

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ ĐẾN CHẤT LƯỢNG VÀ HIỆU SUẤT THU HỒI COLLAGEN TỪ DA CÁ THẬT LÁT CÒM (*Chitala ornata*)

Lê Thị Minh Thủy¹, Trương Thị Mộng Thu¹

TÓM TẮT

Ảnh hưởng của chế độ khử protein phi collagen, lipid và chế độ sấy đông khô đến tính chất của collagen từ da cá thật lát còm đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy, da cá thật lát còm được xử lý trong NaOH 0,1 M trong 4 giờ và CH_3COOH 0,5 M trong 60 phút cho hiệu quả khử protein phi collagen và lipid tốt nhất (khử được 13,9% protein phi collagen và 64,5% lipid). Mẫu sau khi xử lý được chiết rút bằng CH_3COOH 0,5 M trong 3 ngày ở nhiệt độ $4 \pm 1^\circ\text{C}$, dịch chiết được kết tủa collagen bằng NaCl 2,5 M. Kết tủa collagen được lọc, hòa tan trong CH_3COOH 0,5 M và thẩm tách trong CH_3COOH 0,1 M và nước cất. Sau đó mẫu được đem đi sấy đông khô trong 48 giờ cho hiệu suất thu hồi và độ ẩm lần lượt là 13,8 và 11,7% cùng với độ hòa tan cực đại ở pH 2 và NaCl 0,2 M. Thành phần acid amin của collagen từ da cá thật lát còm tương thích với collagen nhóm I từ các loài da khác. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể tận dụng da cá thật lát còm là một nguồn nguyên liệu để sản xuất collagen.

Từ khóa: Acid amin, collagen, da cá thật lát còm, độ hòa tan, sấy đông khô.

1. BỐI CẢNH ĐỀ

Collagen là một loại protein có ở động vật có xương sống và chiếm 30% tổng lượng protein trong cơ thể (Gelse *et al.*, 2003). Có 28 loại collagen khác nhau, trong số đó collagen nhóm I chiếm 90% trong số tất cả các loại collagen và có rất nhiều trong da, xương, gân của động vật (Muyonga *et al.*, 2004; Gordon và Haln, 2010). Hiện nay, collagen có rất nhiều ứng dụng trong ngành công nghệ thực phẩm, làm nguyên liệu sản xuất một số loại thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và dược phẩm (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005). Trên thế giới, nguồn nguyên liệu chính để sản xuất collagen là từ da heo và xương bò. Tuy nhiên, sự bùng nổ của bệnh bò điên và lở mồm long móng ở heo đã dẫn đến sự suy giảm nhu cầu sử dụng collagen từ động vật có vú trong những năm gần đây (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005). Do đó, collagen từ cá là một nguồn nguyên liệu thay thế cho collagen từ động vật có vú (Nagai *et al.*, 2002; Nomura *et al.*, 1996).

Cá thật lát là một trong những loài cá nước ngọt được nuôi phổ biến ở đồng bằng sông Cửu Long, đặc biệt là tỉnh Hậu Giang với sản lượng hằng năm lên đến 490 tấn (Ngô Văn Thống, 2018) và đang được định hướng nuôi quy mô công nghiệp (VASEP, 2019). Loài cá này đã và đang trở thành đối tượng

thủy sản có giá trị kinh tế cao nhờ phẩm chất thịt ngon, và chế biến được nhiều loại sản phẩm như cá thật lát còm rút xương, chả cá thật lát,... Trong đó chả cá thật lát là mặt hàng chủ lực, vì vậy lượng phụ phẩm từ quá trình chế biến chả cá như da, đầu và xương là rất lớn, chiếm khoảng 60% tổng khối lượng nguyên liệu (Dekkers *et al.*, 2011) và da cá là nguồn nguyên liệu thích hợp để chiết rút collagen. Hiện nay, lĩnh vực sản xuất collagen từ da cá đang trở thành hướng nghiên cứu mới và đã có nhiều nghiên cứu về chiết rút collagen từ da của nhiều loài cá khác nhau như da cá hồi (Lê Phan Thùy Hạnh và Trần Quyết Thắng, 2017), da cá tra (Singh *et al.*, 2011; Trần Thị Huyền *et al.*, 2012), da cá trắm cỏ (Chen *et al.*, 2015). Tuy nhiên, chưa có công bố nào về sự ảnh hưởng của phương pháp xử lý đến chất lượng và hiệu suất thu hồi collagen từ da cá thật lát còm. Vì vậy, việc nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp xử lý đến chất lượng và hiệu suất thu hồi collagen từ da cá thật lát còm nhằm tận dụng phụ phẩm của các cơ sở chế biến cá thật lát còm nói riêng và cơ sở chế biến thủy hải sản nói chung ở nước ta là vấn đề cấp thiết

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chuẩn bị mẫu

Da cá thật lát còm được thu trực tiếp tại chợ Hưng Lợi (quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ), da cá được bảo quản bằng nước đá trong các thùng cách nhiệt nhằm hạn chế các biến đổi ảnh hưởng đến chất lượng nguyên liệu và vận chuyển về phòng thí

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ
Email: ltmthuy@ctu.edu.vn

nghiệm của Bộ môn Chế biến thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Tại đây, da cá được xử lý loại bỏ tạp chất, rửa sạch, để ráo, cắt nhỏ (2 x 1 cm), và cho vào túi bao PE (500 g/bao) và được trữ đông ở -20°C cho đến khi tiến hành thí nghiệm.

2.2. Hóa chất

Các hóa chất được sử dụng: NaOH (Sodium Hydroxide), CH₃COOH (Acetic acid), NaCl (Sodium Chlorua), H₂SO₄ (Sulfuric acid) đậm đặc, H₂SO₄ (Sulfuric acid) để chuẩn độ, Folin, H₃BO₃ (Boric acid), C₄H₁₁NO₃ (Tris hydroxymethyl aminomethane), H₂O₂ (Hydrogen Peroxide) và một số hóa chất khác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của thời gian ngâm da cá thát lát còn trong dung dịch NaOH đến khả năng khử protein phi collagen

Tiến hành thí nghiệm: Đầu tiên, da cá thát lát còn được tiến hành rửa đông, sau đó được ngâm trong dung dịch NaOH 0,1 M trong thời gian lần lượt là 2, 4, 6 và 8 giờ ở nhiệt độ 4 ± 1°C. Tỷ lệ da cá: dung dịch NaOH (w/v) là 1:8. Da cá được rửa sạch dưới vòi nước chảy cho đến khi đạt pH trung tính rồi tiến hành phân tích hàm lượng protein còn lại trong da cá đã xử lý, từ đó chọn ra được thời gian ngâm khử protein phi collagen thích hợp nhất trong dung dịch NaOH. Thí nghiệm được khảo sát thông qua 1 nhân tố (thời gian ngâm trong dung dịch NaOH), 4 nghiệm thức, số lần lặp lại là 3 và tổng số mẫu thí nghiệm là 12. Khối lượng da cá cho một mẫu thí nghiệm là 100 g.

2.3.2. Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian ngâm trong dung dịch CH₃COOH đến khả năng khử lipid của da cá thát lát còn

Tiến hành thí nghiệm: Da cá thát lát sau khi xử lý trong NaOH với thời gian thích hợp (kết quả thí nghiệm 1) được xử lý tiếp tục trong dung dịch CH₃COOH 0,5 M trong thời gian lần lượt là 20, 40, 60 và 80 phút ở nhiệt độ 4 ± 1°C. Tỷ lệ da cá: dung dịch (w/v) là 1:8. Sau đó da cá được rửa sạch cho đến khi đạt được pH trung tính và phân tích hàm lượng lipid còn lại trong da cá sau khi xử lý bằng dung dịch CH₃COOH, từ đó chọn ra thời gian ngâm khử lipid thích hợp nhất. Thí nghiệm được bố trí 1 nhân tố (thời gian ngâm trong dung dịch CH₃COOH), 4 nghiệm thức, số lần lặp lại là 3 và tổng số mẫu thí

nghiệm là 12. Khối lượng da cá cho mỗi mẫu thí nghiệm là 100 g.

2.3.3. Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của thời gian sấy đông khô đến tính chất của collagen da cá thát lát

Tiến hành thí nghiệm: Da cá sau khi được khử protein phi collagen trong dung dịch NaOH 0,1 M và khử lipid trong dung dịch CH₃COOH 0,5 M ở thời gian thích hợp (thí nghiệm 1 và 2) sẽ được thực hiện tách chiết collagen bằng dung dịch CH₃COOH 0,5 M trong 3 ngày ở nhiệt độ 4 ± 1°C, tỉ lệ da cá: dung dịch (w/v) là 1/2,5. Tiếp đến, kết tủa collagen bằng dung dịch muối NaCl 2,5 M với sự tham gia của Tris (hydroxymethyl) aminomethane nồng độ 0,05 M ở pH = 7. Tiến hành ly tâm để thu kết tủa collagen và tiếp tục hòa tan collagen thu được trong dung dịch CH₃COOH 0,1 M với tỉ lệ collagen: dung dịch là 1/2 (w/v). Sau đó, mẫu được thẩm tách lần lượt trong dung dịch CH₃COOH 0,1 M trong 48 giờ, nước cất trong 48 giờ nhằm loại muối và acid, đảm bảo nhiệt độ trong suốt quá trình thẩm tách là 4 ± 1°C. Dung dịch sau thẩm tách được đem đi sấy bằng thiết bị sấy lạnh (Modulyod-230, Thermo Electron, Waltham, Mỹ) trong các mốc thời gian là 36, 48 và 60 giờ. Mẫu collagen sau khi sấy thu được ở dạng sợi, sợi. Tiến hành phân tích một số chỉ tiêu như độ ẩm, hiệu suất thu hồi nhằm tìm ra thời gian sấy đông khô thích hợp nhất. Mẫu tối ưu được sử dụng để kiểm tra độ hòa tan ở các pH từ 1 đến 10 và trong dung dịch NaCl từ 0 đến 1,2 M và phân tích thành phần acid amin.

Thí nghiệm được thực hiện thông qua 1 nhân tố (thời gian sấy), 3 nghiệm thức, số lần lặp lại là 3. Khối lượng mẫu cho một mẫu thí nghiệm là 100 g.

2.4. Phương pháp phân tích

Các chỉ tiêu về độ ẩm, hàm lượng protein và lipid được xác định theo AOAC (2000). Xác định hàm lượng ẩm bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi, hàm lượng protein bằng phương pháp Kjeldahl và hàm lượng lipid bằng phương pháp Soxhlet.

Xác định thành phần acid amin trong collagen bằng thiết bị HPLC theo phương pháp được mô tả bởi Thụy *et al.* (2014). Thủy phân 20 mg collagen trong HCl 6 M ở nhiệt độ 110°C trong 22 giờ trong môi trường chân không. Sản phẩm thủy phân được trung hòa với NaOH 6 M và 0,6 M sau đó được lọc bằng màng cellulose. Dịch lọc được sử dụng để phân tích acid amin bằng hệ thống HPLC.

Xác định hiệu suất thu hồi ở công đoạn sấy đông khô bằng phương pháp kiểm tra khối lượng, $H = \frac{Y}{X} \times 100$ với X (g) là khối lượng ban đầu của da cá (50 g) và Y (g) là khối lượng collagen sau khi sấy.

Kiểm tra độ hòa tan ở các pH từ 1 đến 10: Pha hỗn hợp collagen có nồng độ 3 mg/mL, chia ra 10 cốc mỗi cốc chứa 8 mL collagen được điều chỉnh pH bằng HCl 6 M hoặc NaOH 6 M để thu được pH từ 1 – 10 và thể tích cuối cùng của dung dịch được điều chỉnh đến 10 mL bằng nước cất. Sau đó, hỗn hợp collagen được đem đi ly tâm với tốc độ 20.000 g trong 30 phút ở 4°C thu được phần dịch lỏng. Hàm lượng protein trong dịch lỏng được xác định theo phương pháp Lowry *et al.* (1951) sử dụng huyết thanh bò làm chất chuẩn, từ đó tính được độ hòa tan theo công thức bằng số mg/mL protein đo được trên máy so màu quang phổ UV, bước sóng 660 nm (Thuy *et al.*, 2014).

Độ độ hòa tan trong các nồng độ muối NaCl từ 0 đến 1,2 M: Pha hỗn hợp collagen có nồng độ 6 mg/mL, lấy 5 mL hỗn hợp collagen cho vào 5 mL dung dịch NaCl ở các nồng độ từ 0,2 đến 1,2 M trong acid acetic 0,1 M. Hỗn hợp collagen được đem đi ly tâm với tốc độ 20.000 g trong 30 phút ở 4°C thu được phần dịch lỏng. Hàm lượng protein trong dịch lỏng được xác định theo phương pháp Lowry *et al.* (1951) sử dụng huyết thanh bò làm chất chuẩn, từ đó tính độ hòa tan theo công thức bằng số mg/mL protein đo trên máy so màu quang phổ UV, bước sóng 660 nm (Thuy *et al.*, 2014).

Các chỉ tiêu chất lượng của collagen từ da thát lát còm được so sánh với collagen từ da cá tra theo kết quả nghiên cứu của Lê Thu Thu Hương (2018).

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được phân tích bằng phương pháp thống kê mô tả (trung bình ± độ lệch chuẩn, sử dụng chương trình Microsoft Excel 2013). Sự khác biệt của các yếu tố giữa các nghiệm thức được phân tích bằng ANOVA với mức ý nghĩa 95% và phép thử Duncan ($p < 0,05$), bằng chương trình Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 16.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần hóa học của da cá thát lát còm

Chất lượng của collagen được quyết định bởi nhiều yếu tố như nồng độ của acid hoặc kiềm được sử dụng trong quá trình tiến xử lý hay nhiệt độ và

thời gian xử lý. Bên cạnh đó, bản chất của nguồn nguyên liệu cũng ảnh hưởng rất lớn tới năng suất và tinh chất của collagen (Regenstein và Zhou, 2007). Kết quả phân tích thành phần hóa học của da cá thát lát còm được thể hiện ở trong bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hóa học của da cá thát lát còm (tính theo cân bản ướt)

Chỉ tiêu	Hàm lượng (%)
Ấm	65,1±0,749
Khoảng	0,412±0,004
Lipid	2,25±0,123
Protein tổng số (bao gồm protein phi collagen)	28,8±0,639
(bao gồm protein phcollagen)	

Ghi chú: Số liệu thống kê được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn với n=3

Thành phần hóa học chủ yếu của da cá thát lát còm là ẩm độ chiếm 65,1% kế tiếp là protein 28,8%, lipid chiếm 2,25% và khoảng là 0,412%. Da cá thát lát còm có hàm lượng khoảng rất thấp (nhỏ hơn 0,5%) nên không cần khử khoáng. Trong khi đó hàm lượng protein phi collagen và hàm lượng lipid trong da cá thát lát còm chiếm tỉ lệ cao sẽ làm cản trở quá trình chiết rút, ảnh hưởng đến chất lượng của collagen thành phẩm. Vì vậy, các quá trình tiến xử lý cần được thực hiện để loại bỏ các tạp chất, protein phi collagen, lipid hay sắc tố có trong nguồn nguyên liệu thô ban đầu để tạo điều kiện cho quá trình chiết xuất và cải thiện độ tinh khiết cho collagen (Benjakul *et al.*, 2012).

3.2. Ảnh hưởng của thời gian ngâm da cá thát lát còm trong dung dịch NaOH đến khả năng khử protein phi collagen

Hàm lượng protein còn lại trong da cá thát lát còm sau khi ngâm trong dung dịch NaOH qua các mốc thời gian khác nhau được trình bày ở bảng 2.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy hàm lượng protein giảm dần từ 28,7% xuống còn 24,9% khi tăng thời gian ngâm da cá trong dung dịch NaOH 0,1 M từ 0 đến 4 giờ. Tiếp tục tăng thời gian ngâm lên 6 và 8 giờ thì hàm lượng protein hầu như không giảm nhiều. Xử lý da cá trong dung dịch NaOH nhằm mục đích khử protein phi collagen và các sắc tố (Trần Thị Huyền và *ctv.*, 2006). Dưới tác dụng của dung dịch NaOH, protein bị thay đổi cấu trúc do một số liên kết peptide bị phá vỡ nên các tạp chất dễ dàng được loại ra và

hóa tan vào trong dung dịch, đồng thời quá trình này cũng có thể làm phá vỡ các liên kết chéo trong cấu trúc collagen tạo điều kiện cho việc chiết xuất, thậm chí làm bất hoạt các protease nội tại liên quan đến sự thoái hóa collagen (Regenstein và Zhou, 2007). Ngoài ra, theo Yoshimura *et al.* (2000) dung dịch kiềm còn tấn công vào các vùng telopeptide của phân tử collagen, làm cho collagen có thể hòa tan trong dung dịch gây thất thoát collagen nếu thời gian xử lý dài và nồng độ hóa chất cao.

Bảng 2. Hàm lượng protein còn lại trong nguyên liệu sau khi ngâm trong dung dịch NaOH 0,1 M qua các mốc thời gian khác nhau

Thời gian ngâm trong NaOH (giờ)	Hàm lượng protein (%)
0	28,7 ± 0,829 ^a
2	26,6 ± 1,44 ^b
4	24,9 ± 0,477 ^c
6	22,5 ± 0,632 ^d
8	21,4 ± 0,149 ^d

Ghi chú: Số liệu thống kê trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3), những chữ cái (a, b, c và d) khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%.

Sử dụng dung dịch NaOH để khử các hợp chất protein phi collagen đã được ứng dụng trong rất nhiều nghiên cứu trước đây. Tuy nhiên, khả năng khử protein phi collagen có khác nhau tùy thuộc vào thời gian ngâm và tính chất nguồn nguyên liệu ban đầu. Trong nghiên cứu chiết tách collagen từ da cá hồi (Lê Phan Thủy Hạnh và Trần Quyết Thắng, 2017), hiệu quả khử protein phi collagen là 12,36% bằng dung dịch NaOH 0,05 M trong 2 giờ, nghiên cứu chiết rút gelatin từ da cá tra (Lê Thị Minh Thủy và Hồ Văn Việt, 2018) thì hàm lượng protein giảm từ 29,4 còn 14,5% khi ngâm da cá với dung dịch NaOH 0,1 M trong 30 phút; nghiên cứu chiết rút gelatin từ bong bóng cá tra thì hàm lượng protein giảm từ 21,7 xuống còn 18,2% (Nhâm Đức Tri và Lê Thị Minh Thủy, 2015). Và da cá bò được khử protein phi collagen bằng dung dịch NaOH 0,1 M trong thời gian 2 giờ cho hiệu quả khử tốt nhất (Ahmad *et al.*, 2011). Đối với nghiên cứu chiết rút gelatin từ da cá tráp đầu vàng (Elen *et al.*, 2017) khi ngâm da cá tráp đầu vàng trong dung dịch NaOH 0,3 M trong 15 phút cho hiệu quả khử protein phi collagen là tốt nhất. Đồng thời nồng độ dung dịch NaOH 0,1 M cũng được Singh *et*

al. (2011) và Chen *et al.* (2015) lựa chọn cho quá trình loại protein phi collagen cho da cá tra và cá trắm cỏ.

Qua những nghiên cứu trên về chiết rút collagen và gelatin, mỗi loại nguyên liệu khi được xử lý trong dung dịch NaOH ở các nồng độ và thời gian khác nhau sẽ cho hiệu quả khử protein phi collagen là khác nhau. Vì vậy, trong nghiên cứu này da cá thát lát còm được ngâm trong dung dịch NaOH 0,1 M với thời gian 4 giờ đạt hiệu quả khử protein phi collagen là 13,2% được chọn là mẫu tối ưu cho thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian ngâm trong dung dịch CH₃COOH đến khả năng khử lipid của da cá thát lát còm

Kết quả phân tích hàm lượng lipid còn lại trong da cá thát lát còm sau khi xử lý trong CH₃COOH 0,5 M được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng lipid còn lại trong nguyên liệu sau khi ngâm trong dung dịch CH₃COOH 0,5 M qua các mốc thời gian khác nhau

Thời gian ngâm trong CH ₃ COOH (phút) (giờ)	Hàm lượng Lipid (%)
0	2,25 ± 0,132 ^a
20	1,24 ± 1,48 ^b
40	0,989 ± 0,559 ^c
60	0,796 ± 0,815 ^d
80	0,777 ± 0,178 ^d

Ghi chú: Số liệu thống kê được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3), những chữ cái (a, b, c và d) khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%.

Để nâng cao hiệu quả chiết rút và chất lượng của collagen thì việc khử lipid là một trong những bước rất quan trọng. Từ kết quả phân tích ở bảng 3 cho thấy, hàm lượng lipid giảm nhiều từ 2,25% xuống còn 0,796% khi ngâm da cá trong dung dịch CH₃COOH 0,5M trong thời gian 60 phút, đạt hiệu quả khử lipid là 64,4%. Tiếp tục tăng thời gian ngâm lên 80 phút thì hàm lượng lipid tiếp tục giảm với một lượng rất nhỏ, khác biệt không có ý nghĩa thống kê đối với mẫu 60 phút. Nghiên cứu khử lipid trên da cá trắm cỏ bằng dung dịch acetic acid ở các nồng độ khác nhau cũng được Wang *et al.* (2009) ghi nhận và nồng độ CH₃COOH 0,5 M là phù hợp cho quá trình khử lipid.

hiệu quả chiết xuất cũng cao nhất (19,1%). Bên cạnh đó, nghiên cứu thu nhận collagen từ da cá tra (Lê Thị Thu Hương, 2018) đã loại bỏ được 84,7% lipid khi xử lý da cá trong dung dịch LASNa 0,5% trong 6 giờ. Ngoài ra, nghiên cứu tách chiết collagen từ da cá hồng nâu đã sử dụng butyl alcohol 10% với tỷ lệ mẫu : dung dịch là 1 : 30 trong thời gian 24 giờ cho hiệu quả khử lipid tốt nhất (Jongjareonrak *et al.*, 2005), butyl alcohol có nồng độ 10% cũng được Ahmad và Benjakul (2010) sử dụng để khử lipid trong da cá bô da.

Từ những kết quả nghiên cứu trên cho thấy việc loại lipid ra khỏi nguyên liệu phụ thuộc vào một số yếu tố như hàm lượng lipid trong nguyên liệu ban đầu, độ pH và độ nhớt của dung dịch ngâm nguyên liệu (Nolse và Undeland, 2009). Bên cạnh đó, việc xử lý bằng acid còn giúp da cá trở nên trương nở giúp quá trình chiết xuất collagen đạt hiệu quả cao và loại bỏ các thành phần không mong muốn (Ahmad và Benjakul, 2011). Vì vậy, da cá thát lát còm xử lý trong dung dịch CH₃COOH 0,5 M trong 60 phút đạt hiệu quả khử lipid tốt nhất là 64,4%.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian sấy đông khô đến độ ẩm, hiệu suất thu hồi và độ hòa tan của collagen da cá thát lát

Độ ẩm và hiệu suất thu hồi của sản phẩm collagen được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Sự ảnh hưởng của thời gian sấy đông khô đến độ ẩm, hiệu suất thu hồi của collagen từ da cá thát lát còm

Thời gian (giờ)	Độ ẩm (%)	Hiệu suất thu hồi (%)
36	20,1 ± 0,012 ^a	23,3
48	11,7 ± 0,006 ^b	13,8
60	7,02 ± 0,016 ^c	10,1

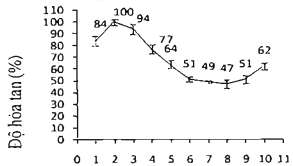
Chi chú: Số liệu thống kê được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3), những chữ cái (a, b và c) khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, khi tăng thời gian sấy đông khô từ 36 lên 60 giờ thì độ ẩm của mẫu giảm rõ rệt (giảm từ 20,1% còn 7,02%) do sự thoát hơi nước một cách mạnh mẽ trong mẫu là tác nhân làm giảm khối lượng mẫu thu được sau khi sấy đông khô dẫn đến hiệu suất thu hồi giảm (giảm từ 23,3% còn 10,1%) (Nguyễn Trọng Cán và Đỗ Minh Phung, 1990). Tuy nhiên, nếu thời gian sấy đông khô là 36 giờ thì chưa thật sự đủ thời gian làm thoát hơi nước trong mẫu

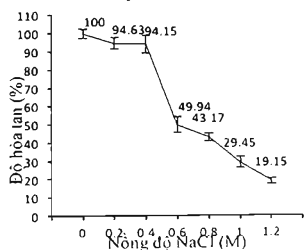
collagen, vì vậy vẫn còn một ít nước đã còn sót lại trong mẫu sau khi sấy đông khô, còn nếu sấy đông khô trong 60 giờ thì sẽ làm độ ẩm trong mẫu giảm mạnh chỉ còn 7,02%. Hiệu suất thu hồi collagen ở ba mốc thời gian khảo sát trong nghiên cứu này đều cao hơn so với việc chiết xuất collagen từ da cá tra của Singh *et al.* (2011) (hiệu suất thu hồi từ 5 – 7%) và thấp hơn so với nghiên cứu của Wang *et al.* (2009) với hiệu suất chiết xuất collagen từ da cá trắm cỏ khoảng 17%. Vì thế 48 giờ là thời gian sấy thích hợp nhất (trong mẫu không còn nước đã sau khi sấy, độ ẩm và hiệu suất thu hồi ở mức hợp lý lần lượt là 11,7% và 13,8%), được chọn làm mẫu tối ưu đem đi phân tích độ hòa tan (độ hòa tan trong các pH từ 1 đến 10 và trong các nồng độ muối NaCl từ 0 đến 1,2 M) và thành phần acid amin.

3.5. Độ hòa tan và thành phần acid amin của collagen từ da cá thát lát còm

Độ hòa tan của collagen trong các pH từ 1 đến 10 và trong dung dịch NaCl ở các nồng độ từ 0 đến 1,2 M thể hiện trong hình 1 và 2.



Hình 1. Độ hòa tan của collagen từ da cá thát lát còm ở các pH khác nhau



Hình 2. Độ hòa tan của collagen từ da cá thát lát còm ở các nồng độ muối khác nhau

Bảng 5. Thành phần acid amin của collagen chiết rút từ da cá thát lát còm

STT	Thành phần acid amin	Hàm lượng (đơn vị/1000 đơn vị)
1	Aspartic acid	44
2	Threonine	23
3	Serine	35
4	Glutamic acid	74
5	Glycine	337
6	Alanine	94
7	Valine	23
8	Cysteine	1
9	Methionine	35
10	Tryptophan	ND
11	Isoleucine	6
12	Leucine	25
13	Tyrosine	2
14	Phenylalanine	11
15	Hydrolysine	6
16	Lysine	24
17	Histidine	5
18	Arginine	55
19	Hydroxyproline	86
20	Proline	114
21	Imino acid	200

ND: Không phát hiện

Từ hình 1 cho thấy, mẫu collagen da cá thát lát cho độ hòa tan cao ở các pH có tính acid (pH 1 – 5), độ hòa tan đạt cực đại khi pH = 2 và giống với kết quả độ hòa tan của collagen từ da cá bò da (Ahmad và Benjakul, 2010), da cá nóc (Huang *et al.*, 2011). Ngoài ra khả năng hòa tan của collagen ở các pH khác nhau còn tùy thuộc vào nguồn nguyên liệu ban đầu như đối với da cá hồng nâu (Jongjareonrak *et al.*, 2005) có độ hòa tan cực đại ở pH = 3, da cá bơn (Sun *et al.*, 2019) có độ hòa tan cực đại ở pH = 4. Mặt khác độ hòa tan của collagen giảm đáng kể trong khoảng pH = 7 – 9. Sự giảm độ hòa tan trong phạm vi pH này có thể là do sự gia tăng tương tác kỵ nước của các phân tử collagen, do đó dẫn đến sự kết tủa collagen, đặc biệt là tại điểm pI (Matnarah *et al.*, 2011). Sự khác biệt về pH cực đại và cực tiểu đối với độ hòa tan của collagen được nghiên cứu là do sự khác biệt về tính chất phân tử và thành phần của collagen (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005). Độ hòa tan có khuynh hướng tăng nhẹ ở pH 8 – 10 có lẽ được cho là

do sự tăng cường lực đẩy của các phân tử collagen khi pH > pI (Chen *et al.*, 2015)

Mẫu collagen da cá thát lát có độ hòa tan khác nhau ở các nồng độ muối NaCl từ 0 đến 1,2 M được thể hiện trong hình 2. Độ hòa tan cao (trên 90%) ở các nồng độ muối NaCl thấp (từ 0 – 0,4 M), nhưng khi nồng độ muối tăng từ 0,6 M trở đi, thì độ hòa tan trở nên giảm rõ rệt (dưới 50%, khi nồng độ muối tăng đến 1,2 M thì độ hòa tan của collagen chỉ còn 19,15%). Từ kết quả trên có thể nói rằng độ hòa tan của collagen càng cao khi nồng độ NaCl càng thấp và tương đồng với độ hòa tan của collagen được chiết rút từ da cá nóc (Huang *et al.*, 2011), da cá bơn (Sun *et al.*, 2019) và độ hòa tan của collagen từ da cá hồng nâu (Jongjareonrak *et al.*, 2005). Nguyên nhân có thể giải thích rằng: khi nồng độ muối NaCl càng cao thì sự tăng cường tương tác kỵ nước giữa các chuỗi protein càng cao dẫn đến kết tủa (Damodaran, 1996). Ngược lại, ở nồng độ NaCl thấp, các ion có trong dung dịch muối liên kết yếu với các nhóm tích điện trên bề mặt protein và không can thiệp vào lớp hydrat hóa trên các miền (Singh *et al.*, 2011) dẫn đến độ hòa tan cao.

Thành phần acid amin của collagen từ da cá thát lát còm tương đối giống với các collagen nhóm I khác, đặc điểm đặc trưng nhất của collagen là có hàm lượng glycine rất cao ≥ 30% (Ogawa *et al.*, 2003). Từ kết quả phân tích ở bảng 5, glycine là acid amin được tìm thấy nhiều nhất trong collagen từ da cá thát lát còm chiếm 33,7% trên tổng số acid amin. Kết quả này gần giống với collagen loại I từ da cá chép là 33,2% (Duan *et al.*, 2009) và da cá chêm là 33,1% (Sinthusamran *et al.*, 2013). Ngoài ra, collagen từ da cá thát lát còm bao gồm các loại acid amin khác như proline, alanine, hydroxyproline và glutamic acid tương tự như collagen từ các loài khác (Bae *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Không phát hiện ra thành phần acid amin loại tryptophan trong collagen từ da cá thát lát còm. Hàm lượng imino acid của collagen từ da cá thát lát còm (proline và hydroxyproline) là 20% gần tương đương với da cá rô phi là 19,4% (Potaros *et al.*, 2009), da cá chép là 19,0% (Duan *et al.*, 2009) và đối với da cá chêm là 19,6% (Sinthusamran *et al.*, 2013). Hàm lượng imino acid trong collagen càng nhiều thì cấu trúc xoắn của collagen càng ổn định do đó độ bền nhiệt của collagen càng cao (Ikoma *et al.*, 2003).

4. KẾT LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp xử lý đến tính chất của collagen từ da cá thát lát còm bao gồm các bước chính như sau: (i) ngâm da cá thát lát còm bằng dung dịch NaOH 0,1 M trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ $4 \pm 1^\circ\text{C}$ với tỷ lệ $w/v = 1/8$ loại được 13,2% protein phi collagen, (ii) xử lý trong dung dịch CH_3COOH 0,5 M với tỷ lệ $w/v = 1/8$ trong 60 phút ở nhiệt độ $4 \pm 1^\circ\text{C}$ loại được 64,6% lipid trong da cá, (iii) tách chiết collagen được thực hiện với CH_3COOH 0,5 M trong 3 ngày, $w/v = 1/2,5$ ở nhiệt độ $4 \pm 1^\circ\text{C}$; kết tủa collagen bằng dung dịch muối NaCl 2,5 M trong Tris (hydroxymethyl) aminomethane 0,05 M ở $\text{pH} = 7$. Kết tủa collagen được ly tâm và thẩm tách qua hai môi trường là CH_3COOH 0,1 M để loại muối và môi trường nước cất để loại CH_3COOH . Sau đó tiến hành đem mẫu đi sấy đông khô trong thời gian 48 giờ để tạo ra sản phẩm collagen có hiệu suất thu hồi là 13,8% và hoàn toàn đáp ứng các tính chất cơ lý của collagen nhóm 1.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ Chính phủ Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad, M. and Benjakul, S. (2010). Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Chemistry*. 120(3): 817-824.
- Ahmad, M. and Benjakul, S. (2011). Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. *Food Hydrocolloids*. 25: 381-388.
- AOAC (2000). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists Arlington.
- Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A. and Hara, K. (2008). Biochemical properties of acid-soluble collagen extracted from the skins of underutilised fishes. *Food Chemistry*. 108(1): 49-54.
- Benjakul, S., Nalinanon, S. and Shahidi, F. (2012). Fish collagen. In: Simpson, B. K. (Ed.). *Food Biochemistry and Food Processing*, 2nd. John Wiley & Sons, Inc, New York, pp. 369-370.

- Chen, Y., Ye, R. Wang, Y. (2015). Acid-soluble and pepsin-soluble collagens from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin: a comparative study on physicochemical properties. *International Journal of Food Science & Technology*. 50(1): 186-193.
- Damodaran, S. (1996). Amino acids, peptides and proteins. In: Fennema O. R. (Ed.). *Food Chemistry*, 3rd. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 321-429.
- Dekkers, E., Raghavan, S., Kristinsson, H. G. and Marshall, M. R. (2011). Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 124(2): 640-645.
- Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X. and Konno, K. (2009). Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*. 112(3): 702-706.
- Elen, V., Costa, S., Lucia, F. H. L. and Rosinello, S. P. (2017). Research Article Obtaining gelatin from the skin of Gilthead Bream (*Brachyplatystomus auratus*) use two pre-treatment. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 13(5): 182-189.
- Gelse, K., Poschl, E. and Aigner, T. (2003). Collagens - structure, function and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery*. 55(12): 1531-1546.
- Gordon, M. and Haln, R. (2010). Collagen. *Cell Tissue Research*. 339: 247-257.
- Huang, R. Y., Shiau, Y. C., Chen, H. H. and Huang, C. B. (2011). Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). *Food Hydrocolloids*. 25(6): 1507-1513.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D. and Mann, S. (2003). Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 32(3-5): 199-204.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. and Tanaka, M. (2005). Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus viitta*). *Food Chemistry*. 93(3): 475-484.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. and Tanaka, M. (2005).

Characterisation of acid soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*. 89(3): 363–372.

17. Lê Phan Thùy Hạnh và Trần Quyết Thắng (2017). Chiết tách collagen từ da cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*) bằng phương pháp hóa học. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*. 12: 108–117.

18. Lê Thị Minh Thủy và Hồ Văn Việt (2018). Ảnh hưởng của thời gian bảo quản nguyên liệu đến chất lượng của gelatin chiết rút từ da cá tra. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*. 54: 227–233.

19. Lê Thị Thu Hương (2018). Nghiên cứu phương pháp thu nhận collagen từ da cá tra (*Pangasius hypophthalmus*). Luận án tiến sĩ kỹ thuật. Trường Đại học Bách khoa thành phố Hồ Chí Minh.

20. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., R. J. and Randall. (1951). Protein measure - ment with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1): 256–275.

21. Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A. B. and Kishimura, H. (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*. 129(3): 1179–1186.

22. Muyonga, J. H., Cole, C. G. B. and Duodu, K. G. (2004). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. 85(1): 81–89.

23. Nagai, T., Araki, Y., and Suzuki, N., 2002. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). *Food Chemistry*. 78: 173–177.

24. Ngô Văn Thống (2018). Sản lượng cá thát lát tỉnh Hậu Giang., ngày truy cập 07/01/2020. Địa chỉ <http://www.khuyennonghaugiang.com.vn/Default.aspx?tabId=1446&ndid=840>.

25. Nguyễn Trọng Cán và Đỗ Minh Phụng (1990). Công nghệ chế biến thực phẩm thủy sản tập 2. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Thành phố Hồ Chí Minh. 412 trang.

26. Nhâm Đức Tri và Lê Thị Minh Thủy (2015). Nghiên cứu chiết rút gelatin từ bong bóng cá tra. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*. 48: 36–41.

27. Nolsé, H. and Undeland, I. (2009). The acid and alkaline solubilization process for the isolation of

muscle proteins state of the art. *Food Bioprocess Technology*. 2(1): 1–27.

28. Nomura, Y., Sakai, H., Ishii, Y., and Shirai, K. 1996. Preparation and some properties of type I collagen from fish scales. *Biosciences, Biotechnology, and Biochemistry*. 60: 2092–2094.

29. Ogawa, M., Moody, M. W., Portier, R. J., Bell, J., Schexnayder, M. A. and Losso, J. N. (2003). Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(27): 8088–8092.

30. Potaros, T., Raksakulthai, N., Runglerdkreangkrai, J. and Worawattanamateekul, W. (2009). Characteristics of collagen from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin isolated by two different methods. *Kasetsart Journal*. 43: 584–593.

31. Regensten JM, Zhou P. (2007). Collagen and Gelatin from Marine By-Products. In: Shahidi, F. (Ed.). *Mazimusing the Value of Marine By-Products*, 1st. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 279–303.

32. Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S. and Kishimura, H. (2011). Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*. 124(1): 97–105.

33. Sinthusamran, S., Benjakul, S. and Kishimura, H. (2013). Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chemistry*. 138(4): 2435–2441.

34. Sun, J., Zhang, J., Zhao, D., Xue, C., Liu, Z. and Mao, X. (2019). Characterization of Turbot (*Scophthalmus maximus*) Skin and the Extracted Acid-Soluble Collagen. *Journal of Ocean University of China*. 18(3): 687–692

35. Thuy, L. T. M., Okazaki, E. and Osako, K. (2014). Isolation and characterization of acid - soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Viet Nam. *Food Chemistry*. 149: 264–270.

36. Trần Thị Huyền, Nguyễn Anh Tuấn, Hoàng Ngọc Anh và Vũ Lệ Quyên (2012). Tách chiết collagen từ da cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) bằng phương pháp hóa học. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Thủy sản*. 2: 31–36.

37. Trần Thị Luyến, Đỗ Minh Phụng và Nguyễn Anh Tuấn (2006). Sản xuất các chế phẩm kỹ thuật và y dược từ phế liệu thủy sản. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Thành phố Hồ Chí Minh. 121 trang.

38. VASEP, 2019. Gia An (Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận): Hướng đến nuôi cá thát lát công nghiệp, ngày truy cập 13/01/2020. Địa chỉ: http://vasep.com.vn/Tin-Tuc/1218_55045/Gia-An-Tanh-Linh-tinh-Binh-Thuan-Huong-den-nuoi-ca-that-lat-cong-nghiep.htm.

39. Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L. and Hu, Q. (2008). Isolation and characterisation of

collagen from the skin, scale and bone of deep – Sea redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chemistry*. 108(2): 616–623.

40. Wang, L., Yang, B. and Du, X. (2009). Extraction of acid – soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Journal of Food Process Engineering*. 32(5): 743–751.

41. Yoshimura, K., Terashima, M., Hozan, D. and Shirai, K. (2000). Preparation and dynamic viscoelasticity characterization of alkali-solubilized collagen from shark skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(3): 685–690.

THE EFFECT OF TREATMENT METHOD ON THE PROPERTIES OF COLLAGEN FROM CLOWN KNIFEFISH (*Chitala ornata*) SKIN

Le Thị Minh Thuy¹, Trương Thị Mong Thu²

¹College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University

Email: ltmthuy@ctu.edu.vn

Summary

The efficiency to remove the non-collagenous protein, fat content and freezing-dry mode on the properties of collagen from clown knifefish skin was investigated. The results showed that fish skin was soaked in 0.1 M NaOH for 4 hours and 0.5 M CH₃COOH for 60 minutes, had the best ability to remove the non-collagenous protein and fat contents (13.9% and 64.5%, respectively). After pretreatment, clown knifefish skin was extracted in 0.5 M CH₃COOH for 3 days at 4 ± 1°C, collagen extracts were precipitated with 2.5 M NaCl. The collagen precipitate were filtered, dissolved in 0.5 M CH₃COOH and dialyzed in 0.1 M CH₃COOH and distilled water, respectively. Then, sample was lyophilized for 48 hours to collect sample with recovery yield and moisture were 13.8% and 11.7%, respectively and the maximum solubility at pH 2 and NaCl 0.2 M. Amino acid composition of clown knifefish skin collagen was similar to type I collagen from another skin. The results from this study showed that could be utilize clown knifefish skin as a material source for collagen production.

Keywords: Amino acid, clown knifefish skin, collagen, freezing-dry, solubility.

Người phản biện: PGS.TS. Trần Như Khuyến

Ngày nhận bài: 30/12/2019

Ngày thông qua phản biện: 31/01/2020

Ngày duyệt đăng: 7/02/2020