

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.185

## NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN TIỀN XỬ LÝ VÀ CHIẾT TÁCH COLLAGEN TỪ DA CÁ LÓC (*Channa striata*) BẰNG PEPSIN

Trương Thị Mộng Thu<sup>1,2\*</sup>, Nguyễn Đỗ Quỳnh<sup>2</sup>, Trần Thanh Trúc<sup>3</sup> và Lê Thị Minh Thùy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Nghiên cứu sinh ngành Công nghệ Thực phẩm Khóa 2020, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup>Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trương Thị Mộng Thu (email: tmthu@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/06/2021

Ngày nhận bài sửa: 19/07/2021

Ngày duyệt đăng: 25/12/2021

### Title:

The study of the pre-treatment and collagen extraction conditions from snakehead fish (*Channa striata*) skin by using pepsin

### Từ khóa:

Amino acid, collagen, da cá lóc, pepsin, phổ FTIR, tiền xử lý

### Keywords:

Amino acid, collagen, FTIR spectral, pepsin, pre-treatment, snakehead fish skin

### ABSTRACT

The study on the pre-treatment and collagen extraction conditions from snakehead fish skin by using pepsin was performed. The results showed that treating snakehead fish skin with 10% butyl alcohol solution for 72 hours gave the lowest lipid content of 15.3%. Extracting samples with 0.45% pepsin for 24 hours gave the highest yield of 13.7% and maximum solubility at pH 1 - 4 and NaCl concentration from 0.2 - 0.6 M. As mentioned above, FTIR spectral analysis demonstrated that a close relationship between the number of wavelengths in the amide I and amide III regions, especially the stability of the triple helix structure, so that the obtained collagen from snakehead fish skin had the full functional group of type I collagen. Collagen had bright color with L\* value of 62.4 and imino acid content was 204 (residue/1000 total amino acid residues). Results showed that pepsin can be used to replace chemicals to reduce the amount of chemicals released into the environment, taking advantage of snakehead fish skin as a raw material for collagen production.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu điều kiện tiền xử lý và chiết tách collagen từ da cá lóc bằng pepsin đã được thực hiện. Kết quả cho thấy da cá lóc được xử lý với 10% butyl alcohol trong 72 giờ thì hàm lượng lipid còn lại thấp nhất là 15,3%. Collagen từ da cá lóc được chiết tách với 0,45% pepsin trong 24 giờ cho hiệu suất thu hồi 13,7% và độ hòa tan cực đại ở pH 1 - 4 và nồng độ NaCl từ 0,2 - 0,6 M. Bên cạnh đó, phổ FTIR cho thấy mối quan hệ chặt chẽ giữa số bước sóng trong vùng amide I và vùng amide III đặc biệt là sự ổn định của cấu trúc xoắn ba, cho thấy collagen từ da cá lóc có đầy đủ nhóm chức năng của collagen loại I. Collagen có màu sáng với giá trị L\* là 62,4 và hàm lượng imino acid là 204 (đơn vị/1000 đơn vị). Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể sử dụng pepsin để thay thế hoá chất nhằm giảm thiểu lượng hoá chất thải ra môi trường, tận dụng da cá lóc như nguồn nguyên liệu để sản xuất collagen.

### 1. GIỚI THIỆU

Cá lóc (*Channa striata*) là loài cá nước ngọt có chất lượng thịt ngon, giá trị dinh dưỡng cao nên

được nhiều người tiêu dùng ưa chuộng (Trần Minh Phú và ctv., 2018). Do đó, sản phẩm làm từ cá lóc cũng ngày càng phát triển như khô, mắm, lạp xưởng,

chà bông cá lóc,... Tuy nhiên, quá trình chế biến cá sẽ có một lượng phụ phẩm loại ra gồm đầu, xương, da, vây, vây, nội tạng,... Trong đó, da cá chiếm khoảng 17 - 20% (Kittiphattanabawon et al., 2015). Đây là nguồn nguyên liệu dồi dào để nghiên cứu và sản xuất collagen.

Collagen là một loại protein cấu trúc, chiếm phần lớn trong mô thịt và mô liên kết của cơ thể người và động vật có vú. Collagen có nhiều trong cấu trúc sợi của da, xương, vây và các bộ phận khác của động vật trên cạn (Duan et al., 2009). Nguồn sản xuất collagen chủ yếu từ xương bò và da heo. Tuy nhiên, những lo ngại liên quan đến bò và lợn như nguy cơ truyền bệnh, tính ngưỡng tôn giáo đã ảnh hưởng phần nào đến việc sản xuất collagen có nguồn gốc từ động vật có vú. Do đó, việc tìm nguồn nguyên liệu mới để tạo sản phẩm collagen an toàn và nguy cơ truyền bệnh thấp là cần thiết, trong đó phụ phẩm từ quá trình chế biến thủy sản có thể đáp ứng tất cả điều này điển hình là da cá. Nguồn collagen trong da cá có thể thay thế collagen động vật trên cạn. Tuy nhiên, để có thể chiết được collagen với chất lượng cao phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố trong đó có bước tiền xử lý như loại lipid nhằm hạn chế sự oxi hoá chất béo. Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng các dung môi hữu cơ như butyl alcohol (Hadfi & Sarbon, 2019; He et al., 2019; Karami et al., 2019; Nurilmala et al., 2019), butanol (Nurubhasha et al., 2019), isopropyl alcohol (Xu et al., 2017) để khử lipid của nguyên liệu trong quá trình chiết tách collagen. Hơn nữa, công đoạn quyết định đến chất lượng collagen là công đoạn tách chiết. Đã có một vài nghiên cứu sử dụng acetic acid để tách chiết collagen từ nhiều nguyên liệu khác nhau như Trần Thị Huyền và Nguyễn Anh Tuấn (2012) đã tách chiết collagen từ da cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) với acetic acid. Cùng một hoá chất acetic acid, Jongjareonrak et al. (2005) đã tiến hành chiết tách collagen trên da cá hường (*Lutjanus vitta*). Lê Thị Thu Hương và ctv. (2017) cũng đã tách chiết collagen từ da cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) với phương pháp kết hợp pepsin và acetic acid. Những vấn đề trên cho thấy việc nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp tiền xử lý và điều kiện chiết rút collagen ở trong và ngoài nước đang được quan tâm. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu về quy trình sản xuất collagen từ da cá lóc bằng pepsin. Chính vì thế, nghiên cứu điều kiện tiền xử lý và chiết tách collagen từ da cá lóc bằng pepsin đã được thực hiện, nhằm tìm được nồng độ và thời gian xử lý da cá lóc trong butyl alcohol để loại lipid tốt nhất. Đồng thời, tìm được nồng độ và thời gian ngâm pepsin để

chiết tách collagen từ da cá lóc đạt chất lượng tốt và hiệu suất thu hồi collagen cao.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Da cá lóc được mua tại Cơ sở khô cá lóc 7 Chóp (Thoại sơn, An Giang), sau khi thu gom được làm đông ở nhiệt độ  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$  và đông thùng chuyển về phòng thí nghiệm Bộ môn Chế biến Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ không quá 6 giờ.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Cách chuẩn bị mẫu

Da cá được loại bỏ thịt, vây còn sót lại và rửa sạch để ráo, sau đó được cắt nhỏ với kích thước 2 cm x 1 cm và cho vào túi PE (500 g/túi), bảo quản trong tủ đông ở nhiệt độ  $-20^\circ \pm 2^\circ\text{C}$  cho đến khi tiến hành thí nghiệm.

#### 2.2.2. Xác định thành phần hóa học của nguyên liệu ban đầu

Da cá sau khi xử lý theo mục 2.2.1 được xay nhuyễn và tiến hành phân tích thành phần hóa học như độ ẩm, protein, lipid và khoáng.

#### 2.2.3. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch butyl alcohol đến khả năng loại lipid từ da cá lóc

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí 1 nhân tố (nồng độ butyl alcohol), 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, khối lượng mỗi mẫu là 20 g da cá/mẫu. Da cá được xử lý như mục 2.2.1, sau khi rã đông qua đêm ở  $0-4^\circ\text{C}$  và ngâm trong dung dịch butyl alcohol trong 48 giờ ở nhiệt độ  $0-4^\circ\text{C}$ , cố định tỷ lệ da cá/dung dịch butyl alcohol (w/v) là 1:10 theo nghiên cứu của Hadfi & Sarbon (2019) với nồng độ butyl alcohol thay đổi lần lượt là 8%, 10%, 12%. Da cá được xử lý như mục 2.2.1 và phân tích hàm lượng lipid (mẫu đối chứng). Sau khi ngâm, mẫu được tiến hành rửa bằng nước đến khi pH đạt trung tính, phơi ráo và đem đi phân tích hàm lượng lipid còn lại trong da cá, từ đó chọn nồng độ butyl alcohol thích hợp nhất.

#### 2.2.4. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của thời gian ngâm dung dịch butyl alcohol đến khả năng loại lipid từ da cá lóc

Bố trí thí nghiệm: Nồng độ butyl alcohol phù hợp được chọn từ thí nghiệm 1, tiến hành thí nghiệm 2. Thí nghiệm được bố trí 1 nhân tố (thời gian ngâm trong butyl alcohol), 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, tổng số mẫu thí nghiệm là 12, khối lượng mỗi mẫu là 20 g da cá/mẫu. Da cá được tiến hành ngâm trong

dung dịch butyl alcohol với các thông số cố định như thí nghiệm 1 ở các mốc thời gian thay đổi lần lượt là 24, 48 và 72 giờ. Da cá được xử lý như mục 2.2.1 và phân tích hàm lượng lipid (mẫu đối chứng). Sau khi ngâm, mẫu được rửa bằng nước đến khi đạt pH trung tính, phơi ráo và tiến hành phân tích hàm lượng lipid còn lại trong da cá, từ đó chọn thời gian ngâm butyl alcohol thích hợp nhất.

*2.2.5. Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ pepsin đến khả năng chiết tách collagen từ da cá lóc*

Bố trí thí nghiệm: Chọn nồng độ và thời gian ngâm da cá trong butyl alcohol từ thí nghiệm 1 và 2, tiến hành thí nghiệm 3. Thí nghiệm được bố trí 1 nhân tố (nồng độ pepsin), 3 nghiệm thức, 3 lần lặp lại và tổng số mẫu thí nghiệm là 9. Khối lượng mẫu là 20 g da cá/mẫu. Sau khi ngâm butyl alcohol, da cá tiếp tục xử lý qua NaOH nồng độ 0,09 M trong 3 giờ ở nhiệt độ 0-4°C với tỷ lệ da cá/dung dịch w/v là 1:8 để loại các hợp chất protein phi collagen theo nghiên cứu của Thuy et al. (2014). Collagen được chiết tách trong dung dịch pepsin được pha trong dung dịch đệm 0,6 M acetic acid với nồng độ pepsin thay đổi lần lượt là 0,25%, 0,45% và 0,65% trong thời gian là 24 giờ, cố định tỷ lệ da cá/dung dịch pepsin (w/v) là 1:10 và nhiệt độ là 0-4°C theo nghiên cứu của Lê Thị Thu Hương và ctv. (2017).

Mẫu sau khi ngâm pepsin được lọc lấy dịch lọc, dịch lọc được ly tâm với tốc độ 8000 vòng/phút trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. pH được điều chỉnh bằng cách thêm Tris (hydroxymethane aminimethane) đến khi pH đạt từ 6,8 - 7,2. Kết tủa được tạo bằng cách thêm NaCl 2,5 M, sau đó thu kết tủa bằng cách ly tâm với tốc độ 8000 vòng/phút trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Kết tủa được hòa tan với acetic acid 0,5 M, thẩm tách trong acetic acid 0,1 M và nước cất theo nghiên cứu của Thuy et al. (2014), sau đó đem đi sấy lạnh chân không để thu collagen. Mẫu collagen thu được sau khi sấy được đo màu sắc (L\*, a\*, b\*), độ hòa tan của collagen ở các pH và NaCl khác nhau, tính hiệu suất thu hồi; từ đó chọn ra nồng độ pepsin thích hợp nhất.

*2.2.6. Thí nghiệm 4: Nghiên cứu ảnh hưởng thời gian ngâm dung dịch pepsin đến khả năng chiết tách collagen từ da cá lóc*

Bố trí thí nghiệm: chọn nồng độ pepsin thích hợp từ thí nghiệm 3, tiến hành thí nghiệm 4. Thí nghiệm được bố trí 1 nhân tố (thời gian chiết tách), 3 nghiệm thức, 3 lần lặp lại và tổng số mẫu thí nghiệm là 9. Khối lượng mỗi mẫu là 20 g da cá/mẫu. Da cá được ngâm butyl alcohol và NaOH như thí nghiệm 3, sau đó ngâm trong dung dịch pepsin với mốc thời gian

thay đổi lần lượt là 12, 24 và 36 giờ, cố định tỷ lệ da cá/dung dịch (w/v) là 1:10 và nhiệt độ là 0-4°C. Mẫu sau khi ngâm được thực hiện như các bước tiếp theo thí nghiệm 3 thu được collagen. Đo màu sắc (L\*, a\*, b\*), độ hòa tan của collagen ở các pH và NaCl khác nhau, tính hiệu suất thu hồi; từ đó chọn ra thời gian ngâm dung dịch pepsin thích hợp nhất.

Mẫu collagen tối ưu từ thí nghiệm 4 được phân tích thành phần amino acid và phổ FTIR.

**2.3. Phương pháp phân tích**

Thành phần hóa học như độ ẩm, protein, lipid và khoáng được xác định theo AOAC (2000). Màu sắc (L\*, a\*, b\*) được đo bằng thiết bị Colorimeter PCE-CSM 2 (Trung Quốc).

Hiệu suất thu hồi collagen (H - %) được xác định bằng phương pháp kiểm tra khối lượng,  $H = \frac{y}{x} \times 100$  với x (g) là khối lượng của da cá sau khi xử lý và y (g) là khối lượng collagen thành phẩm.

Độ hòa tan (%) của collagen ở các pH khác nhau: 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 ly tâm với tốc độ 8.000 vòng trong 20 phút ở 4°C thu được phần dịch lỏng theo phương pháp của Thuy et al. (2014). Hàm lượng protein hòa tan trong dịch lỏng được xác định theo phương pháp Lowry et al. (1951), sử dụng huyết thanh bò (BSA) xây dựng đường chuẩn ở bước sóng 750 nm. Độ hòa tan được tính theo công thức:

$$\text{Độ hòa tan (\%)} = 100 - \left( \frac{C_0 - C_M}{C_0} \times 100 \right)$$

Trong đó: C<sub>0</sub> là nồng độ protein hòa tan trong mẫu đối chứng (mg/mL)

C<sub>M</sub> là nồng độ protein hòa tan trong mẫu (mg/mL)

Độ hòa tan (%) của collagen ở các nồng độ muối NaCl từ 0,2 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 acetic acid 0,1 M. Hỗn hợp collagen được đem đi ly tâm với tốc độ 8.000 vòng trong 20 phút ở 4°C thu được phần dịch lỏng theo phương pháp của Thuy et al. (2014). Hàm lượng protein hòa tan trong dịch lỏng được xác định theo phương pháp Lowry et al. (1951), sử dụng huyết thanh bò (BSA) xây dựng đường chuẩn ở bước sóng 750 nm.

Quang phổ hồng ngoại (phổ FTIR) được xác định theo phương pháp của Thuy et al. (2014). Quang phổ ghi nhận lại từ máy quang phổ ALPHA FT-IR của Bruker Optics trong phạm vi bước sóng từ 4.000 đến 500  $\text{cm}^{-1}$ .

Thành phần amino acid của collagen được xác định theo phương pháp của Thuy 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 amino acid bằng hệ thống HPLC.

**2.4. Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu thu thập được tính trung bình, độ lệch chuẩn sử dụng chương trình Microsoft Excel 2010. Kết quả được tính toán thống kê, phương pháp phân tích phương sai ANOVA theo kiểm định Duncan để kết luận về sự khác biệt giữa trung bình các nghiệm thức với độ tin cậy 95% bằng phần mềm SPSS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Thành phần hoá học của da cá lóc**

Xác định thành phần hoá học của nguyên liệu ban đầu giúp lựa chọn phương pháp tiền xử lý phù hợp và hiệu quả nhằm sản xuất collagen thành phẩm đạt chất lượng tốt (Nurilmala et al., 2017). Kết quả nghiên cứu thành phần hoá học của da cá lóc bao gồm độ ẩm, protein, lipid và khoáng được trình bày ở Bảng 1.

Kết quả phân tích trên Bảng 1 cho thấy hàm lượng protein trong da cá lóc rất cao lên đến 71,7%. Đây là cơ sở để thu hồi collagen với hiệu suất cao. Tuy nhiên, da cá lóc cũng tồn tại một lượng lipid nhất định là 27,9%. Ngoài việc loại protein phi collagen thì cũng cần loại lipid trong nguyên liệu để thu thành phẩm collagen với chất lượng tốt (Nurilmala et al., 2017).

**Bảng 1. Thành phần hóa học của da cá lóc (tính theo % khối lượng khô)**

Thành phần hóa học	Hàm lượng (%)
Độ ẩm	57,7 ± 1,54
Protein	71,7 ± 0,02
Lipid	27,9 ± 0,32
Khoáng	0,40 ± 0,07

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

**3.2. Ảnh hưởng nồng độ butyl alcohol đến khả năng loại lipid từ da cá lóc**

Hàm lượng lipid còn lại của da cá lóc theo nồng độ butyl alcohol khác nhau được thể hiện trong Bảng 2.

**Bảng 2. Hàm lượng lipid còn lại trong da cá theo nồng độ butyl alcohol khác nhau**

Nồng độ butyl alcohol (%)	Hàm lượng lipid (%)
Mẫu đối chứng	27,9 ± 0,32 <sup>c</sup>
8%	24,1 ± 0,87 <sup>b</sup>
10%	20,5 ± 0,31 <sup>a</sup>
12%	19,7 ± 0,47 <sup>a</sup>

(Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%, số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn với n = 3)

Hàm lượng lipid của da cá lóc thể hiện trong Bảng 2 cho thấy lipid có khuynh hướng giảm khi tăng nồng độ butyl alcohol từ 8% lên 12%. Khi tăng nồng độ butyl alcohol từ 8% lên 10%, lượng lipid giảm mạnh và khác biệt có ý nghĩa thống kê từ 24,1% xuống 20,5%. Nguyên nhân là do butyl alcohol là dung môi có moment phân cực lớn 1,64 D có khả năng hòa tan tốt đối với các hợp chất phân cực như lipid. Lipid được hòa tan vào dung môi một cách nhanh chóng vì khi đó sự chênh lệch nồng độ lipid giữa nguyên liệu và dung môi lớn. Do đó, hàm lượng lipid còn lại trong da cá giảm khi nồng độ butyl alcohol tăng (Sae-leaw et al., 2016). Tuy nhiên, hàm lượng lipid giảm rất ít và không khác biệt từ 20,5% xuống 19,7% khi tăng từ 10% tăng lên 12% butyl alcohol. Lipid hòa tan trong dung môi đến một giới hạn nhất định thì tốc độ hòa tan chậm lại. Vì vậy, hàm lượng lipid thay đổi không đáng kể khi tiếp tục tăng nồng độ butyl alcohol (Sae-leaw et al., 2016). Nhằm loại lipid có trong da cá lóc hiệu quả và cũng hạn chế lượng hoá chất sử dụng trong quá trình tiền xử lý thì chế độ khử lipid thích hợp nhất với nồng độ butyl alcohol là 10%. Từ kết quả trên cho thấy dùng butyl alcohol để loại lipid trên da cá lóc với nồng độ 10% tương tự trên các đối tượng khác như da cá trắm đen (Jia et al., 2012), da cá tra (Hadfi & Sarbon, 2019), da cá ngừ (Nurilmala et al., 2017).

**3.3. Ảnh hưởng thời gian ngâm butyl alcohol đến khả năng loại lipid từ da cá lóc**

Bên cạnh nồng độ butyl alcohol thì thời gian ngâm cũng chiếm vai trò quan trọng trong việc xử lý loại lipid trong nguyên liệu. Hàm lượng lipid còn

lại của da cá lóc sau khi ngâm butyl alcohol qua các mốc thời gian khác nhau được thể hiện ở Bảng 3.

**Bảng 3. Hàm lượng lipid còn lại trong da cá lóc theo thời gian ngâm butyl alcohol**

Thời gian ngâm (giờ)	Hàm lượng lipid (%)
Mẫu đối chứng	27,9 ± 0,32 <sup>c</sup>
24	19,0 ± 2,02 <sup>b</sup>
48	20,2 ± 1,48 <sup>b</sup>
72	15,3 ± 2,04 <sup>a</sup>

(Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%, số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn với n = 3)

Bảng 3 cho thấy khi thời gian xử lý butyl alcohol tăng lên thì lượng lipid bắt đầu giảm dần. Khi tăng thời gian từ 24 giờ đến 48 giờ thì hàm lượng lipid giảm không đáng kể, nhưng khi tăng lên 72 giờ thì bắt đầu giảm mạnh từ 20,2% còn 15,3%. Thời gian ngâm ảnh hưởng tới hiệu quả của quá trình loại lipid theo tỷ lệ thuận (Nguyễn Thị Hoàng Lan và ctv., 2016). Thời gian ngâm butyl alcohol trong nghiên cứu này là 72 giờ dài hơn các nghiên cứu trước đây của Zhang et al. (2012) và Jia et al. (2012) đã dùng

**Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ pepsin đến H% và màu sắc collagen từ da cá lóc**

Nồng độ (%)	L*	a*	b*	H%
0,25%	55,5 ± 0,77 <sup>a</sup>	5,07 ± 0,22 <sup>b</sup>	11,5 ± 0,53 <sup>b</sup>	13,2 ± 0,25 <sup>b</sup>
0,45%	57,6 ± 0,27 <sup>b</sup>	4,24 ± 0,24 <sup>b</sup>	9,2 ± 1,55 <sup>b</sup>	14,7 ± 0,31 <sup>c</sup>
0,65%	63,7 ± 0,24 <sup>c</sup>	2,02 ± 0,68 <sup>a</sup>	5,59 ± 1,57 <sup>a</sup>	11,7 ± 0,50 <sup>a</sup>

(Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%, số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn với n = 3)

Kết quả Bảng 4 cho thấy khi tăng nồng độ pepsin từ 0,25% lên 0,45% thì hiệu suất thu hồi collagen cũng tăng theo từ 13,2% lên 14,7%. Theo Skierka and Sadowska (2007), pepsin không những tác động lên hai đầu không xoắn (đầu telopeptide) của sợi collagen làm cho collagen dễ dàng tách ra khỏi da cá mà còn có tác dụng phân giải các protein khác có trong da cá. Vì vậy, khi tăng nồng độ pepsin thì hiệu suất thu hồi collagen tăng theo. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ enzyme lên từ 0,45% lên 0,65% thì hiệu suất thu hồi lại giảm từ 14,7% còn 11,7%. Nguyên nhân có thể là do tăng nồng độ enzyme quá cao sẽ thúc đẩy mạnh việc phân cắt mạch mạnh mẽ, ảnh hưởng đến cấu trúc xoắn bộ ba của collagen, dẫn đến hiệu suất thu hồi giảm. Hiệu suất thu hồi collagen ở nghiên cứu này cao hơn với các nghiên cứu trước đây của Thuy et al. (2014) khi xử lý vây và da cá bằng phương pháp acetic acid thì hiệu suất thu hồi ở cá thu Nhật là 1,5%, cá đối xám là 0,43% và cá thu Việt Nam là 0,64%. Đồng thời, kết quả này cao hơn

dùng dịch butyl alcohol 10% trong 24 giờ để xử lý loại lipid trong da cá chép và cá trắm đen. Theo Nguyễn Thị Hoàng Lan và ctv. (2016), mỗi loại nguyên liệu với hàm lượng lipid, cấu trúc nguyên liệu khác nhau cần có thời gian trích ly khác nhau. Vì vậy, để đảm bảo loại lipid ra khỏi da cá lóc đạt kết quả tốt nhất, mốc thời gian xử lý 72 giờ là thích hợp nhất.

**3.4. Kết quả ảnh hưởng nồng độ pepsin đến hiệu suất thu hồi, độ hòa tan và màu sắc của collagen từ da cá lóc**

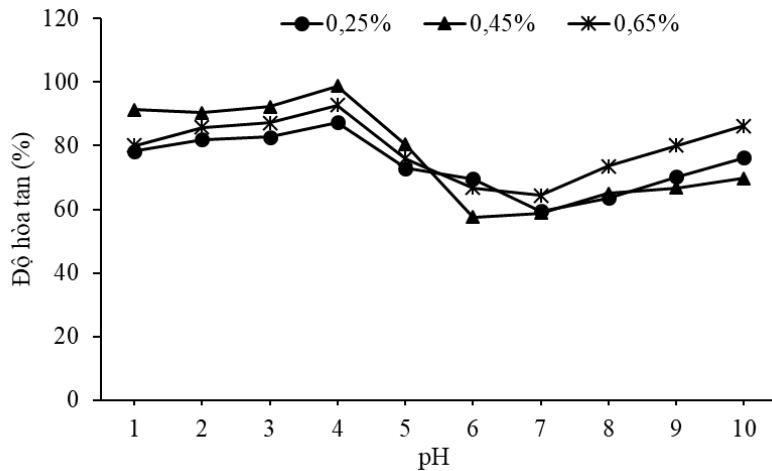
**3.4.1. Hiệu suất thu hồi và màu sắc của collagen theo nồng độ pepsin**

Trong nghiên cứu trích ly collagen, việc sử dụng dung dịch acetic acid với sự hỗ trợ của pepsin nhằm nâng cao hiệu suất trích ly collagen đã được nhiều nhà khoa học thực hiện (Lê Thị Thu Hương và ctv., 2017). Chính vì vậy, khi trích ly collagen bằng pepsin trong dung dịch đệm 0,6 M acetic acid được thực hiện. Hiệu suất thu hồi (H %) và màu sắc collagen theo nồng độ pepsin khác nhau được thể hiện trong Bảng 4.

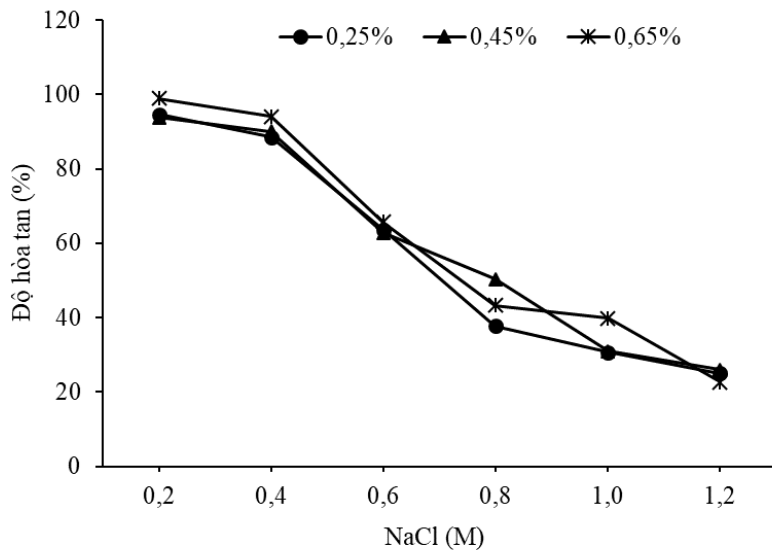
so với nghiên cứu của Lê Thị Minh Thủy và Trương Thị Mộng Thu (2020) khi sử dụng acetic acid 0,5 M trong 3 ngày để chiết rút collagen từ da cá thát lát còm cho hiệu suất thu hồi là 13,8%. Như vậy, có thể thấy tùy vào loại nguyên liệu và điều kiện tách chiết mà hiệu suất thu hồi là khác nhau. Bên cạnh hiệu suất thu hồi thì màu sắc của collagen cũng ảnh hưởng rất lớn đến tính ứng dụng của nó, đặc biệt là ứng dụng trong lĩnh vực y học. Khi tăng nồng độ enzyme lên từ 0,25% đến 0,65% thì độ sáng (L\*) cũng tăng dần từ 55,5 lên 63,7. Nguyên nhân có thể do trong quá trình chiết tách khi tăng nồng độ pepsin có thể loại một phần sắc tố trong nguyên liệu.

**3.4.2. Độ hòa tan của collagen từ da cá lóc theo nồng độ pepsin**

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



**Hình 1. Độ hòa tan của collagen từ da cá lóc theo nồng độ pepsin**



**Hình 2. Độ hòa tan của collagen từ da cá lóc theo nồng độ pepsin ở các nồng độ muối NaCl khác nhau từ 0,2 M đến 1,2 M**

Sự thay đổi độ hòa tan của collagen ở các pH (1 - 10) được thể hiện qua Hình 1. Kết quả cho thấy collagen từ da cá lóc có xu hướng hòa tan cao trong phạm vi pH có tính acid (1 - 4). Điều này được giải thích bởi khả năng hòa tan của collagen phụ thuộc vào pH của dung dịch, pH càng giảm hoặc nồng độ acid càng tăng thì độ hòa tan của collagen càng tăng (Lê Phan Thùy Hạnh & Trần Quyết Thắng, 2017). Tuy nhiên, độ hòa tan của collagen giảm đáng kể trong pH (5 - 8). Điều này chứng tỏ trong phạm vi này độ pH của collagen đạt tới điểm đẳng điện (pI), protein bị kết tủa và làm giảm độ hòa tan của collagen xuống mức rất thấp (Damodaran,

1996). 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 xu hướng tăng nhẹ ở pH 9 - 10 có lẽ là do lực đẩy giữa các chuỗi vì pH cao hơn so với pI (Muyonga et al., 2004).

Mẫu collagen từ da cá lóc có độ hòa tan trong các nồng độ NaCl từ 0,2 - 1,2 M được thể hiện trong Hình 2. Có thể thấy độ hòa tan cao ở các nồng độ muối từ 0,2 đến 0,6 M. Điều này chứng tỏ rằng, 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 dẫn đến độ hòa tan cao (Singh et al., 2011). Tuy nhiên, khi nồng độ NaCl tăng từ 0,6 M đến 1,2 M thì độ hòa tan có xu hướng giảm. Nguyên nhân là do 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). Kết quả nghiên cứu này tương đồng với một số nghiên cứu về collagen đạt độ hòa tan trong vùng nồng độ NaCl nhỏ hơn 0,6 M như collagen được chiết rút từ da cá nóc trong nghiên cứu của Huang et al. (2011) và độ hòa tan của collagen từ da cá hồng nâu trong nghiên cứu của Jongjareonrak et al. (2005).

Như vậy, từ kết quả phân tích hiệu suất thu hồi, màu sắc, độ hòa tan cho thấy rằng hiệu suất thu hồi collagen cao nhất và collagen có màu sắc và độ hòa tan tốt khi sử dụng 0,45% pepsin để chiết tách collagen.

**3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng thời gian chiết tách bằng pepsin đến hiệu suất thu hồi, độ hòa tan và màu sắc của collagen từ da cá lóc**

**3.5.1. Hiệu suất thu hồi và màu sắc theo thời gian ngâm pepsin**

Hiệu suất thu hồi và màu sắc của collagen từ da cá lóc theo thời gian chiết tách bằng pepsin được thể hiện ở Bảng 5.

**Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian chiết tách trong pepsin đến H% và màu sắc của collagen từ da cá lóc**

Thời gian (giờ)	L*	a*	b*	H%
12	55,0 ± 2,59 <sup>a</sup>	4,65 ± 0,41 <sup>b</sup>	10,0 ± 0,45 <sup>c</sup>	6,80 ± 0,28 <sup>a</sup>
24	62,4 ± 3,42 <sup>b</sup>	3,21 ± 0,87 <sup>a</sup>	6,31 ± 0,25 <sup>a</sup>	13,7 ± 0,27 <sup>c</sup>
36	49,7 ± 2,84 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,25 <sup>a</sup>	7,95 ± 0,37 <sup>b</sup>	7,80 ± 0,50 <sup>b</sup>

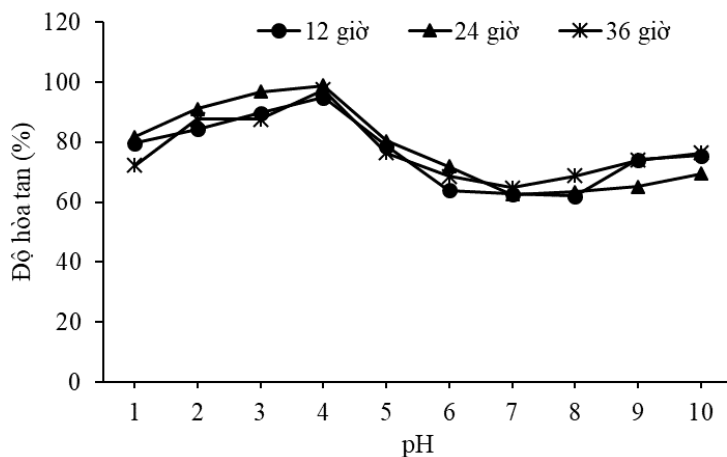
(Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%, số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn với n = 3)

Kết quả Bảng 5 cho thấy khi thay đổi thời gian chiết tách thì hiệu suất thu hồi cũng ảnh hưởng đáng kể. Hiệu suất thu hồi tăng từ 6,80% lên 13,7% khi thời gian tăng từ mốc 12 giờ đến 24 giờ. Thời gian phản ứng phải đảm bảo để pepsin có thể tác động lên hai đầu telopeptide của sợi collagen làm cho collagen dễ dàng tách ra. Thời gian tác động kéo dài thì enzyme có điều kiện phản ứng triệt để, vì vậy hiệu suất thu hồi tăng (Skierka & Sadowska, 2007). Tuy nhiên, khi tăng từ 24 giờ lên 36 giờ thì hiệu suất lại giảm còn 7,8%. Nguyên nhân có thể là do kéo dài thời gian thì enzyme có điều kiện phân cắt mạch mạnh mẽ, ảnh hưởng đến cấu trúc xoắn bộ ba của collagen, dẫn đến hiệu suất thu hồi giảm. Khi tăng

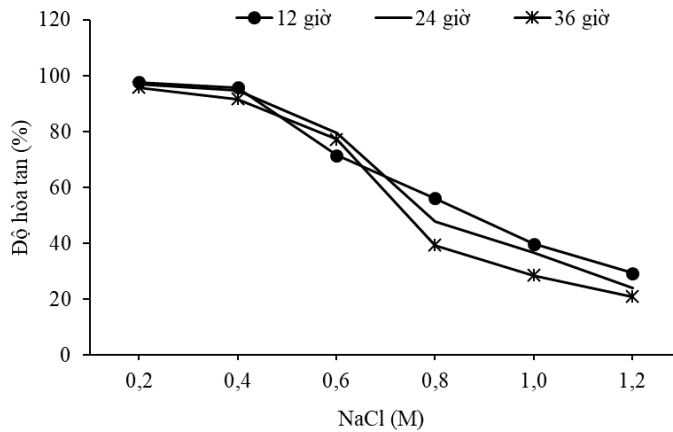
thời gian chiết tách từ 12 giờ đến 24 giờ thì giá trị L\* có phần tăng đáng kể từ 55,0 đến 62,4. Tuy nhiên, khi tăng thời gian lên 36 giờ thì giá trị L\* lại giảm rất đáng kể còn 49,7. Nguyên nhân một phần là do thời gian xử lý kéo dài sẽ cắt mạch và sinh ra lượng lớn các amino acid tự do đồng thời kết hợp với các nhóm đường khử và carbohydrate trong nguyên liệu dẫn đến thúc đẩy phản ứng hoá nâu (maillard).

**3.5.2. Độ hòa tan của collagen từ da cá lóc**

Độ hòa tan của collagen ở các pH từ 1 đến 10 và các nồng độ NaCl từ 0,2 đến 1,2 M được thể hiện trong Hình 3 và Hình 4.



**Hình 3. Độ hòa tan của collagen từ da cá lóc theo thời gian ngâm pepsin ở pH từ 1 đến 10**



**Hình 4. Độ hòa tan của collagen từ da cá lóc theo thời gian ngâm pepsin ở các nồng độ muối NaCl khác nhau từ 0,2 M đến 1,2 M**

Sự thay đổi độ hòa tan của collagen ở các pH (1 - 10) được thể hiện qua Hình 3. Kết quả trên cho thấy pH từ 1 đến 4 có độ hòa tan cao nằm trong khoảng 70% đến 100%, tuy nhiên pH từ 5 đến 8 thì độ hòa tan của collagen có xu hướng giảm. Điều này cho thấy sự hòa tan của collagen phụ thuộc vào môi trường acid, ở môi trường kiềm collagen có độ hòa tan thấp hơn acid. Độ tan của collagen thấp nhất ở pH = pI của nó (pH đẳng điện của collagen (pH = 5-7), độ tan của collagen tăng lên khi pH nằm xa vì khi pH = pI thì phân tử collagen không tích điện nên chúng không có lực đẩy tĩnh điện và dễ bị đông kết. Khi pH khác pI thì các phân tử collagen tích điện cùng dấu và đẩy nhau cho nên không bị đông kết, do đó độ tan tăng lên (Lê Thị Thu Hương và ctv., 2017).

Mẫu collagen từ da cá lóc có độ hòa tan trong các nồng độ NaCl từ 0,2 đến 1,2 M được thể hiện trong Hình 4. Có thể thấy độ hòa tan giảm dần khi tăng nồng độ NaCl. Theo nhận định của Singh et al. (2011) ở nồng độ NaCl thấp thì độ hòa tan càng cao do các ion trong muối liên kết yếu với các nhóm tích điện trên bề mặt protein và không tác động với các lớp hydrat hóa. Tuy nhiên, khi nồng độ NaCl lớn hơn 0,6 M thì độ hòa tan của collagen giảm dần. Điều này phù hợp với quy luật lý thuyết vì trong dung dịch, các gốc kỵ nước của phân tử protein tập trung trên bề mặt, tiếp xúc trực tiếp với các phân tử nước. Các phân tử nước này ngăn cản quá trình hình thành liên kết giữa các phân tử protein để tạo kết tủa. Khi nồng độ dung dịch muối tăng, các phân tử muối bị solvate hóa làm giảm số phân tử nước xung quanh bề mặt các phân tử protein tạo điều kiện cho các bề mặt kỵ nước tiến đến gần nhau và kết tủa (Lê Phan Thùy Hạnh & Trần Quyết Thắng, 2017).

Như vậy, kết quả xác định hiệu suất thu hồi, màu sắc, độ hòa tan cho thấy rằng điều kiện tách chiết

trong pepsin trong thời gian 24 giờ cho hiệu suất thu hồi collagen cao nhất và có màu sắc và độ hòa tan tốt nên được chọn là thông số tối ưu cho quá trình chiết tách collagen từ da cá lóc bằng pepsin.

**3.6. Thành phần amino acid của collagen từ da cá lóc**

Kết quả thành phần amino acid được trình bày trong Bảng 6.

**Bảng 6. Thành phần amino acid của collagen chiết tách bằng pepsin từ da cá lóc**

STT	Thành phần amino acid	Hàm lượng (đơn vị/1.000 đơn vị)
1	Alanine	123
2	Arginine	57
3	Aspartic acid	40
4	Cystein	1
5	Glutamic acid	95
6	Glycine	336
7	Histidine	8
8	Hydroxyproline	83
9	Isoleucine	6
10	Leucine	17
11	Lysine	25
12	Methionine	22
13	Phenylalanine	15
14	Serine	40
15	Threonine	24
16	Tryptophan	0
17	Tyrosine	2
18	Valine	15
19	Proline	121
20	Imino acid *	204

Ghi chú : (\*) imino acid bao gồm hydroxyproline và proline. Kết quả được tính theo số amino acid/1.000 amino acid tổng số.

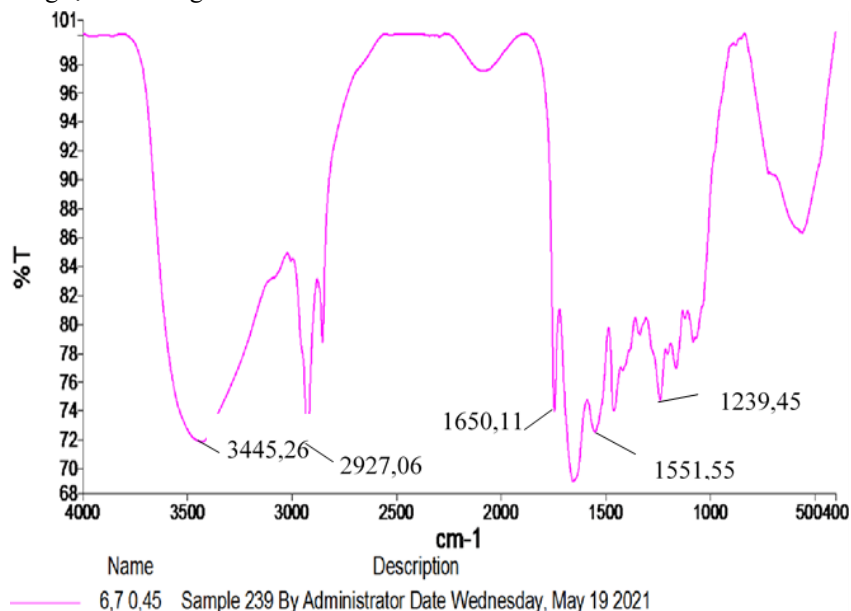


Thành phần amino acid của collagen từ da cá lóc tương đối giống với collagen loại I của các loại da khác. Nhìn chung, glycine chiếm phần lớn trong tổng số phần trăm amino acid. Và đặc điểm đặc trưng nhất của collagen là có hàm lượng glycine rất cao  $\geq 30\%$  (Ogawa et al., 2003). Kết quả Bảng 6 cho thấy glycine là amino acid được tìm thấy nhiều nhất trong collagen từ da cá lóc là 336 (đơn vị/1.000 đơn vị) chiếm 33,6% trong tổng số amino acid. Và glycine là amino acid cần thiết trong cấu trúc xoắn 3 của collagen (Regenstein & Zhou, 2007). Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu 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 lóc bao gồm các loại amino acid khác như proline, alanine, hydroxyproline và glutamic acid tương tự như collagen từ các loài khác

(Bae et al., 2008; Wang et al., 2008). Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu còn cho thấy không phát hiện tryptophan trong collagen từ da cá lóc. Hàm lượng các imino acid (proline và hydroxyproline) trong collagen có mối liên hệ chặt chẽ đến cấu trúc của collagen. Hàm lượng imino acid của collagen từ da cá lóc là 204 (đơn vị/1.000 đơn vị) cao hơn da cá chép là 190 (đơn vị/1.000 đơn vị) (Duan et al., 2009). Hàm lượng imino acid trong collagen càng nhiều thì cấu trúc xoắn của collagen càng ổn định.

### 3.7. Phổ FTIR (Fourier Transformation Infra Red)

Quang phổ hồng ngoại (phổ FTIR) giúp nhận diện các nhóm chức năng có trong phân tử collagen. Phổ FTIR của mẫu collagen từ da cá lóc được trình bày ở Hình 5.



Hình 5. Phổ FTIR của collagen từ da cá lóc

Mẫu collagen thu nhận được có phổ FTIR trong bước sóng tại vùng có amide A ( $3445,26\text{ cm}^{-1}$ ) Vùng amide A thể hiện sự hình thành liên kết hydro liên quan đến nhóm  $\text{-NH}$  trong liên kết peptide và được tìm thấy trong khoảng bước sóng  $3400 - 3440\text{ cm}^{-1}$  (Muyonga et al., 2004). Amide B ( $2927,06\text{ cm}^{-1}$ ), amide I ( $1650,11\text{ cm}^{-1}$ ) đóng vai trò quan trọng cho cấu trúc thứ cấp của protein với sự dao động kéo dài của nhóm carbonyl trong peptide ( $1600 - 1660\text{ cm}^{-1}$ ). Amide II ( $1551,55\text{ cm}^{-1}$ ) và Amide III ( $1239,45\text{ cm}^{-1}$ ) phát sinh dao động uốn cong của nhóm  $\text{-NH}$  và dao động kéo căng của liên kết  $\text{-CN}$  amide II dao động trong bước sóng từ khoảng  $1.500\text{ cm}^{-1}$  và amide 3 trong khoảng  $1320 - 1220\text{ cm}^{-1}$ . Theo Muyonga et al. (2004), bước sóng ở vùng amide III

có liên quan đến cấu trúc xoắn bậc 3 của mẫu collagen. Từ dữ liệu đã phân tích phổ FTIR, collagen từ da cá lóc có đầy đủ các nhóm chức năng của collagen loại I.

### 4. KẾT LUẬN

Da cá lóc được xử lý loại lipid bằng cách ngâm trong dung dịch butyl alcohol 10% trong thời gian là 72 giờ. Sau đó, chiết tách collagen được thực hiện với pepsin 0,45% trong 24 giờ tạo ra collagen có chất lượng tốt nhất và hiệu suất thu hồi cao nhất.

### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện thông qua sự tài trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ (Bộ

Giáo dục và Đào tạo), mã số: CT2020.01.TCT.03 thuộc Chương trình Khoa học và Công nghệ “Nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ tiên tiến trong bảo quản, chế biến nông thủy sản vùng Đồng bằng sông Cửu Long” và đề tài nghiên cứu khoa học cấp cơ sở (Trường Đại học Cần Thơ), mã số: T2021-127.

Trương Thị Mộng Thu được tài trợ bởi Tập đoàn Vingroup – Công ty CP và hỗ trợ bởi Chương trình học bổng thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đồi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn, mã số VINIF.2021.TS.093.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- AOAC. (2016). *The official methods of analysis of AOAC International* (20<sup>th</sup> ed.). George W. Latimer. [http:// www.eoma.aoac.org](http://www.eoma.aoac.org).
- Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A., & Hara, K. (2008). Biochemical properties of acid – soluble collagen extracted from the skins of underutilised fishes. *Food Chemistry*, 108(1), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.039>
- Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2017). Amino acids, peptides, and proteins. In *Fennema’s food chemistry* (pp. 235-356). CRC Press.
- Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X., & Konno, K. (2009). Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*, 112(3), 702–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.020>
- Hadfi, N. H., & Sarbon, N. M. (2019). Physicochemical properties of silver catfish (*Pangasius sp.*) skin collagen as influenced by acetic acid concentration. *Food Research*, 3(6), 783-790. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.3\(6\).130](https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(6).130)
- He, L., Lan, W., Wang, Y., Ahmed, S., & Liu, Y. (2019). Extraction and characterization of self-assembled collagen isolated from grass carp and crucian carp. *Foods*, 8(9), 396. <https://doi.org/10.3390/foods8090396>
- Huang, R. Y., Shiao, Y. C., Chen, H. H. & 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.011>
- Jia, Y., Wang, H., Wang, H., Li, Y., Wang, M., & Zhou, J. (2012). Biochemical properties of skin collagens isolated from black carp (*Mylopharyngodon piceus*). *Food Science and Biotechnology*, 21, 1585– 1592. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0211-1>
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. & Tanaka, M. (2005). Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 93, 475-484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.026>
- Karami, A., Tebyanian, H., Soufdoost, R. S., Motavallian, E., Barkhordari, A., & Nourani, M. R. (2019). Extraction and characterization of collagen with cost-effective method from human placenta for biomedical applications. *World Journal of Plastic Surgery*, 8(3), 352.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 89(3), 363-372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.042>
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, H. (2015). Characteristics of collagen from the skin of clown featherback (*Chitala ornata*). *International Journal of Food Science & Technology*, 50(9), 1972-1978. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12864>
- Lê Phan Thùy Hạnh & Trần Quyết Thắng. (2017). Chiết collagen từ da cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*) bằng phương pháp hóa học. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 12(1), 108-117.
- Lê Thị Minh Thủy & Trương Thị Mộng Thu. (2020). Nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp xử lý đến chất lượng và hiệu suất thu hồi collagen từ da cá thát lát còm (*Chitala ornata*). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 383(2), 65 – 73.
- Lê Thị Thu Hương, Nguyễn Hoàng Dũng & Phan Đình Tuấn. (2017). Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố công nghệ đến hiệu suất trích ly collagen từ da cá tra (*Pangasius hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Lạc Hồng*, số đặc biệt, 153-158.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). *Protein measure – ment with Folin phenol reagent*. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 256–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. & Duodu, K. D. (2004). Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 581-592. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.08.009>
- Nguyễn Thị Hoàng Lan, Nguyễn Thị Quyên & Nguyễn Ngọc Cường. (2016). Ảnh hưởng của một số điều kiện công nghệ đến hiệu suất trích ly dầu ngô. *Tạp chí KH Nông nghiệp Việt Nam – Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. HCM*, 14(11), 1825-1834.

- Nurilmala, M., Pertiwi, R. M., Nurhayati, T., Fauzi, S., Batubara, I., & Ochiai, Y. (2019). Characterization of collagen and its hydrolysate from yellowfin tuna *Thunnus albacares* skin and their potencies as antioxidant and antiglycation agents. *Fisheries science*, 85(3), 591-599. <https://doi.org/10.1007/s12562-019-01303-5>
- Nurubhasha, R., Kumar, N. S., Thirumalasetti, S. K., Simhachalam, G., & Dirisala, V. R. (2019). Extraction and characterization of collagen from the skin of *Pterygoplichthys pardalis* and its potential application in food industries. *Food science and biotechnology*, 28(6), 1811-1817. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00601-z>
- Ogawa, M., Moody, M. W., Portier, R. J., Bell, J., Schexnayder, M. A., & Losso, J. N. (2003). Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8088–8092. <https://doi.org/10.1021/jf034350r>
- Regenstein, J. M., & Zhou, P. (2007). Collagen and Gelatin from Marine By-Products. In: Shahidi, F. (Ed.). *Mazimising the Value of Marine By-Products*, 1 st. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 279–303. <https://doi.org/10.1533/9781845692087.2.279>
- Sae-leaw, T., Benjakul, S., & O'Brien, N. M. (2016). Effects of defatting and tannic acid incorporation during extraction on properties and fishy odour of gelatin from seabass skin. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 661-667. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.060>
- Skierka, E., & Sadowska, M. (2007). The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 105(3), 1302-1306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.030>
- Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S. & Kishimura, H. (2011). Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*, 124(1), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.111>
- Sinthusamran, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2013). Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chemistry*, 138, 2435–2441. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.136>
- Thuy, L. T. M., Okazaki, E. & 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.094>
- Trần Minh Phú, Đào Thị Mộng Trinh, Lê Thị Minh Thủy & Nguyễn Quốc Thịnh. (2018). Bảo quản lạnh cá lóc phi lê (*Channa striata*) kết hợp xử lý acid acetic. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54(3B), 147-155. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2018.051>
- Trần Thị Huyền, Nguyễn Anh Tuấn, Hoàng Ngọc Anh & 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 – Trường Đại học Nha Trang*, 2, 31-36.
- Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L. & Hu, Q. (2008). Isolation and characterisation of collagen from the skin, scale and bone of deep – Sea redfish (*Sebates mentella*). *Food Chemistry*, 108(2), 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.017>
- Xu, S., Yang, H., Shen, L., & Li, G. (2017). Purity and yield of collagen extracted from southern catfish (*Silurus meridionalis Chen*) skin through improved pretreatment methods. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S141-S153. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1291677>
- Zhang, J., Duan, R., Wang, Y., Yan, B. & Xue, W. (2012). Seasonal differences in the properties of gelatin extracted from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Hydrocolloids*, 29(1), 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.005>