

# **NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT COLLAGEN THỦY PHÂN TỪ DA CÁ LÓC (*Channa striata*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỦY PHÂN ENZYME ALCALASE**

Nguyễn Văn Thành<sup>1</sup>, Lê Thị Minh Thủy<sup>2,\*</sup>

## **TÓM TẮT**

Nghiên cứu tách chiết collagen thủy phân từ da cá lóc được thực hiện thông qua các bước: loại lipid của da cá lóc, trích ly gelatin và sử dụng enzyme Alcalase để thủy phân gelatin và thu nhận collagen thủy phân. Kết quả cho thấy, hiệu quả loại lipid đạt 78,2% khi xử lý da cá lóc bằng axit acetic 0,05M trong 1 giờ. Da cá lóc được trích ly trong nước cất ở nhiệt độ 70°C, 2 giờ thu được gelatin có hiệu suất thu hồi cao, độ bền gel, độ nhớt, màu sắc và nhiệt độ tạo gel tốt nhất lần lượt là 22,8%; 216 g; 14,9 mPa.s; L\* = 81,8 và 13,5°C. Hiệu suất thu hồi collagen thủy phân là 98,6% khi gelatin thủy phân bằng enzyme Alcalase 2% (v/w) trong 3 giờ, độ hòa tan cực đại ở pH=7 và nồng độ NaCl từ 0,8 - 1,2 M. Hơn nữa, kết quả phổ FTIR cho thấy, collagen thủy phân vẫn chứa đầy đủ các nhóm chức đặc trưng. Do đó, da cá lóc có thể được tận dụng để sản xuất collagen thủy phân.

**Từ khóa:** Collagen thủy phân, da cá lóc, độ bền gel, độ nhớt, độ hòa tan.

## **1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Cá lóc (*Channa striata*) là loài nuôi đầy triển vọng và đang phát triển với diện tích và sản lượng nuôi ngày càng tăng ở đồng bằng sông Cửu Long, sản lượng cá đạt khoảng 40.000 tấn/năm [30]. Cá lóc có thể được chế biến tạo ra nhiều sản phẩm đa dạng như làm mắm, làm khô, chà bông, chả cá... Trong quá trình sản xuất, lượng phụ phẩm loại ra gồm: xương, da, đầu, vây, nội tạng, trong đó da chiếm tỉ lệ lớn khoảng 17-22% tổng khối lượng [11]. Bên cạnh các sản phẩm khô cá lóc truyền thống (còn da) thì sản phẩm khô cá lóc nguyên con hoặc cắt thành từng thỏi đã loại bỏ da đã và đang thu hút nhu cầu thị trường và chiếm tỷ lệ sản xuất khá cao tại các cơ sở chế biến khô cá lóc trên địa bàn tỉnh An Giang và Đồng Tháp, vì thế nguồn da cá lóc sẽ rất dồi dào và có tiềm năng để sản xuất ra nhiều sản phẩm có hoạt tính sinh học.

Collagen thủy phân thu được thông qua quá trình thủy phân collagen hoặc gelatin dưới tác động của hệ enzyme protease, collagen thủy phân được sử dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm và y học nhờ đặc tính tan tốt trong nước, làm chất mang, chất nhũ hóa, khả

năng tạo bọt, chống oxy hóa và ít gây dị ứng cho người sử dụng [2, 20]. Một số nghiên cứu trước đây về collagen thủy phân như nghiên cứu cấu trúc và độ ổn định của collagen trọng lượng phân tử thấp từ da cá chép [31], hay khả năng chống oxy hóa của collagen thủy phân từ da cá tra [2], chiết xuất, tinh chế và ứng dụng collagen thủy phân từ da cá [20]. Tuy nhiên, chưa có công bố khoa học nào về quá trình chiết rút collagen thủy phân từ da cá lóc. Nhằm nâng cao giá trị kinh tế cho nguồn phụ phẩm và đa dạng hóa sản phẩm, việc sản xuất collagen thủy phân là một hướng đi mới và triển vọng. Vì thế, nghiên cứu tách chiết collagen thủy phân từ da cá lóc bằng enzyme Alcalase đã được thực hiện.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Chuẩn bị mẫu**

Da cá lóc đã cấp đông được mua tại cơ sở khô cá lóc 7 Chóp (Thoại Sơn, An Giang) và được vận chuyển về Bộ môn chế biến thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ để loại bỏ phần thịt, nhớt và tạp chất, rửa sạch dưới vòi nước chảy và để ráo. Da cá được cắt thành những miếng nhỏ (2 x 1 cm), chứa trong các túi PE (50 g/túi) và được bảo quản ở nhiệt độ -20±2°C cho đến khi tiến hành thí nghiệm.

### **2.2. Hóa chất**

Các hóa chất được sử dụng: CH<sub>3</sub>COOH (axit Acetic), C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> (axit Citric), C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (Ethanol), CaCl<sub>2</sub> (Calcium Chloride) và một số hóa chất khác.

<sup>1</sup> Khoa Khoa học Thực phẩm và Sức khỏe, Trường Đại học Kiên Giang

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

\*Email: ltmthuy@ctu.edu.vn

Alcalase thuộc nhóm endopeptidase có các đặc tính kỹ thuật như sau: pH tối thích từ 6-8, nhiệt độ thích hợp từ 30-65°C, hoạt tính 2,4 AU/g và bảo quản enzyme ở 0-5°C.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của loại hóa chất đến hiệu quả loại lipid da cá lóc

Da cá lóc được khử lipid theo phương pháp của Sae-Leaw và cs (2016) [25] với một vài hiệu chỉnh. Xử lý da cá lóc trong 4 loại hóa chất khác nhau, lần lượt là axit acetic 0,05 M, axit citric 0,05 M kết hợp với  $\text{CaCl}_2$  50 mM, axit citric 0,05 M kết hợp với 50% ethanol và axit citric 0,05 M. Cố định tỷ lệ da cá: dung dịch (w/v) là 1: 10. Quá trình xử lý da cá ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ, hỗn hợp được lắc đều trên máy lắc 0S-2000 (Hàn Quốc) trong quá trình xử lý. Sau đó, da cá lóc được rửa bằng nước sạch nhiều lần cho đến khi đạt được pH trung tính và phân tích lượng lipid còn lại để chọn được loại hóa chất cho hiệu quả khử lipid cho da cá lóc phù hợp nhất. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, khối lượng mỗi mẫu là 50 g.

#### 2.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian trích ly đến chất lượng gelatin từ da cá lóc

Da cá lóc sau khi khử lipid (kết quả thí nghiệm 1) được trích ly gelatin trong nước cất trong bể điều nhiệt ở các mức nhiệt độ (60, 70 và 80°C) và thời gian (1 và 2 giờ) khác nhau. Cố định tỉ lệ da cá: nước cất (w/v) 1: 7, tần suất khuấy đảo 5 phút/lần. Dung dịch gelatin được lọc và ly tâm với tốc độ 6.000 g trong 20 phút ở 25°C, làm đông tách nước dung dịch gelatin ở nhiệt độ -20°C trong 24 giờ trước khi sấy khô ở nhiệt độ 60°C (ẩm độ 10-12%), các miếng gelatin được cân để tính hiệu suất thu hồi và nghiền mịn để thu bột gelatin. Bột gelatin được kiểm tra độ bền gel, nhiệt độ tạo gel, độ nhớt và màu sắc. Từ đó, chọn ra nhiệt độ và thời gian trích ly gelatin. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, khối lượng mỗi mẫu là 100 g.

#### 2.3.3. Ảnh hưởng của chế độ thủy phân gelatin từ da cá lóc bằng enzyme Alcalase đến hiệu quả thu hồi collagen thủy phân

Gelatin trích ly từ da cá lóc (kết quả thí nghiệm 2) được hòa tan trong nước cất 60°C để đạt nồng độ 6,67% (w/v). Dung dịch gelatin được thủy phân bằng enzyme Alcalase với các nồng độ là 2 và 3% (v/w) so với gelatin, thời gian thủy phân khác nhau là 2, 3 và 4 giờ. Hỗn hợp dung dịch được khuấy nhẹ liên tục, duy

trì nhiệt độ thủy phân ở 50°C. Dung dịch sau khi thủy phân được giữ ở -20°C trong 15 phút để bất hoạt enzyme, sau đó ly tâm 6.000 g, 30 phút ở 4°C [2]. Cuối cùng, dung dịch collagen thủy phân được sấy đông khô (ẩm độ 10-12%), tiến hành cân sản phẩm collagen thủy phân để xác định hiệu suất thu hồi, màu sắc và độ nhớt, độ hoà tan. Từ kết quả phân tích chọn ra chế độ thủy phân gelatin từ da cá lóc thích hợp nhất. Mẫu collagen thủy phân tốt nhất được phân tích phổ FTIR. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, khối lượng mỗi mẫu là 100 g.

### 2.4. Phương pháp phân tích

Thành phần hóa lý của nguyên liệu được phân tích theo AOAC (2000) [1]. Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp Kjeldal (AOAC, 2000 số 954.01), phương pháp Soxhlet (AOAC, 2000 số 991.36) được sử dụng để xác định hàm lượng lipid, xác định hàm lượng khoáng bằng phương pháp nung (AOAC, 2000 số 942.05) và hàm lượng ẩm bằng phương pháp sấy (AOAC, 2000 số 934.01).

Xác định hiệu suất thu hồi ở công đoạn sấy bằng phương pháp kiểm tra khối lượng với công thức  $H = \frac{Y}{X} \times 100$ , trong đó, H (%) là hiệu suất thu hồi của sản phẩm sau khi sấy, X (g) là khối lượng mẫu trước khi sấy, Y (g) là khối lượng mẫu thu được sau khi sấy.

Độ bền gel (g) của gelatin được xác định bằng máy Texture (Surrey, Anh). Đổ 15 mL dung dịch gelatin nồng độ 6,67% vào cốc thủy tinh có đường kính 2,5 cm và giữ ở 4-6°C trong 16 giờ, sử dụng đầu dò P/0.5S đường kính 12,5 mm, đâm xuyên 4 cm vào khối gel gelatin, tốc độ 1 mm/s. Giá trị lực lớn nhất (g) được ghi nhận [8].

Nhiệt độ tạo gel của gelatin: Hút 5 mL dung dịch gelatin nồng độ 6,67% (40°C) cho vào ống nghiệm thủy tinh (1,5x10 cm) (PYREX, Mỹ). Đặt ống nghiệm vào bể nước lạnh (8°C), ghim đầu nhiệt kế vào dung dịch gelatin và rút ra khỏi dung dịch cứ sau 10 giây. Nhiệt độ khi rút đầu nhiệt kế ra khỏi dung dịch gelatin mà không còn nhỏ giọt được xem là nhiệt độ tạo gel [27].

Độ nhớt: Hòa tan mẫu trong nước cất ở 60°C trong 20 phút, nồng độ dung dịch 6,67%. Sử dụng máy đo độ nhớt Brookfield DV (RVDV-11CP, Mỹ). Tốc độ vòng quay của đĩa 100 rpm, nhiệt độ môi trường duy trì ở 7±1°C, thể tích dung dịch cho mỗi

lần đo là 0,5 mL. Kết quả thu được là trung bình của ba lần đo, đơn vị của độ nhớt là mPa.s [10].

Đo màu: Tiến hành đo màu gelatin và collagen thủy phân bằng thiết bị Colorimeter PCE-CSM 2 (Trung Quốc), các giá trị  $L^*$  (màu trắng đến màu đen),  $a^*$  (màu đỏ đến màu xanh lá cây) và  $b^*$  (màu vàng đến màu xanh da trời) được ghi nhận [24].

Xác định độ hòa tan của collagen thủy phân ở các pH khác nhau: 8 mL dung dịch collagen thủy phân (nồng độ 3 mg/mL) được điều chỉnh pH bằng HCL 6 M hoặc NaOH 6 M để đạt pH từ 1 – 10 và thể tích của dung dịch được điều chỉnh đến 10 mL bằng nước cất. Xác định độ hòa tan trong các nồng độ muối NaCL từ 0 - 1,2 M: Hút 5 mL dung dịch collagen có nồng độ 6 mg/mL cho vào 5 mL dung dịch NaCL ở các nồng độ từ 0,2 đến 1,2 M [28]. Sau đó, hỗn hợp collagen được ly tâm với tốc độ 8.000 g trong 20 phút ở 4°C và xác định hàm lượng protein hòa tan [16].

**Bảng 1. Thành phần hóa học của da cá lóc (tính theo căn bản khô)**

| Chỉ tiêu             | Ẩm độ     | Protein    | Lipid      | Khoáng     |
|----------------------|-----------|------------|------------|------------|
| <b>Hàm lượng (%)</b> | 57,7±1,55 | 33,3±0,008 | 4,82±0,078 | 0,17±0,028 |

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

**Bảng 2. Hàm lượng lipid còn lại của da cá lóc**

| Hóa chất                                           | Hàm lượng lipid còn lại (%) |
|----------------------------------------------------|-----------------------------|
| Đối chứng                                          | 4,82±0,078 <sup>d</sup>     |
| Axit acetic 0,05 M                                 | 1,05±0,049 <sup>a</sup>     |
| Axit citric 0,05 M kết hợp 50 mM CaCl <sub>2</sub> | 1,40±0,120 <sup>b</sup>     |
| 0,05 M kết hợp 50% ethanol                         | 2,34±0,042 <sup>c</sup>     |
| Axit citric 0,05 M                                 | 1,55±0,063 <sup>b</sup>     |

*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%.*

Hàm lượng protein của da cá lóc chiếm tỷ lệ cao (33,3%) là cơ sở trích ly gelatin cũng như collagen thủy phân với hiệu suất thu hồi cao. Tuy nhiên, da cá lóc có hàm lượng lipid khá cao (4,82%), vì thế cần loại bỏ lipid ra khỏi da cá trong giai đoạn tiền xử lý để hạn chế sự oxy hóa, đồng thời còn khử được mùi tanh của da cá, góp phần nâng cao chất lượng gelatin [25, 32].

Xác định phổ FTIR của mẫu collagen thủy phân thích hợp nhất bằng máy quang phổ 5ALPHA FT-IR của Bruker Optics trong phạm vi bước sóng từ 4.000 đến 400 cm<sup>-1</sup> [28]. Dữ liệu được phân tích bởi một chương trình phần mềm OPUS 7.5 (Đức).

## 2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại. Số liệu thu thập được phân tích bằng phương pháp thống kê mô tả (trung bình ± độ lệch chuẩn). Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được phân tích bằng ANOVA và phép thử Duncan (p<0,05) bằng chương trình SPSS 16.0.

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của loại hóa chất đến hiệu quả loại lipid trong da cá lóc

Việc xác định thành phần hóa lý của nguyên liệu sẽ giúp lựa chọn được phương pháp tiền xử lý phù hợp. Kết quả phân tích thành phần hóa lý của da cá lóc được trình bày ở bảng 1.

Hàm lượng lipid còn lại trong da cá lóc sau khi xử lý được thể hiện trong bảng 2.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, loại hóa chất cho hiệu quả loại lipid của da cá lóc tốt nhất là axit acetic 0,05 M, hàm lượng lipid giảm từ 4,82% xuống còn 1,05%, khử được 78,2%. Thành phần có trong dung dịch axit có khả năng liên kết với các axit amino của phân tử protein, dẫn đến làm giảm hoặc cắt đứt liên kết giữ axit phospholipid của màng tế bào và protein, do đó một phần lipid bị tách ra khỏi nguyên liệu trong quá trình xử lý [9]. Axit acetic 0,05 M cũng được sử dụng để khử lipid cho da cá như cá chêm và hiệu quả loại lipid là 50,6% [25]; hay da cá thác lát còm và loại được 64,5% lipid [14]. Tuy nhiên, tùy thuộc vào nguyên liệu mà hiệu quả khử lipid sẽ khác nhau, xử lý da cá tra bằng axit citric 0,25% trong 24 giờ cho hiệu quả loại lipid tốt nhất [2]. Ngoài ra, axit còn có tác dụng làm da trương nở và phá vỡ các liên kết chéo collagen nên thuận lợi cho quá trình trích ly gelatin [8]. Từ kết quả nghiên cứu, da cá lóc được xử lý bằng axit acetic 0,05 M trong thời gian 1 giờ cho hiệu quả loại lipid tốt nhất.

### 3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian trích ly đến chất lượng gelatin từ da cá lóc

#### 3.2.1. Hiệu suất thu hồi, độ nhớt, độ bền gel và nhiệt độ tạo gel của gelatin

Hiệu suất thu hồi, độ nhớt, độ bền gel, nhiệt độ tạo gel của gelatin được trích ly trong các điều kiện nhiệt độ và thời gian khác nhau được thể hiện trong bảng 3.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian trích ly đến hiệu suất thu hồi, độ nhớt và độ bền gel và nhiệt độ tạo gel của gelatin từ da cá lóc**

| Nhiệt độ (°C) | Thời gian (giờ) | Hiệu suất thu hồi (%)   | Độ nhớt (mPa.s)          | Độ bền gel (g)         | Nhiệt độ tạo gel (°C)    |
|---------------|-----------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| 60            | 1               | 18,5±0,784 <sup>a</sup> | 14,1±0,141 <sup>a</sup>  | 163±1,97 <sup>a</sup>  | 7,65±0,212 <sup>a</sup>  |
| 60            | 2               | 19,2±0,028 <sup>a</sup> | 14,1±0,063 <sup>a</sup>  | 165±3,89 <sup>a</sup>  | 8,00±0,141 <sup>a</sup>  |
| 70            | 1               | 21,0±0,919 <sup>b</sup> | 14,5±0,070 <sup>b</sup>  | 198±2,63 <sup>c</sup>  | 13,0±0,056 <sup>bc</sup> |
| 70            | 2               | 22,8±0,197 <sup>c</sup> | 14,9±0,070 <sup>c</sup>  | 216±2,52 <sup>d</sup>  | 13,5±0,141 <sup>c</sup>  |
| 80            | 1               | 20,9±0,134 <sup>b</sup> | 14,1±0,120 <sup>a</sup>  | 186±1,02 <sup>b</sup>  | 12,7±0,282 <sup>b</sup>  |
| 80            | 2               | 21,8±1,09 <sup>bc</sup> | 14,6±0,282 <sup>bc</sup> | 199±0,591 <sup>c</sup> | 12,9±0,212 <sup>b</sup>  |

*Ghi chú: Số liệu thống kê được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn với (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%.*

Nhiệt độ chiết rút 60-70°C thì hiệu suất thu hồi, độ nhớt, độ bền gel của gelatin đều tăng khi tăng thời gian trích ly từ 1 lên 2 giờ. Hiệu quả trích ly tốt nhất khi da cá lóc được nấu ở 70°C trong 2 giờ với hiệu suất thu hồi gelatin đạt 22,8%, độ nhớt 14,9 mPa.s và độ bền gel là 216 g. Hiệu suất thu hồi tăng là do ở nhiệt độ và thời gian chiết rút thích hợp, cấu trúc bậc 3 của phân tử collagen sẽ bị cắt đứt, chuyển collagen từ trạng thái không hòa tan thành gelatin hòa tan [3]. Tuy nhiên, tiếp tục tăng nhiệt độ chiết lên 80°C và kéo dài thời gian từ 1 đến 2 giờ thì cả hiệu suất thu hồi, độ nhớt và độ bền gel giảm nhẹ. Dưới tác động của nhiệt độ cao trong thời gian dài, gelatin bị thủy phân tạo ra nhiều gelatose và gelatone, sự hiện diện của các mạch peptide ngắn sẽ làm giảm độ nhớt và khả năng liên kết giữa các mạch phân tử bị hạn chế, làm cho độ bền gel của gelatin giảm [29]. Nhiệt độ chiết rút gelatin từ da cá tra ở 70°C cũng được lựa chọn [13], hiệu suất thu hồi, độ nhớt, độ bền gel của gelatin lần lượt là 13,1%, 7,64 mPa.s và 149 g.

Nhiệt độ tạo gel có ảnh hưởng rất lớn đến tính ứng dụng của gelatin, nhiệt độ tạo gel của gelatin ít thay đổi khi tăng thời gian trích ly từ 1 lên 2 giờ trong cùng điều kiện nhiệt độ; tuy nhiên, nhiệt độ chiết rút trên 70°C thì nhiệt độ tạo gel giảm. Điều kiện trích ly được cung cấp nhiều năng lượng hơn sẽ làm thủy phân mạnh mẽ các chuỗi peptide dẫn tới sự hình thành các peptide ngắn hơn và ảnh hưởng tiêu cực đến tính chất của gelatin [3]. Từ kết quả phân tích

cho thấy, gelatin từ da cá lóc được chiết rút ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 2 giờ có nhiệt độ tạo gel (13,5°C) cao hơn so với gelatin từ da cá tra nhiệt độ tạo gel lần lượt là 13,06°C và 11,6°C [5, 22]. Nhìn chung, mẫu gelatin được chiết rút từ da cá lóc ở 70°C trong 2 giờ cho kết quả hiệu suất thu hồi, độ bền gel và độ nhớt tốt nhất và nhiệt độ tạo gel cao.

#### 3.2.2. Màu sắc của gelatin

Sự thay đổi về màu sắc của gelatin từ da cá lóc ở các mức nhiệt độ và thời gian trích ly khác nhau được trình bày ở bảng 5. Từ kết quả ở bảng 4 cho thấy, ở cùng nhiệt độ khi tăng thời gian nấu chiết từ 1 lên 2 giờ thì giá trị độ sáng  $L^*$  giảm dần, riêng ở nhiệt độ chiết rút gelatin ở 70°C thì tăng.

Cụ thể, giá trị  $L^*$  của gelatin được trích ly ở 70°C trong thời gian từ 1 giờ đến 2 giờ tăng từ 79,9 lên 81,8. Khi tăng nhiệt độ và thời gian chiết rút thì dung dịch gelatin trở nên đục hơn và màu sắc của gelatin sẽ sẫm hơn [6]. Ngoài ra, màu sắc của gelatin cũng phụ thuộc bởi các sắc tố có sẵn trong nguồn nguyên liệu ban đầu và điều kiện xử lý [10]. Gelatin từ da cá lóc có màu trắng sáng hơn so với gelatin từ da cá tra với giá trị  $L^*$  là 78,7 [19], giá trị  $L^*$  là 64,6 [23] và 68,6 [10]. Từ kết quả được phân tích ở thí nghiệm này, nhiệt độ nấu chiết 70°C trong 2 giờ là thích hợp nhất vì khi chiết rút da cá lóc ở điều kiện này cho hiệu suất thu hồi gelatin, độ bền gel, độ nhớt đạt giá trị cao nhất, màu sắc gelatin sáng nhất.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian trích ly đến màu sắc của gelatin da cá lóc**

| Nhiệt độ (°C) | Thời gian (giờ) | Màu sắc                 |                         |                           |
|---------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
|               |                 | $L^*$                   | $a^*$                   | $b^*$                     |
| 60            | 1               | 75,4±0,494 <sup>b</sup> | 3,36±0,749 <sup>b</sup> | 22,6±0,247 <sup>ab</sup>  |
| 60            | 2               | 73,4±0,671 <sup>a</sup> | 3,00±0,176 <sup>b</sup> | 22,2±1,109 <sup>a</sup>   |
| 70            | 1               | 79,9±0,735 <sup>c</sup> | 2,86±0,146 <sup>b</sup> | 24,5±0,679 <sup>c</sup>   |
| 70            | 2               | 81,8±0,544 <sup>d</sup> | 1,26±0,108 <sup>a</sup> | 24,0±0,451 <sup>bc</sup>  |
| 80            | 1               | 75,1±0,021 <sup>b</sup> | 1,89±0,459 <sup>a</sup> | 26,8±0,240 <sup>d</sup>   |
| 80            | 2               | 73,2±0,134 <sup>a</sup> | 2,99±0,304 <sup>b</sup> | 23,6±0,381 <sup>abc</sup> |

Ghi chú: Số liệu thống kê được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn với (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%.

### 3.3. Chế độ thủy phân gelatin bằng enzyme Alcalase đến hiệu quả thu nhận collagen thủy phân từ da cá lóc

#### 3.3.1. Hiệu suất thu hồi, độ nhớt và màu sắc của collagen thủy phân từ da cá lóc

Hiệu suất thu hồi, độ nhớt và màu sắc của collagen thủy phân từ da cá lóc được trình bày trong bảng 5.

**Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme Alcalase và thời gian thủy phân gelatin đến hiệu suất thu hồi và độ nhớt của collagen thủy phân từ da cá lóc**

| Alcalase (%) | Thời gian (giờ) | Hiệu suất thu hồi (%)   | Độ nhớt (mPa.s)         |
|--------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|
| 2            | 2               | 88,4±0,261 <sup>c</sup> | 7,20±0,070 <sup>e</sup> |
| 2            | 3               | 98,6±0,572 <sup>d</sup> | 7,01±0,072 <sup>d</sup> |
| 2            | 4               | 97,0±1,68 <sup>d</sup>  | 6,03±0,056 <sup>b</sup> |
| 3            | 2               | 84,3±0,162 <sup>b</sup> | 6,63±0,028 <sup>c</sup> |
| 3            | 3               | 85,8±0,318 <sup>b</sup> | 6,04±0,021 <sup>b</sup> |
| 3            | 4               | 80,4±1,04 <sup>a</sup>  | 5,42±0,021 <sup>a</sup> |

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

Từ kết quả bảng 5, hiệu suất thu hồi collagen thủy phân tăng từ 88,4% lên 98,6% khi thời gian thủy phân tăng từ 2 lên 3 giờ ở nồng độ enzyme Alcalase 2%, hiệu suất thu hồi giảm xuống còn 97,0% khi tăng thời gian lên 4 giờ. Đối với gelatin được thủy phân với 3% enzyme Alcalase và thời gian tăng từ 2 lên 4 giờ thì hiệu suất thu hồi thấp hơn so với 2% enzyme. Nồng độ enzyme Alcalase 2% và thời gian 3 giờ cũng được chọn để thủy phân gelatin da cá ngừ và sản phẩm thủy phân có hoạt tính sinh học tốt [21].

Độ nhớt chịu sự chi phối của kích thước phân tử của chuỗi peptide [4], dưới tác dụng của enzyme

Alcalase với nồng độ cao hơn và thời gian thủy phân dài hơn, các chuỗi  $\alpha$  và  $\beta$  của gelatin bị cắt đứt dẫn đến hình thành các mạch peptide có kích thước ngắn [33] nên độ nhớt của collagen thủy phân giảm [29].

**Bảng 6. Sự thay đổi màu sắc của collagen thủy phân từ da cá lóc**

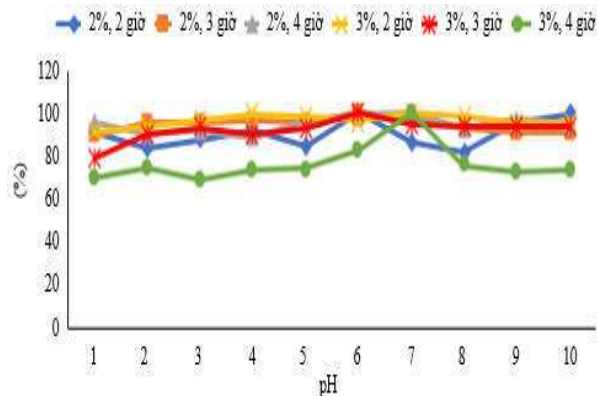
| Alcalase (%) | Thời gian (giờ) | Màu sắc                  |                          |                          |
|--------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|              |                 | $L^*$                    | $a^*$                    | $b^*$                    |
| 2            | 2               | 78,8±0,565 <sup>d</sup>  | 3,84±0,197 <sup>b</sup>  | 17,4±0,304 <sup>ab</sup> |
| 2            | 3               | 81,8±0,355 <sup>c</sup>  | 3,42±0,141 <sup>a</sup>  | 16,6±0,523 <sup>a</sup>  |
| 2            | 4               | 74,1±0,728 <sup>a</sup>  | 4,45±0,134 <sup>c</sup>  | 17,8±0,919 <sup>ab</sup> |
| 3            | 2               | 76,7±0,077 <sup>bc</sup> | 3,79±0,790 <sup>ab</sup> | 18,1±0,155 <sup>b</sup>  |
| 3            | 3               | 77,1±0,155 <sup>c</sup>  | 3,46±0,155 <sup>ab</sup> | 17,8±0,636 <sup>ab</sup> |
| 3            | 4               | 75,8±0,487 <sup>b</sup>  | 4,60±0,155 <sup>c</sup>  | 20,9±0,848 <sup>c</sup>  |

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%.

Collagen thủy phân có màu sáng đẹp với độ sáng  $L^*$  là 81,8 khi gelatin được thủy phân với 2% enzyme Alcalase trong 3 giờ (bảng 6) và tương tự như màu của gelatin trước khi được thủy phân, tiếp tục tăng thời gian từ 3 lên 4 giờ thì độ sáng ( $L^*$ ) giảm còn 74,1. Với nồng độ enzyme Alcalase 3% thì sản phẩm collagen thủy phân thu được có màu tối hơn, giá trị  $L^*$  dao động từ 75,8-77,1. Sự giải phóng các amino acid tự do thông qua quá trình thủy phân gelatin bởi enzyme, kết hợp với các nhóm đường khử tạo phản ứng hóa nâu phi enzyme (maillard) [33] và gây sẫm màu cho collagen thủy phân.

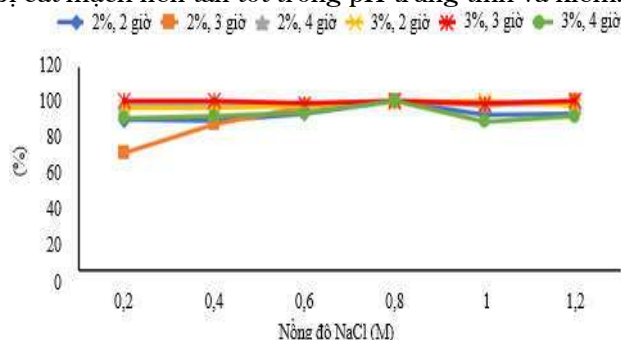
#### 3.3.2. Độ hòa tan của collagen thủy phân ở các pH và nồng độ NaCl khác nhau

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



**Hình 1. Độ hòa tan của collagen từ da cá lóc ở các pH khác nhau**

Từ kết quả hình 1 cho thấy, các mẫu collagen thủy phân có khuynh hướng hòa tan cao trong phạm vi pH trung tính (6-7). Sự khác biệt về pH cực đại và cực tiểu đối với độ hòa tan của collagen là do sự khác biệt về tính chất phân tử và thành phần của collagen [12]. Độ hòa tan có khuynh hướng tăng ở pH 8-10, có thể là do collagen sau khi thủy phân bằng enzyme đã bị cắt mạch nên tan tốt trong pH trung tính và kiềm.

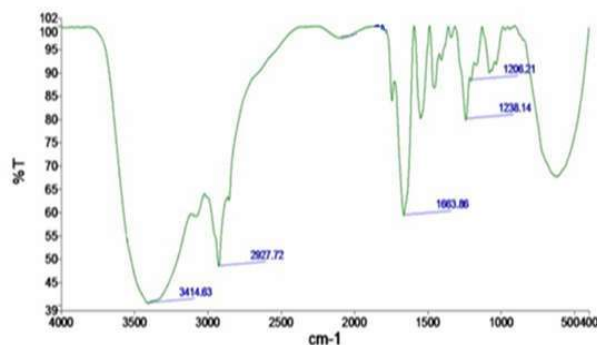


**Hình 2. Độ hòa tan của collagen từ da cá lóc ở các nồng độ NaCl khác nhau**

Các mẫu collagen thủy phân có độ hòa tan cao trên 90% ở nồng độ muối từ 0,6-0,8 M. Khi nồng độ NaCl lớn hơn 0,8 M thì độ hòa tan có xu hướng giảm nhẹ. Nồng độ muối NaCl càng cao thì sự tăng cường tương tác kỵ nước giữa các phân tử protein càng cao dẫn đến kết tủa protein [7]. Ngược lại, các ion có trong dung dịch muối liên kết yếu với các nhóm tích điện trên bề mặt protein và không tác động vào lớp hydrate hóa dẫn đến độ hòa tan cao ở nồng độ NaCl thấp [26]. Như vậy, enzyme Alcalase 2% và 3 giờ là chế độ thích hợp để thủy phân gelatin từ da cá lóc và thu nhận collagen thủy phân

### 3.4. Phổ FTIR

Phổ FTIR của mẫu collagen thủy phân từ gelatin được trích ly từ da cá lóc ở nồng độ enzyme Alcalase 2% trong thời gian 3 giờ được trình bày ở hình 3.



**Hình 3. Phổ FTIR của collagen thủy phân từ da cá lóc**

Mẫu collagen thu nhận có phổ FTIR với bước sóng tại vùng amide A (3414,83  $\text{cm}^{-1}$ ). Vùng amide A thể hiện liên kết hydro liên quan đến nhóm  $\text{-NH}$  trong liên kết peptide và được tìm thấy trong khoảng bước sóng 3400 – 3440  $\text{cm}^{-1}$  [18]. Amide B (2927,72  $\text{cm}^{-1}$ ), amide I (1663,86  $\text{cm}^{-1}$ ) đóng vai trò quan trọng cho cấu trúc thứ cấp của phân tử peptide với sự dao động kéo dài của nhóm cacbonyl. Amide II (1238,14  $\text{cm}^{-1}$ ) và amide III (1208,21  $\text{cm}^{-1}$ ) phát sinh dao động uốn cong của nhóm  $\text{-NH}$  và dao động kéo căng của liên kết  $\text{-CN}$  và amide III có liên quan đến cấu trúc xoắn bậc 3 của collagen [18]. Thông qua các dữ liệu đã phân tích phổ FTIR, collagen thủy phân từ da cá lóc có đầy đủ các nhóm chức năng và tương tự như báo cáo về collagen loại I từ da cá lóc [17] hay collagen thủy phân trên đối tượng da cá rô phi có đỉnh Amide A là 3424,96  $\text{cm}^{-1}$  và Amide I là 1650,77  $\text{cm}^{-1}$  [15].

### 4. KẾT LUẬN

Collagen thủy phân thu nhận từ da cá lóc có chất lượng tốt, màu sáng đẹp (giá trị  $L^* = 81,8$ ) và hiệu suất thu hồi cao (98,6%) khi tiền xử lý da cá lóc bằng axit acetic 0,05 M trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng trước khi trích ly gelatin ở 70°C trong 2 giờ. Nồng độ enzyme Alcalase và thời gian thủy phân gelatin thích hợp để thu hồi collagen thủy phân lần lượt là 2% và 3 giờ. Qua đó cho thấy, tiềm năng to lớn để sản xuất collagen thủy phân từ nguồn da cá lóc.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AOAC (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th Edition, George, W. and Latimer, Jr (Eds.), Volume II. Washington DC. USA.
2. Azizah, N., Ochiai, Y., & Nurilmala M. (2020). Collagen peptides from Pangasius fish skin as antioxidants. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 404, No. 1, p. 012055). IOP Publishing.

3. Benjakul, S., Oungbho, K., Visessanguan, W., Thiansilakul, Y., & Roytrakul, S. (2009). Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. *Food Chemistry*, 116(2), 445-451.
4. Bigi, A., Panzavolta, S., & Rubini, K. (2004). Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25(25), 5675-5680.
5. Chavan, R. R., Dora, K. C., Koli, J. M., Chowdhury, S., Sahu, S., & Talwar, N. A. (2018). Optimization of fish gelatin extraction from *Pangasianodon hypophthalmus* and *Protonibea diacanthus* skin and bone. *International Journal of Pure Applied Bioscience*, 6(2), 1195-1209.
6. Chuaychan, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2017). Characteristics and gelling property of gelatin from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5), 131-139.
7. Damodaran, S. (1996). Amino acids, peptides and proteins. In O. R. Fennema (Ed.). *Food Chemistry* (pp. 321-429).
8. Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2001). Extraction of Gelatin from Megrim (*Lepidorhombus boscii*) Skins with Several Organic Acids. *Journal of Food Science*, 66(2), 213-216.
9. Hrynets, Y., Omana, D. A., Xu, Y., & Betti, M. (2011). Impact of citric acid and calcium ions on acid solubilization of mechanically separated turkey meat: Effect on lipid and pigment content. *Poultry science*, 90(2), 458-466.
10. Jamilah, B., Tan, K. W., Umi Hartina, M. R., & Azizah, A. (2011). Gelatins from three cultured freshwater fish skins obtained by liming process. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1256-1260.
11. Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Sinthusamran, S., & Kishimura, H. (2015). Characteristics of collagen from the skin of clown featherback (*Chitala ornata*). *International Journal of Food Science and Technology*, 50(9), 1972-1978.
12. 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.
13. Lê Thị Minh Thủy & Nguyễn Văn Thơm (2019). Nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp xử lý và điều kiện chiết rút đến chất lượng của gelatin từ da cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản*, 4, 130-138.
14. 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 ornate*). *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 383, 65-73.
15. Li, J., Wang, M., Qiao, Y., Tian, Y., Liu, J., Qin, S., & Wu, W. (2018). Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochemistry*, 74, 156-163.
16. 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.
17. Issains, F. B., Trinanda, A. F., Basyir, A. M., Benaya, A., Yuwono, A. H., & Ramahdita, G. (2019, December). Extraction of collagen Type-I from snakehead fish skin (*Channa striata*) and synthesis of biopolymer for wound dressing. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2193, No. 1, p. 020013). AIP Publishing LLC.
18. Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., & 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.
19. Nguyễn Văn Thơm & Lê Thị Minh Thủy (2020). Ảnh hưởng của phương pháp tiền xử lý bằng enzyme Alcalase đến chất lượng gelatin từ da cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 398, 75-83.
20. Nguyen, B. C., & Nguyen, H. X. M. (2018). Extraction, purification and application of hydrolysed collagen from fish skin. *The Journal of Agriculture and Development*, 17(5), 114-122.
21. Nurilmala, M., Hizbullah, H. H., Karnia, E., Kusumaningtyas, E., & Ochiai, Y. (2020). Characterization and antioxidant activity of collagen, gelatin, and the derived peptides from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin. *Marine drugs*, 18(2), 98.
22. Ratnasari, I. (2016). Physico-chemical characterization and skin gelatin rheology of four freshwater fish as alternative gelatin source. *AACL Bioflux*, 9(6), 1196-1207.
23. Ratnasari, I., Yuwono, S. S., Nusyam, H., & Widjanarko, S. B. (2013). Extraction and characterization of gelatin from different fresh water

fishes as alternative sources of gelatin. *International Food Research Journal*, 20(6), 3085-3091.

24. Sae-leaw, T., & Benjakul, S. (2015). Physico-chemical properties and fishy odour of gelatin from seabass (*Lates calcarifer*) skin stored in ice. *Food Bioscience*, 10, 59-68.

25. Sae-Leaw, T., Benjakul, S., & O'Brien, N. M. (2016). Effect of Pretreatments and Defatting of Seabass Skins on Properties and Fishy Odor of Gelatin. *Journal of Food Biochemistry*, 40(6), 741-753.

26. 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.

27. Sinthusamran, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2014). Characteristics and gel properties of gelatin from skin of seabass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions. *Food Chemistry*, 152, 276-284.

28. 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 Vietnam. *Food Chemistry*, 149, 264-270.

29. Trần Thị Luyến (2006). *Sản xuất các chế phẩm kỹ thuật và y dược từ phế liệu thủy sản*. Nxb Nông nghiệp. Thành phố Hồ Chí Minh.

30. VASEP (2018). Xuất khẩu thủy sản 8 tháng đầu năm đạt 5,5 tỷ USD. <http://vasep.com.vn/san-pham-xuat-khau/tin-tong-hop/xuatnhapkhau/xuatkhau-thuy-san-8-thang-dau-nam-dat-5-5-ty-usd-6712.html>.

31. Yang, X., Yu, X., Yagoub, A. G., Chen, L., Wahia, H., Osae, R., & Zhou, C. (2021). Structure and stability of low molecular weight collagen peptide (prepared from white carp skin)-calcium complex. *LWT- Food Science and Technology*, 136, 110335.

32. Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Kristinsson, H. G., & Maqsood, S. (2012). Effect of pretreatment on lipid oxidation and fishy odour development in protein hydrolysates from the muscle of Indian mackerel. *Food Chemistry*, 135(4), 2474-2482.

33. Zhang, Y., Dutilleul, P., Li, C., & Simpson, B. K. (2019). Alcalase-assisted production of fish skin gelatin rich in high molecular weight (HMW) polypeptide chains and their characterization for film forming capacity. *LWT - Food Science and Technology*, 110, 117-125.

## EXTRACTION OF HYDROLYZED COLLAGEN FROM SNAKEHEAD FISH SKIN (*CHANNA STRIATA*) BY USING ORGANIC ACID AND ALCALASE

Nguyen Van Thanh<sup>1</sup> and Le Thi Minh Thuy<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Food Science and Health, Kien Giang University

<sup>2</sup>College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University

\*Email: ltmthuy@ctu.edu.vn

### Summary

Research on the extraction of hydrolyzed collagen from snakehead fish skin was conducted through the main steps: lipid removal of skin, gelatin extraction and the hydrolysis of gelatin by Alcalase in order to obtain hydrolyzed collagen. The results showed that, the lipid removal efficiency reached 78.2% when soaking snakehead fish skin in 0.05M acetic acid for 1 hour. The defatted skin was extracted in distilled water at 70°C for 2 hours for gelatin with the best yield, gel strength, viscosity, colour and setting temperature were 22.8%, 216 g, 14.9 mPa.s, L\* = 81.8 and 13.5°C, respectively. The yield of collagen was 98.6% from gelatin, hydrolyzed with 2% Alcalase for 3 hours, maximum solubility at pH=7 and NaCl concentration from 0.8-1.2 M. Furthermore, the FTIR spectroscopy results revealed that hydrolyzed collagen of type I contained fully the functional groups of collagen. From the results, snakehead fish skin could be used as a source for producing hydrolyzed collagen.

**Keywords:** Gel strength, hydrolyzed collagen, snakehead fish skin, solubility, viscosity.

**Người phản biện:** PGS.TS. Vũ Ngọc Bội

**Ngày nhận bài:** 3/3/2022

**Ngày thông qua phản biện:** 22/4/2022

**Ngày duyệt đăng:** 19/5/2022