

XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG 17 AMINO ACID TỪ CUA LỘT *Scylla* sp.

Nguyễn Thị Phương Lan^{1,2}, Đỗ Thị Thanh Trung³, Văn Thư Vũ³, Lê Tất Thành^{1,3,✉}

¹Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Cục An toàn thực phẩm, Bộ Y tế

³Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: thanh.biotech@gmail.com

Ngày nhận bài: 11.10.2019

Ngày nhận đăng: 24.12.2019

TÓM TẮT

Cua bùn *Scylla* sp. là loài cua biển phổ biến ở Việt Nam cũng như ở Châu Á Thái Bình Dương. Ngày nay, cua bùn được nuôi với quy mô lớn và thu hoạch ở giai đoạn lột xác vỏ mềm có giá trị kinh tế cao hơn cua mai cứng. Hiện nay, việc chế biến cua lột chỉ dừng lại ở việc đóng gói và xuất khẩu nguyên con. Tuy nhiên, 30% cua lột trong chế biến thường bị rụng chân và cang, làm giảm giá thành sản phẩm. Vì vậy, nghiên cứu công nghệ chế biến cua lột để nâng cao giá trị sản phẩm cua lột là rất cần thiết. Gần đây, việc ứng dụng enzyme trong chế biến mang lại nhiều lợi ích như thân thiện với môi trường và tạo ra nhiều hoạt chất có hoạt tính sinh học. Trong bài báo này, chúng tôi xây dựng quy trình xác định hàm lượng 17/20 amino acid trong quá trình chế biến cua lột *Scylla* sp. nhằm đảm bảo chất lượng sản phẩm thu được sau khi chế biến. Quy trình này dựa trên phương pháp HPLC sử dụng detector huỳnh quang. Kết quả cho thấy, hàm lượng 17 amino acid ở cua lột nguyên liệu là 4,53% và sau khi chế biến qua giai đoạn thủy phân bằng công nghệ enzyme đạt 65,58% khối lượng khô và có chứa hàm lượng cao các amino acid có giá trị như lysine, leucine, valine, methionine, histidine.

Từ khóa: Công nghệ enzyme, cua bùn, cua lột, HPLC, thủy phân

GIỚI THIỆU

Amino acid là một thành phần quan trọng của cơ thể, là đơn vị cấu thành nên các loại protein tham gia vào cấu trúc và đảm bảo tất cả mọi hoạt động sống trong cơ thể được diễn ra một cách hoàn chỉnh. Nhìn chung, protein đều được cấu tạo chủ yếu bởi 20 loại amino acid, trong đó có 8 amino acid thiết yếu mà cơ thể không thể tự tạo ra được gồm isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan và valine. Sự thiếu hụt amino acid dẫn đến cơ thể mệt mỏi, hạ đường huyết, dị ứng. Giá trị của một loại thức ăn không những phụ thuộc vào số lượng chất đạm có trong thức ăn, mà còn phụ thuộc vào số

lượng và tỷ lệ cân đối các amino acid, nghĩa là chất lượng của protein thức ăn (Mullally *et al.*, 1994).

Ở Việt Nam, nguồn thực phẩm biển ngày càng được lựa chọn vì hàm lượng dinh dưỡng cao, hơn nữa thực phẩm biển ít bị ô nhiễm, được nuôi trồng tự nhiên, hương vị đậm đà. Trong đó, cua biển là thực phẩm được ưa chuộng với nhiều chứng minh về hàm lượng khoáng vi lượng và protein tốt cho sức khỏe (Nguyễn Thị Phương Lan, 2017). Đặc biệt, ngày nay, cua biển trong thời kỳ lột xác, mai mềm, cua lột ngày càng được tiêu thụ nhiều vì có hàm lượng dinh dưỡng cao hơn cua mai cứng, chế biến dễ dàng hơn rất nhiều (Sarower *et al.*,

2013; Vilasoa-Martinez *et al.*, 2007). Tuy nhiên, để nâng cao giá trị kinh tế của cua lột, ngoài các món ăn ra, cua lột xác cũng cần được chế biến thành nhiều sản phẩm khác để tăng sự lựa chọn cho người tiêu dùng. Với sự phát triển của khoa học và tri thức, nhu cầu kiểm soát chất lượng các sản phẩm ngày càng được nâng cao, do vậy đối với loại sản phẩm từ động vật, việc kiểm soát hàm lượng amino acid trong quá trình chế biến nhằm đảm bảo chất lượng của sản phẩm là vô cùng quan trọng.

Theo nhiều nghiên cứu trước đây, để xác định hàm lượng amino acid trong thực phẩm, một số phương pháp thường được sử dụng như sắc ký giấy, sắc ký lỏng, sắc ký khí, sắc ký lỏng hiệu năng cao (Ma *et al.*, 2015). Trong đề tài này, chúng tôi xây dựng quy trình áp dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với điều kiện kỹ thuật tại viện nghiên cứu nhằm xác định hàm lượng amino acid trong quá trình chế biến cua lột bằng kỹ thuật enzyme. Mục tiêu cụ thể là tìm các điều kiện tối ưu của phương pháp HPLC để phân tích amino acid trong cua bùn *Scylla sp.* và sản phẩm từ quá trình chế biến cua lột.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Cua lột (*Scylla*) được nuôi lượng lớn tại Nha Trang và thu hoạch trong giai đoạn lột xác, rồi cấp đông bảo quản ở -20°C để thực hiện nghiên cứu. Protease có hoạt tính 2,4 AU-A/g từ Novozyme (Denmark) hoạt động ở điều kiện tối ưu pH 7-9, nhiệt độ 30-65°C. Hỗn hợp 17 amino acid chuẩn của hãng Sigma (Mỹ) cùng các dung môi, hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích HPLC.

Thủy phân cua lột bằng công nghệ enzyme

Nguyên liệu cua lột được nghiền nhỏ, sau đó được bổ sung enzyme protease 1% ở nhiệt độ 45°C rồi tiến hành thủy phân trong 12h. Sau quá trình thủy phân, dịch thủy phân được thu lại bằng ly tâm loại bỏ cặn, và sấy khô loại nước để thu được bột cua thủy phân, sau đó phân tích các chỉ số cần thiết.

Thủy phân protein thành amino acid bằng acid HCl 6M

Phương pháp thủy phân bằng acid hydrochloric có chứa một lượng phenol là kỹ thuật thông dụng nhất để thủy phân mẫu thử protein/peptid trước khi tiến hành phân tích amino acid. Thêm phenol vào môi trường thủy phân để ngăn ngừa hiện tượng halogen hóa tyrosin.

Dung dịch thủy phân: Hydrochloric acid 6M chứa từ 0,1% đến 1% phenol.

Thủy phân pha lỏng: Cho mẫu thử protein (BSA hoặc cua lột) vào ống thủy phân theo tỷ lệ cứ 1 g mẫu thử thêm 75 ml dung dịch thủy phân và tỷ lệ 1 g BSA thêm 1,2 ml dung dịch thủy phân. Dùng khí argon thổi vào bình nhằm tạo ra môi trường khí trơ trong bình, sau đó đậy kín bình bằng nút nhám. Mẫu được thủy phân ở 110°C trong 24 giờ và trong chân không hoặc khí trơ để tránh oxy hóa amino acid. Thời gian thủy phân được thử nghiệm từ 12 giờ đến 30 giờ.

Hệ thống sắc ký lỏng

Phân tích amino acid được tiến hành trên máy Agilent 1200 HPLC với bơm kép G1311A và detector huỳnh quang G1315B FLD, buồng chạy 10-mm. Cột ZORBAX Eclipse-AAA 4,6 x 150 mm (5 µm) để đo với độ nhạy vừa phải, độ phân giải cao tại áp suất thấp. Hỗn hợp để phân tích sắc ký bao gồm 17 amino acid từ hỗn hợp amino acid chuẩn 250 pmol/µL standard mix (PN: 5061-3331) và citrulline và 6 amino acid bổ sung, được hòa trộn tại nồng độ khoảng 250 pmol/µl. Đường chuẩn amino acid được xây dựng bằng cách sử dụng 5 nồng độ amino acid khác nhau từ 10, 25, 100, 250, 1000 pmol/µl.

Tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử OPA

Khi có mặt một hợp chất thiol (có thể dùng 2-mercaptoethanol hoặc 3-mercaptopropionic acid), thuốc thử orthophthalaldehyde (OPA) sẽ tác dụng với các amin bậc nhất để cho một hợp chất isoindol phát huỳnh quang mạnh. Bản thân thuốc thử OPA không phát huỳnh quang, nên không gây trở ngại. Mặt khác, vì OPA dễ tan và ổn định trong nước đồng thời cho phản ứng

nhanh nên có thể tạo dẫn chất và phân tích mẫu thử một cách tự động, dùng thiết bị tự nạp mẫu thử để trộn lẫn mẫu thử với thuốc thử.

Vì dẫn chất OPA-amino acid không bền vững nên sau khi tạo dẫn chất trước cột, phải tiến hành phân tích ngay trên sắc ký lỏng cao áp pha đảo và phát hiện kết quả bằng detector huỳnh quang ở bước sóng kích thích 348 nm và bước sóng phát quang 450 nm.

Tạo dẫn chất trước cột với thuốc thử FMOC-Cl

Thuốc thử 9-fluorenylmethyl clorofomat (FMOC-Cl) tác dụng với amino acid bậc nhất và amino acid bậc hai để tạo thành các dẫn chất FMOC-amino acid phát huỳnh quang mạnh. Phản ứng xảy ra nhẹ nhàng trong môi trường nước, trong 30 giây. Các dẫn chất được tạo thành đều bền vững, chỉ riêng dẫn chất của histidine là có dấu hiệu bị phân hủy. Mặc dù bản thân thuốc thử và các sản phẩm phụ của phản ứng đều phát huỳnh quang nhưng có thể loại chúng mà không làm mất mát các dẫn chất FMOC-amino acid.

Sau khi tạo dẫn chất trước cột, tiến hành tách các FMOC-amino acid bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo. Kết quả được phát hiện bằng detector huỳnh quang ở bước sóng kích thích 260 nm và bước sóng phát quang 313 nm. Có

thể phân tích được 20 dẫn chất amino acid trong vòng 20 phút. Giới hạn phát hiện vào cỡ femtomol. Đa số các amino acid có khoảng tuyến tính từ 0,1 - 50 micromol.

Khảo sát các điều kiện phân tích

Để lựa chọn các điều kiện phân tích hàm lượng 17 acid amin cơ bản, chúng tôi thay đổi lần lượt từng điều kiện gồm thiết bị dò (detector) và tỷ lệ dung môi pha động, và giữ nguyên thành phần tạo dẫn xuất amino acid và cột phân tích pha đảo ZORBAX Eclipse AAA (4,6 x 150 mm, 5 μ m).

KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

Khảo sát các điều kiện phân tích

Khảo sát thiết bị dò (Detector) DAD

Detector DAD được sử dụng để phân tích hàm lượng amino acid ở các bước sóng 338 nm và 262 nm. Dung môi pha đảo được sử dụng gồm: Dung môi A là Na_2HPO_4 10 mM và Dung môi B là methanol:acetinitrile: H_2O (45:45:10). Điều kiện phân tích khi được thể hiện trong bảng 1.

Kết quả đã định tính và định lượng được đủ 17 amino acid trong hỗn hợp amino acid chuẩn. Tuy nhiên, các đỉnh chưa tách nhau rõ rệt, vẫn còn bị dính chân (Hình 1).

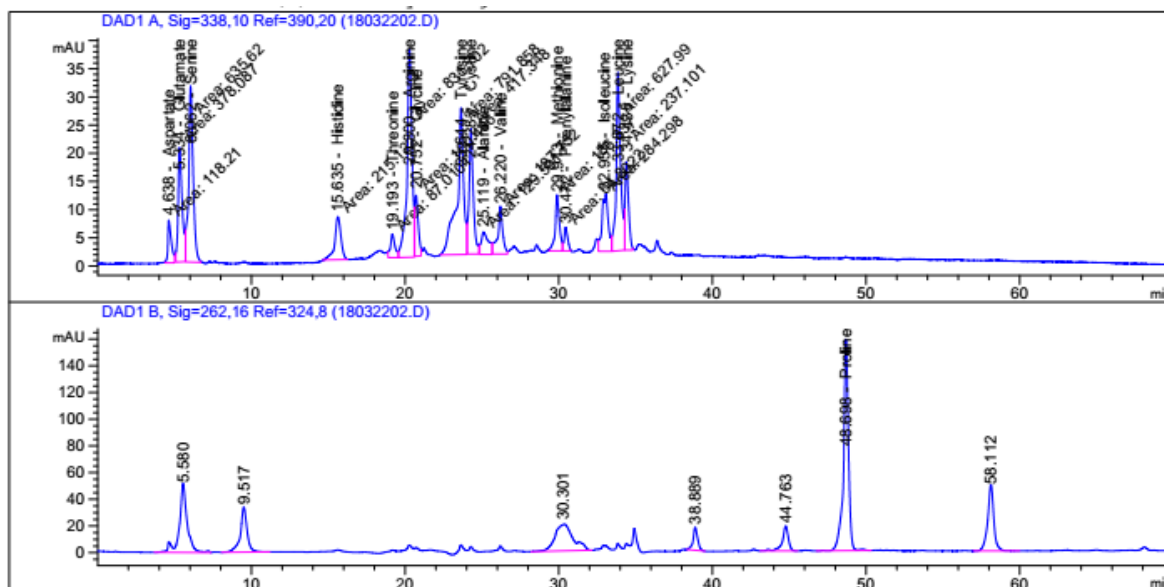
Bảng 1. Điều kiện phân tích bằng HPLC detector DAD.

Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (ml/phút)	Dung môi A (%)	Dung môi B (%)
0	0,5	100	0
30	0,5	50	50
60	0,5	0	100
65	0,5	0	100
75	0,5	100	0
100	Stop time	100	0

Khảo sát thiết bị dò Detector huỳnh quang (FLD)

Detector huỳnh quang được sử dụng để phân tích hàm lượng amino acid với dung môi pha đảo được sử dụng đã được tối ưu: Dung

môi A là Na_2HPO_4 40 mM và Dung môi B là methanol:acetinitrile: H_2O (45:45:10). Điều kiện phân tích khi sử dụng detector huỳnh quang được thể hiện trong bảng 2 và bước sóng được tối ưu theo quy trình thay đổi của pha động được nêu trong bảng 3.



Hình 1. Minh họa kết quả phân tích amino acid bằng detector DAD.

Bảng 2. Điều kiện phân tích HPLC-FLD.

Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (ml/ phút)	Tỷ lệ dung môi A (%)	Tỷ lệ dung môi B (%)
0	1	100	0
2	1	100	0
35	1	60	40
43	1	0	100
48	1	0	100
50	1	100	0
55	1	100	0

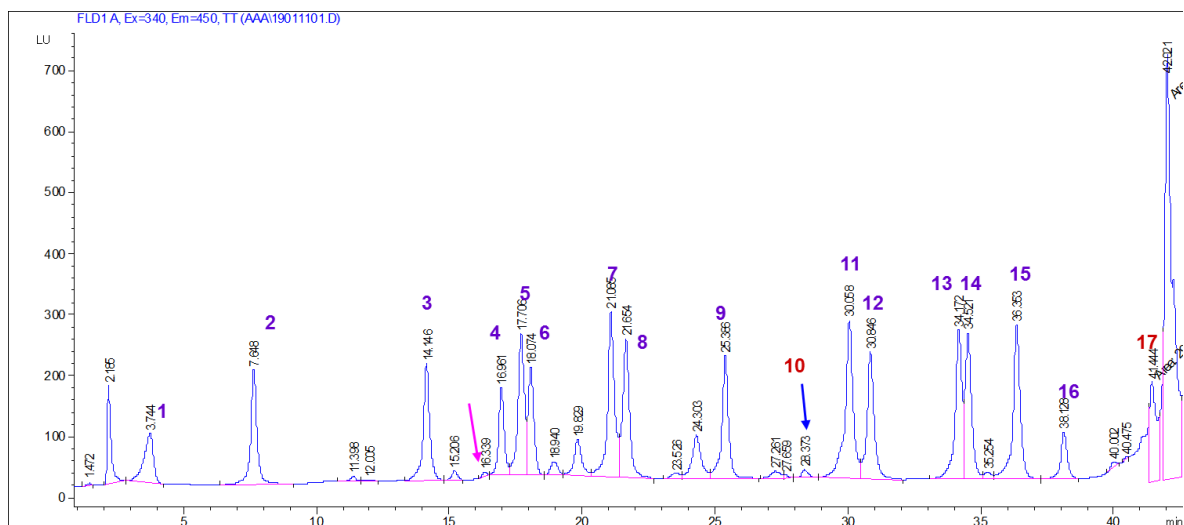
Bảng 3. Thông số kỹ thuật của bước sóng huỳnh quang.

Thời gian (phút)	Bước sóng kích thích (nm)	Bước sóng bức xạ (nm)	PMT-Gain
0	340	450	10
24	266	305	9

Với điều kiện phân tích đã được tối ưu như vậy, hỗn hợp amino acid chuẩn chứa 17 amino acid đã được phân tách và nhận dạng đầy đủ, với các đỉnh rõ ràng có thể nhận biết được theo mô phỏng của nhà sản xuất (Sigma). Kết quả được trình bày trên hình 2 và bảng 4.

Qua so sánh kết quả phân tích bằng hai

detector khác nhau cho thấy, sử dụng detector huỳnh quang phân tách 17 amino acid tốt hơn, giới hạn phát hiện tốt hơn so với detector DAD. Vì vậy, detector huỳnh quang cùng với điều kiện chạy đã tối ưu được chọn để phân tích hàm lượng amino acid trong mẫu của lột trong các giai đoạn chế biến.



Hình 2. Kết quả phân tích amino acid bằng detector huỳnh quang.

Bảng 4. Kết quả nhận dạng 17 amino acid theo thời gian lưu.

STT	Thời gian lưu	Tên amino acid	STT	Thời gian lưu	Tên amino acid
1	3,744	Aspartatic acid	10	28,373	Cystine
2	7,648	Glutamic acid	11	30,088	Valine
3	14,146	Serine	12	30,846	Methionine
4	16,961	Histidine	13	34,172	Phenylalanine
5	17,706	Glycine	14	32,521	Isoleucine
6	18,074	Threonine	15	36,353	Leucine
7	21,086	Arginine	16	38,128	Lysine
8	21,654	Alanine	17	41,444	Proline
9	25,386	Tyrosine			

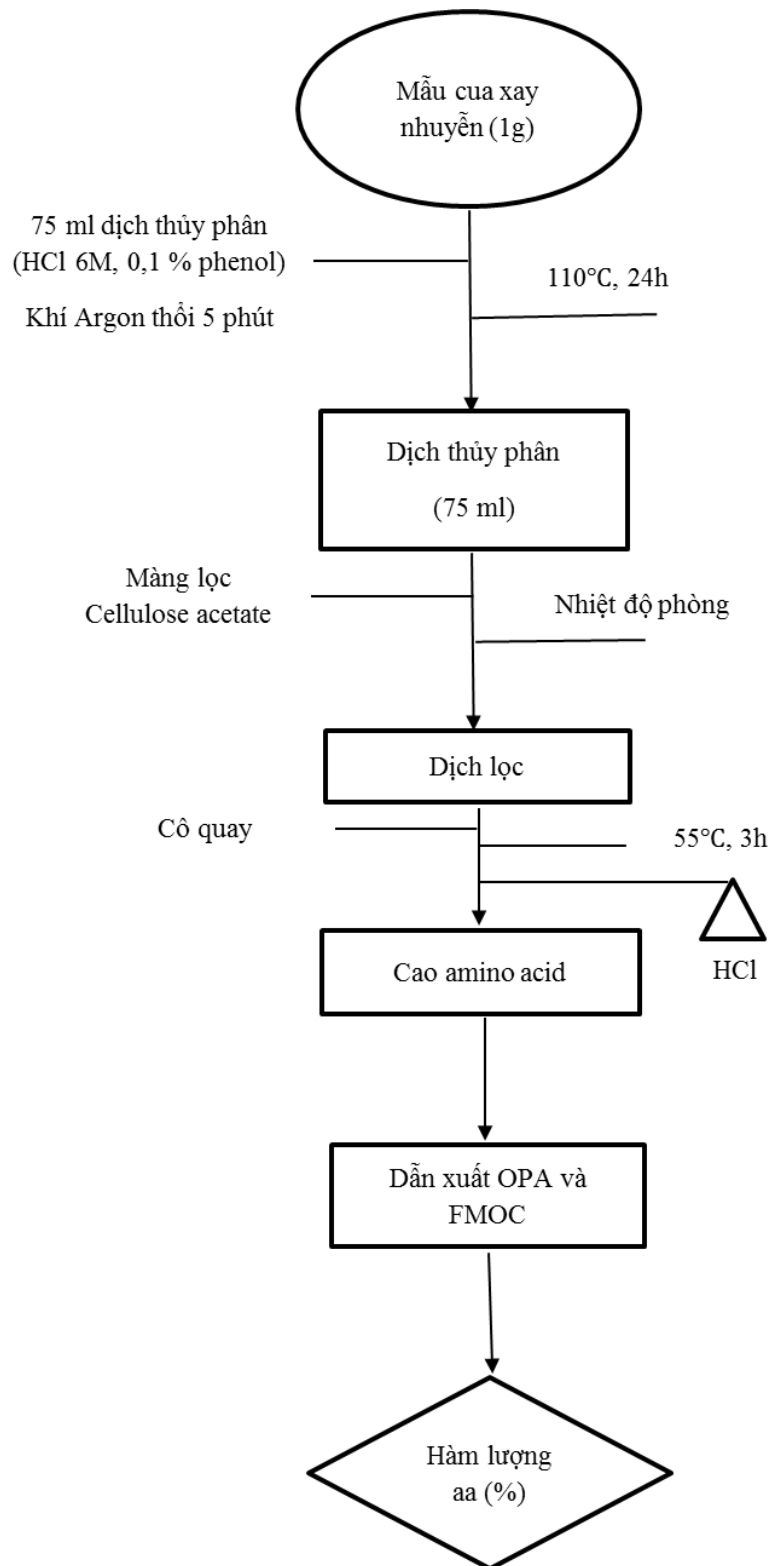
Xác định khoảng tuyến tính

Để xác định khoảng tuyến tính của phương pháp phân tích, chúng tôi pha một dãy nồng độ từ 10, 25, 100, 250, 1000 pmol/μl cho 17 amino acid. Kết quả cho thấy khoảng tuyến tính từ 10 đến 250 pmol/μl, tại nồng độ 1000 pmol/μl nồng độ lớn nên không còn tuyến tính. Phương trình đường chuẩn được lập cho từng amino acid với hệ số tương quan R^2 từ 0,98 đến 0,99

cho tất cả các amino acid.

Quy trình kỹ thuật xác định hàm lượng amino acid trong mẫu của lệt

Mẫu của lệt nguyên liệu và mẫu của lệt sau khi chế biến được xử lý theo quy trình sau nhằm xác định hàm lượng amino acid (Hình 3). Mỗi một bước trong quy trình đều được tối ưu các thông số như mô tả trong các mục trên.



Hình 3. Quy trình phân tích hàm lượng amino acid trong mẫu cua.

Hàm lượng amino acid của cua lột nguyên liệu

Kết quả cho thấy hàm lượng amino acid tổng số trong mẫu của nguyên liệu đạt 4,53 (g/100g khối lượng tươi) (Bảng 5). So sánh với các tài liệu trên thế giới cho thấy hàm lượng amino acid trong cua lột ở Việt Nam khá cao và đầy đủ các amino acid thiết yếu như lysine, valine, cysteine (Wu, 2010).

Hàm ẩm trong cua lột tươi chiếm tới 85,7%,

như vậy, hàm lượng amino acid đạt 4,53% trong 14,3% khối lượng khô (xấp xỉ 31,3% khối lượng khô). Kết quả này tương đương với nghiên cứu về hàm lượng protein trong cua lột (xấp xỉ 30,0%) đã công bố (Nguyen Thi Lan Phuong, 2017). Trong khi đó, hàm lượng amino acid trong cua ở nhiều loài cũng cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các loài từ 5,46 đến 8,73% (*Portunus pelagicus*, *Portunus gladiator*, *Charybdis lucifera*) (Ramamoorthy, 2016).

Bảng 5. Hàm lượng 17 amino acid của cua lột nguyên liệu.

STT	Tên amino acid	Hàm lượng amino acid (g/100g)	
		Nguyên liệu cua lột ban đầu	Trong bột cua lột thủy phân
1	Aspartic acid	0,29	4,31
2	Serine	0,41	3,45
3	Glutamic acid	0,21	1,63
4	Glycine	0,33	2,31
5	Histidine	0,11	3,9
6	Arginine	0,25	2,92
7	Threonine	0,32	2,08
8	Alanine	0,21	3,45
9	Proline	0,50	8,74
10	Cysteine	0,33	5,52
11	Tyrosine	0,23	4,72
12	Valine	0,18	6,56
13	Methionine	0,16	4,35
14	Lysine	0,20	3,45
15	Isoleucine	0,23	2,71
16	Leucine	0,29	4,28
17	Phenylalanine	0,28	1,20
Tổng		4,53	65,58

Bột cua lột thủy phân bằng enzyme

Hàm lượng amino acid trong bột cua lột thủy phân chế biến bằng enzyme có tỷ lệ tăng lên đáng kể, từ 31,3% khối lượng khô lên 65,58% khối lượng khô (Bảng 5). Điều này có thể được giải thích vì bột cua lột thủy phân thu được đã loại bỏ thành phần vỏ chitin mềm và

những thành phần không phân giải được sau khi thủy phân. Nghiên cứu của Harun và cộng sự năm 2017 cho thấy, hàm lượng protein thô thu được trong bột thủy phân cua lột lên tới 74,18%. Như vậy, bột cua lột thủy phân có hàm lượng amino acid tăng lên 2 lần so với trước khi chế biến. Hàm lượng amino acid thiết yếu đạt 28,53% gồm các amino acid như leucine 4,28%;

valine 6,56%; histidine 3,9%; lysine 3,45%, trong khi, hàm lượng các amino acid không thiết yếu đạt 37,05%, trong đó, arginine, cysteine, proline lần lượt đạt 2,92; 5,52; 8,74%.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã lựa chọn được các điều kiện phân tích phù hợp để định lượng các amino acid trong cua lột bao gồm các bước thủy phân amino acid bằng acid ở 110°C trong 24 giờ, sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng pha động là dung môi Na₂HPO₄ 40 mM kết hợp với hỗn hợp dung môi methanol: acetonitril: nước tỷ lệ 45:45:10, detector huỳnh quang ở bước sóng kích thích 340 và bước sóng phát xạ 450 nm trong 40 phút đầu, sau đó là bước sóng kích thích 266 và bước sóng phát xạ 305 nm.

Kết quả về hàm lượng amino acid trong quá trình chế biến cho thấy nguyên liệu cua lột có hàm lượng amino acid 4,53% khối lượng tươi, tương đương 31,3% khối lượng khô. Sau khi chế biến bằng công nghệ enzyme thu được bột cua lột thủy phân có hàm lượng amino acid tăng lên khoảng 2 lần (xấp xỉ 65,58% khối lượng khô).

Lời cảm ơn: Công trình này được hỗ trợ tài chính bởi Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn với mã số hợp đồng 16/2017/HĐ/KHCN-VP thuộc chương trình Công nghệ sinh học nông nghiệp và thủy sản 2020.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Harun Z, Amin AM, Sarbon NM, Zaino MKM, Sharmin KN (2017) Optimisation of enzymatic

protein hydrolysis of mud crab (*Scylla sp.*) to obtain maximum antioxidant activity using response surface methodology. *Malays Appl Biol* 46(3): 15–21.

Ma X, Zhao D, Li X, Meng L (2015) Chromatographic method for determination of the free amino acid content of chamomile flowers. *Pharmacogn Mag* 11 (41): 176-179.

Mullally MM, O'Callaghan DM, FitzGerald RJ, Donnelly WJ, Dalton JP (1994) Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatic protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics. *J Agricult Food Chem* 42(12): 2973–2981.

Nguyen Thi Phuong Lan, Do Thi Thanh Trung, Van Thu Vu, Dao Thi Dung, Le Tat Thanh (2018) Establishing the hydrolysis procedure of soft-shell crab (*Scylla sp.*) in Vietnam. *Vietnam J Sci Technol* 56 (2A): 201-208.

Ramamoorthy N, Karuppasamy KP, Sri Sakthi Priyadarshini R (2016) Proximate, amino acid and fatty acid composition of the marine crabs from the southeast coast of India. *J Mar Biosci* 2 (1): 91-98.

Sarower MG, Bilkis S, Rauf MA, Khanam M, Islam MS (2013) Comparative biochemical composition of natural and fattened mud crab *Scylla serrata*. *J Sci Res* 5(3): 545-553.

Vilaso-Martinez M, López-Hernández J, Lage-Yusty M (2007) Protein and amino acid contents in the crab, *Chionoecetes opilio*. *Food Chem* 103: 1330–1336.

Xugan Wu (2010) Comparison of gender differences in biochemical composition and nutritional value of various edible parts of the blue swimmer crab. *J Food Comp Anal* 23: 154–159.

ESTABLISHMENT OF A PROCEDURE TO DETERMINE THE CONTENT OF AMINO ACIDS IN SOFT-SHELL CRAB (*Scylla sp.*)

Nguyen Thi Phuong Lan^{1,2}, Do Thi Thanh Trung³, Van Thu Vu⁴, Le Tat Thanh^{1,3}

¹Graduate University of Sciences and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Vietnam Food Administration, Ministry of Health

³Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Mud crab *Scylla sp.* is a common sea crab species in Vietnam as well as in Asia Pacific. Today,

mud crabs are raised on a large scale to be harvested at the soft molting stage because of the high economic value of the finished shell crabs. At present, the processing of soft shell crabs is limited to whole packaging and exporting. However, 30% of soft-shelled crabs in processing often lose their feet and claws, which reduce production costs. Therefore, it is necessary to study the technology of processing soft-shell crabs to improve the value of soft-shelled crab products. Recently, the application of enzymes in processing has brought many benefits such as being environmentally friendly and creating many bioactive substances. In this journal, we built the procedure to determine amino acid content in the processing of *Scylla* sp. to ensure the quality of products obtained after processing. This procedure based on HPLC using a fluorescence reader. The results showed that the amino acid content after hydrolysis process by enzyme technology reached 65.58% dry weight and contains many valuable amino acids such as lysine, leucine, valine, methionine, histidine.

Keywords: *Enzyme technology, hydrolysis, mud crab, soft-shell crab.*