấy các mẫu sụn và da cá nghiên cứu đều có gốc glucuronic acid và N-acetyl-D-glucosamine. Điều này chứng tỏ các mẫu sụn cá đuối, cá nhám và da cá ba sa tươi và sấy khô đều có mặt HA.



Hình 1. Định tính HA bằng phản ứng màu. Định tính gốc glucuronic acid (a) và gốc N-acetyl-D-glucosamine (b)

Hình 1a: A(1-4): Đối chứng âm; B(1-4): HA chuẩn; C(1-2): Sụn cá nhám tươi; C(3-4): Sụn cá nhám khô; D(1-2): Sụn cá đuối tươi; D(3-4): Sụn cá đuối khô; E(1-2): Da cá ba sa tươi; E(3-4): Da cá ba sa khô. Hình 1b: A(1-2): HA chuẩn; B(1-2): đối chứng âm; C(1-2): Sụn cá nhám tươi; D(1-2): Sụn cá nhám khô; E(1-2): Sụn cá đuối tươi; F(1-2): Sụn cá đuối khô; G(1-2): da cá ba sa tươi; H(1-2): da cá ba sa khô.

Xác định hàm lượng HA trong các mẫu sụn và da cá

Tương tự như phần định tính HA, các mẫu HA được chiết xuất từ sụn và da cá bằng papain như mô tả trong phần phương pháp được thủy phân hoàn toàn bằng hyaluronidase để giải phóng D-glucuronic acid và N-acetyl-D-glucosamine. Kết quả cho thấy hàm lượng HA từ sụn cá nhám *C. sorrah*, sụn cá đuối *D. kuhlii* và da cá ba sa *P. bocourti* tươi được xác định tương ứng là 1,5

(±0,27)%; 1,2 (±0,19)%; 0,34 (±0,09)%, hàm lượng HA từ sụn cá nhám, cá đuối và da cá ba sa khô được xác định tương ứng là 4,7 (±0,32)%; 4,3 (±0,35)% và 0,7(±0,08)% (bảng 1).

Hàm lượng HA trên sụn cá nhám và cá đuối tươi cao hơn hàm lượng HA ở sụn lợn (0,35-0,6%) [11], hàm lượng HA trên da cá ba sa tươi cũng gần bằng hàm lượng HA trên nhuyển thể hai mảnh vỏ *A. plueronectus* (0,42%) [10] và thấp hơn một ít so với hàm lượng HA từ da lợn

(0,843%) [12]. Mặc dù hàm lượng HA từ sụn cá nhám, cá đuối và da cá ba sa không cao so với thu nhận HA từ mào gà (4,5%) [6] hay vi khuẩn nhưng việc nghiên cứu tận thu HA từ phế thải thủy sản không những giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường mà còn có ý nghĩa kinh tế và xã hội, làm tăng giá trị của nguyên liệu cá nhám, cá đuối và da cá ba sa.

Bảng 1. Hàm lượng HA trong các mẫu xương sụn cá đuối, cá nhám và da cá ba sa

Mẫu	Hàm lượng HA trong mẫu (%)
Sụn cá nhám khô	4,7 ± 0,32
Sụn cá nhám tươi	1,5 ± 0,27
Sụn cá đuối khô	4,3 ± 0,35
Sụn cá đuối tươi	1,2 ± 0,19
Da cá ba sa khô	0,7 ± 0,08
Da cá ba sa tươi	0,34 ± 0,09

Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm protease thương mại ENV để thủy phân sụn, da cá và chiết rút HA

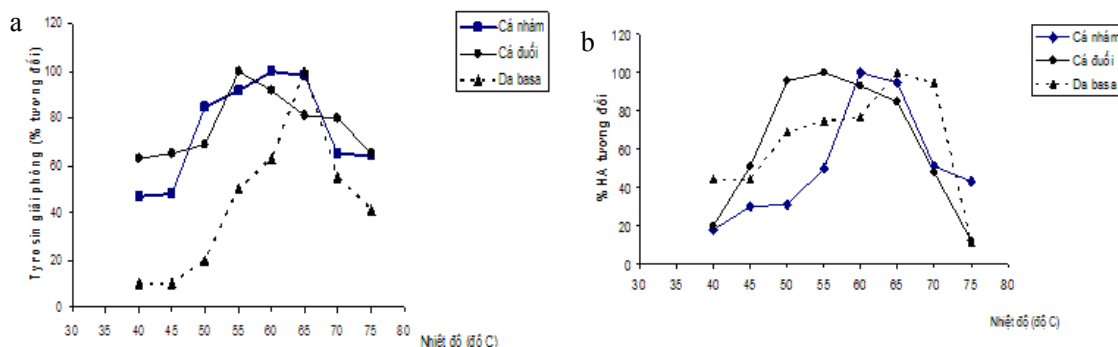
Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã sử dụng

các protease (papain, actinase, pronase, trypsin...) để thủy phân protein trong sụn giải phóng glycosaminoglycan. Phương pháp sử dụng protease đã được dùng để thu nhận glycosaminoglycan từ da cá *Labeo rohita* [9], thu nhận HA từ da của lợn [12] và HA từ nhuyễn thể hai mảnh vỏ *A. plueronectus* [10].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát khả năng thủy phân xương sụn cá nhám, cá đuối và da cá ba sa từ chế phẩm Neutrase của Đan Mạch. Chế phẩm ENV là một chế phẩm enzyme ngoại bào từ vi sinh vật có hoạt tính mạnh và ổn định. Một số nghiên cứu cũng cho thấy việc sử dụng ENV thủy phân da lợn chiết rút HA là tốt hơn so với các chế phẩm protease khác [12]. Vì vậy, chúng tôi tiến hành xác định các điều kiện thủy phân tối ưu của ENV để đạt hiệu quả cao chiết rút HA.

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả cho thấy nhiệt độ thích hợp cho việc thủy phân sụn cá nhám và giải phóng HA là 60°C, nhiệt độ 65°C là nhiệt độ thích hợp cho việc thủy phân sụn cá đuối và da cá ba sa (hình 2a, b).



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt độ thủy phân của ENV (a) và hàm lượng HA giải phóng (b) từ các mẫu sụn cá nhám, sụn cá đuối và da cá ba sa

Ảnh hưởng của pH

Phản ứng thủy phân của enzyme được thực hiện ở nhiệt độ 60°C cho thủy phân sụn cá nhám và 65°C cho thủy phân sụn cá đuối và da cá ba sa trong khoảng thời gian 6 giờ trong đệm có pH khác nhau. Kết quả ở hình 3a cho thấy, hoạt tính thủy phân xương sụn cá nhám, cá đuối của ENV cao nhất tại pH 6. Hàm lượng HA giải phóng sau khi thủy phân sụn cũng đạt cao nhất

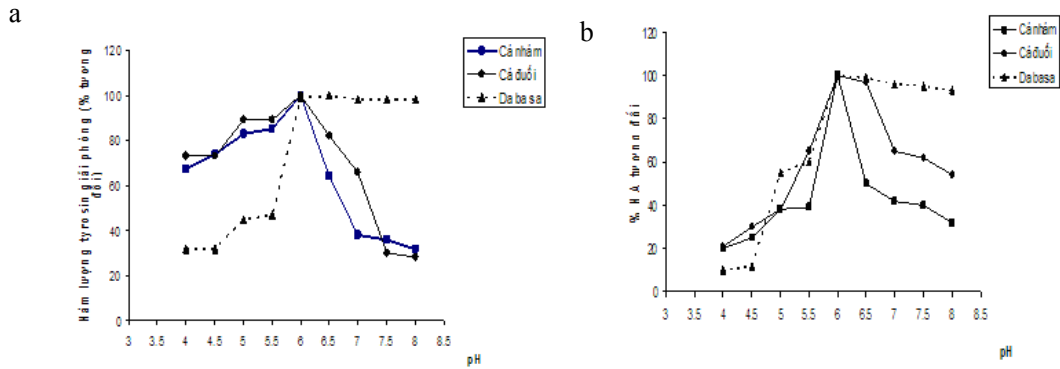
tại pH 6 (hình 3b). ENV có khả năng thủy phân da cá ba sa trong vùng pH rộng (từ pH 6 đến pH 8), hàm lượng HA giải phóng cao nhất từ da cá ba sa khi ENV hoạt động tại pH 6.

Thời gian chế phẩm ENV thủy phân tối ưu xương sụn và da cá

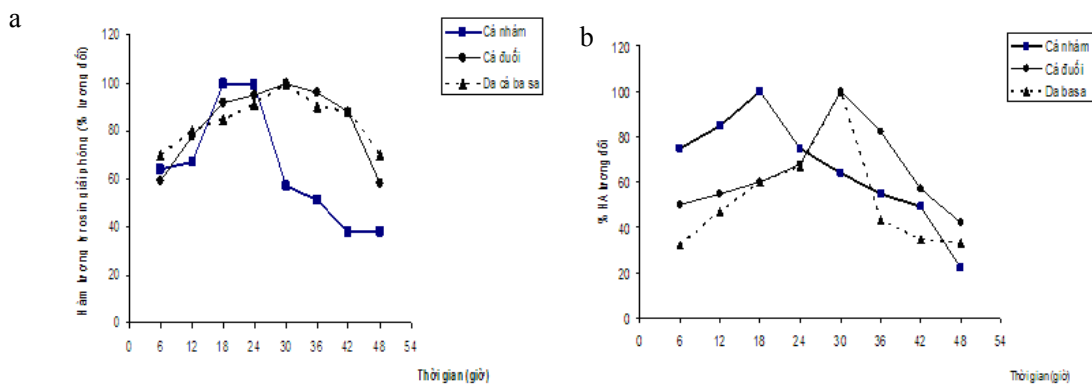
Với các điều kiện thủy phân tối ưu đã được xác định ở trên, cùng 1 nồng độ enzyme và tiến hành thủy phân xương sụn cá ở các thời gian

khác nhau. Kết quả trên hình 4a cho thấy, hàm lượng tyrosine giải phóng tăng dần theo thời gian và đạt cao nhất sau 18 giờ thủy phân sụn cá nhám và sau 30 giờ thủy phân sụn cá đuối và da cá ba sa

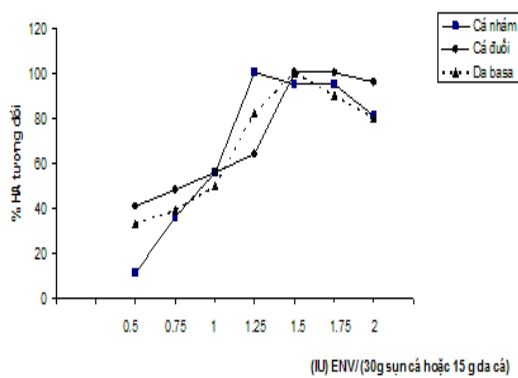
cá ba sa, đồng thời hàm lượng HA cũng đã được giải phóng ra cao nhất tại các thời điểm trên (hình 4b).



Hình 3. Ảnh hưởng của pH lên hoạt độ thủy phân của ENV (a) và hàm lượng HA giải phóng (b) từ các mẫu sụn cá nhám, sụn cá đuối và da cá ba sa



Hình 4. Hiệu quả thủy phân sụn, da cá của ENV theo thời gian (a) và hàm lượng HA giải phóng (b) từ các mẫu sụn cá nhám, sụn cá đuối và da cá ba sa



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme ENV đến hiệu quả thu nhận HA

Tỷ lệ chế phẩm ENV thủy phân tối ưu xương sụn và da cá

Để xác định tỷ lệ enzyme ENV thủy phân xương sụn và da cá tối ưu, chúng tôi sử dụng các điều kiện tối ưu của từng loại mẫu (sụn cá nhám: 18 giờ; pH 6,0; 60°C); (sụn cá đuối: 30 giờ; pH 6,0; 65°C) và (da cá ba sa: 30 giờ; pH 6,0; 65°C) sau đó chiết xuất HA để đánh giá lượng HA thu được. Tỷ lệ enzyme thích hợp được đánh giá dựa vào kết quả thu nhận HA sau chiết xuất. Kết quả hình 5 cho thấy, hàm lượng HA giải phóng cao nhất khi thủy phân với tỷ lệ (1,25 IU của ENV/30 g sụn tươi cá nhám); 1,5 IU của ENV/30 g sụn tươi cá đuối) và 1,5 IU của

ENV/15g da cá ba sa tươi).

Chế phẩm ENV cho hiệu quả thủy phân tốt xương sụn cá nhám, cá đuối và da cá basa. Các mẫu xương sụn và da cá đã bị thủy phân rơi ra

khi bổ sung enzyme ENV (kết quả không trình bày).

So sánh khả năng thủy phân sụn và da cá của chế phẩm ENV và papain

Bảng 2. So sánh hàm lượng HA chiết rút khi sử dụng các protease khác nhau

Loại protease sử dụng	Hàm lượng HA trong mẫu (%)		
	Sụn cá nhám tươi	Sụn cá đuối tươi	Da cá ba sa tươi
Papain	1,5±0,27	1,2±0,19	0,34 ±0,09
ENV	1,6±0,25	1,1±0,23	0,35 ±0,12

Chúng tôi đã so sánh khả năng thủy phân sụn và da cá của chế phẩm ENV và papain đã được nghiên cứu trước đây [2, 3]. Kết quả cho thấy, khi sử dụng papain chiết rút HA từ sụn cá nhám, cá đuối và da cá ba sa có hàm lượng tương tự như khi sử dụng enzyme ENV (bảng 2).

Papain là một protease mạnh, thủy phân protein trong sụn, da hiệu quả, tuy nhiên chúng lại có giá thành rất cao, do đó không phù hợp cho việc sử dụng để tách chiết HA quy mô lớn. Enzyme ENV là nguồn enzyme an toàn đã được sử dụng trong chế biến thực phẩm, hoạt tính thủy phân cao, ổn định, giá rẻ cho nên phù hợp cho việc sử dụng để sản xuất HA với quy mô lớn.

KẾT LUẬN

Lần đầu tiên tại Việt Nam, hàm lượng HA trong xương sụn cá nhám, *Carcharhinus sorrah*; cá đuối, *Dasyatis kuhlii* và da cá ba sa, *Pangasius bocourti*, được khảo sát. Hàm lượng HA từ sụn cá nhám, cá đuối và da cá ba sa tươi được xác định tương ứng là 1,5 (±0,27)%; 1,2 (±0,19)%; 0,34 (±0,09)%, hàm lượng HA từ sụn cá nhám, cá đuối và da cá ba sa khô được xác định tương ứng là 4,7 (±0,32)%; 4,3 (±0,35)% và 0,7 (±0,08)%.

Xác định được các điều kiện tối ưu cho hoạt động của enzyme ENV thủy phân sụn và da cá để chiết rút HA: xương sụn cá nhám (nhiệt độ: 60°C; pH: 6; thời gian thủy phân: 18 giờ; tỷ lệ thủy phân: 1,25 IU của ENV/30 g sụn tươi). Xương sụn cá đuối (nhiệt độ: 65°C; pH: 6; thời gian thủy phân: 30 giờ; tỷ lệ thủy phân: 1,5 IU của ENV/30 g sụn tươi). Da cá ba sa: (nhiệt độ: 65°C; pH: 6; thời gian thủy phân: 30 giờ, tỷ lệ

thủy phân: 1,5 IU của ENV/15g da cá ba sa tươi).

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí cho các nhiệm vụ nghiên cứu khoa học cấp Viện Công nghệ Sinh học năm 2014-2015.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bitter T., Muir H. M., 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, 4: 330-334.
2. Garnjanagoonchorn W., Wongekalak L., Engkagul A., 2007. Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage. *Chemical Engineering and Processing*, 46: 465-471.
3. Mansour M. B., Majdoub H., Bataille I, Roudesli M. S., Hassine M., Aizenberg N., Chaubet F and Maaroufi R. M., 2009. Polysaccharides from the skin of the ray *Raja radula*. Partial characterization and anticoagulant activity. *Thrombosis Research*, 123: 671-678.
4. Munakata H., Yosizawa Z., 1980. Extraction of Hyaluronic Acid from Rabbit Skin with Lanthanum Chloride. *The Tohoku Journal of experimental medicine*, 132(3): 337-340.
5. Murado M. A., Montemayor M. I., Cabo M. L., Vázquez J. A., González M. P., 2012. Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. *Food Bioprod. Proc.*, 90: 491-498.
6. Nakano T., Nakano K., Sim J. S., 1994. A simple rapid method to estimate hyaluronic

- acid concentrations in rooster comb and wattle using cellulose acetate electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 2766-2768.
7. Pietrowa J. S., Wincjunajte M. M., 1966. Opredelenie proteoliticheskoi aktivnosti fermentnykh preparatov mikrobiologicheskovo proiskhozhdenia, *Priklad. Biochem. Mikro-bio*, 2: 232.
8. Reissig J. L., Strominger J. L and Leloir L. F., 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.*, 217: 959-966.
9. Santosh K. S., Amalendu D., 1979. Isolation and characterization of glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) from the skin of the fish *Labeo rohita*. *Carbohydrate Research.*, 71(1): 273-285.
10. Shankar K., Muthuvel A., Sadhasivam G., Thangavel B., 2013. Isolation, characterization and antioxidant activity of hyaluronic acid from marine bivalve mollusc *Amussium pleuronectus*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre.*, 2(1): 1-7.
11. Timothy E. H; Helen M., 1974. Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. *Biochem J.*, 139(3): 565-581.
12. Zhao Y; Linlin H., 2008. Preparation and identification of Hyaluronic Acid From Fresh Pigskin. *Journal of Northeast Agricultural University.*, 15(3): 44-49.

DETECTION OF HYALURONIC ACID IN THE AQUATIC WASTE AND EXTRACTION BY ENZYME TECHNOLOGY

Vo Hoai Bac, Tran Thi Hong, Nguyen Thi Mai Phuong, Le Van Truong

Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Hyaluronic acid (HA) is a linear polysaccharide composed of a repeating disaccharide unit of $\beta(1-4)$ glucuronic acid and $\beta(1-3)$ N-acetylglucosamine. HA is present in tissues as cartilage, skin, rooster combs, umbilical cord, vitreous humour and sinovial fluid. In recent years, an increasing interest has been reported due to its numerous applications as cosmetic and pharmaceutical compound. HA levels from *Carcharhinus sorrah*, *Dasyatis kuhlii* and *Pangasius bocourti* lived in the sea area of Vietnam were the first time investigated. The extract of hyaluronic acid was dialyzed and digested with ENV enzyme. The optimal conditions of ENV protease for hydrolyzing cartilage and skin were determined as follows *Carcharhinus sorrah*: 1.25 IU enzyme/30gram of cartilage, 18 h, pH 6,0 at 60°C; *Dasyatis kuhlii*: 1.50 IU enzyme/30gram of cartilage, 30 h, pH 6,0 at 65°C and *Pangasius bocourti*: 1.50 IU enzyme /15 gram of skin, 30 h, pH 6,0 at 65°C.

Keywords: *Carcharhinus sorrah*, *Dasyatis kuhlii*, *Pangasius bocourti*, cartilage, skin, hyaluronic acid, protease.

Ngày nhận bài: 23-9-2015