

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

Trương Thị Mộng Thu^{1,2*}, Lê Thị Minh Thủy², Trần Thanh Trúc³

TÓM TẮT

Nghiên cứu điều kiện tiền xử lý và chiết tách collagen bằng pepsin được thực hiện nhằm sản xuất collagen đạt chất lượng tốt. Nghiên cứu gồm 3 thí nghiệm: (i) ảnh hưởng của nồng độ và thời gian ngâm EDTA-2Na đến khả năng khử khoáng từ vây cá lóc; (ii) ảnh hưởng của nồng độ pepsin; (iii) thời gian ngâm pepsin đến quá trình chiết tách collagen từ da và vây cá lóc. Kết quả cho thấy, vây cá lóc xử lý bằng dung dịch EDTA-2Na 0,8 M trong 24 giờ cho hiệu quả loại khoáng tốt nhất, hàm lượng khoáng còn lại 1,99%. Mẫu sau khi xử lý, được chiết tách bằng 0,10% pepsin cho hiệu suất thu hồi collagen đạt 19,0%, độ nhớt 19,6 mPa.s, màu sắc sáng với giá trị L^* là 87,5. Cố định nồng độ 0,10% pepsin, ngâm mẫu trong 48 giờ cho hiệu suất thu hồi collagen cao nhất đạt 20,8%, độ nhớt 18,6 mPa.s và độ hòa tan cực đại ở pH 1 - 4 và nồng độ NaCl từ 0,2 - 0,4 M. Dựa vào phổ FTIR cho thấy mối liên 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 có đầy đủ nhóm chức năng của collagen loại I. Hàm lượng imino axit chiếm 20,0% nên collagen có nhiệt độ biến tính lên đến 34°C. Vì vậy, có thể tận dụng da và vây cá lóc là nguồn nguyên liệu để sản xuất collagen.

Từ khóa: Collagen, da và vây cá lóc, pepsin, phổ FTIR, tiền xử lý.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá lóc là đối tượng nuôi quan trọng ở đồng bằng sông Cửu Long vì sinh trưởng nhanh, giá thành cao, thị trường tiêu thụ ổn định, nên sản lượng ngày càng tăng. Cùng với sự phát triển mạnh mẽ nghề nuôi cá lóc thì các sản phẩm chế biến từ cá lóc như khô, mắm, chà bông, chả cá lóc... ngày càng gia tăng [1]. Tuy nhiên, quá trình sản xuất sản phẩm cá sẽ có một lượng lớn phụ phẩm loại ra gồm đầu, xương, da, vây, vảy, nội tạng... đây được xem là nguồn nguyên liệu dồi dào để sản xuất collagen.

Nguồn nguyên liệu sản xuất collagen trước đây chủ yếu từ da, xương, chân và sụn của động vật trên cạn như bò, heo và các loại gia cầm. Tuy nhiên, sự xuất hiện của bệnh bò điên và lở mồm long móng ở heo đã dẫn đến sự suy giảm nguồn collagen từ động vật trên cạn. Phụ phẩm thủy sản như vây, da và xương cá là nguồn nguyên liệu tốt để sản xuất collagen thay thế nguyên liệu từ động vật trên cạn [2]. Do đó, Lê Thị Minh Thủy và Trương Thị Mộng Thu (2020) [3] đã nghiên cứu chiết tách collagen từ da cá thát lát còm (*Chitala ornata*) bằng axit acetic.

Bên cạnh đó, Zhang và cs (2019) [4] nghiên cứu kết hợp axit acetic với pepsin để tách chiết collagen từ vây cá chép (*Cyprinus carpio* Line). Vì vậy, nghiên cứu điều kiện tiền xử lý và chiết tách collagen từ da và vây cá lóc bằng pepsin được thực hiện nhằm tìm được nồng độ pepsin và thời gian chiết tách collagen thích hợp nhất để đạt được hiệu suất thu hồi và chất lượng collagen tốt nhất.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chuẩn bị mẫu

Da và vây cá lóc thu mua tại cơ sở khô cá lóc 7 Chóp (huyện Thoại sơn, tỉnh An Giang), cấp đông ở $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ và đóng thùng chuyển về phòng thí nghiệm Bộ môn Chế biến thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ không quá 6 giờ. Da cá được loại thịt, mỡ và vây còn sót lại, rửa sạch, để ráo, cắt nhỏ với kích thước $2 \times 1 \text{ cm}$. Vây được rửa sạch, để ráo. Da và vây cá lóc sau xử lý bảo quản đông nhiệt độ $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ cho đến khi tiến hành thí nghiệm.

Pepsin từ dạ dày lợn (Merck, Đan Mạch) có hoạt độ 0,7 FIP-U/mg, được nhập khẩu và phân phối bởi Công ty TNHH TM & DV XNK Thành Mỹ (thành phố Cần Thơ). Pepsin hoạt động ổn định trong môi trường axit (pH 1,5 - 2) và nhiệt độ trong khoảng $37 - 42^\circ\text{C}$ [5].

¹ Nghiên cứu sinh ngành Công nghệ thực phẩm khóa 2020, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

³ Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

*Email: ttmthu@ctu.edu.vn

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ và thời gian ngâm EDTA-2Na đến khả năng khử khoáng từ vảy cá lóc

Tiến hành thí nghiệm: Vảy cá được xử lý như mục 2.1, sau đó ngâm trong dung dịch EDTA-2Na với 3 mức nồng độ lần lượt là 0,6; 0,8 và 1 M và 3 mốc thời gian là 20, 24 và 28 giờ. Cố định tỷ lệ vảy/dung dịch EDTA-2Na (w/v) là 1: 8 ở 4°C [6]. Sau khi ngâm vảy cá được rửa sạch cho đến pH đạt trung tính, phơi ráo và phân tích hàm lượng khoáng (%) còn lại. Từ đó chọn ra được nồng độ và thời gian ngâm EDTA-2Na tốt nhất. Khối lượng mẫu là 50 g/mẫu.

2.2.2. Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ pepsin đến khả năng chiết tách collagen từ da và vảy cá lóc

Tiến hành thí nghiệm: Vảy cá xử lý trong EDTA-2Na theo nồng độ và thời gian tối ưu ở thí nghiệm 1. Da cá được xử lý như mục 2.1, ngâm trong dung dịch 0,1 M NaOH trong 6 giờ ở 4°C với tỷ lệ da cá/dung dịch (w/v) là 1 : 8 để loại các hợp chất protein phi collagen [6]. Tiến hành trộn da cá và vảy cá theo tỷ lệ 1 : 1 (w/w) và chiết tách collagen trong dung dịch pepsin (pha trong dung dịch đệm axit acetic 0,6 M) với 5 mốc nồng độ pepsin là 0,05%; 0,10%; 0,15%; 0,20% và 0,25%. Cố định tỷ lệ hỗn hợp da vảy/dung dịch pepsin (w/v) là 1 : 20, ở 4°C trong 48 giờ. Mẫu sau khi ngâm pepsin lọc lấy dịch chiết, dịch chiết được ly tâm với tốc độ 8.000 vòng/phút trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Điều chỉnh pH bằng cách thêm Tris (hydroxymethane aminomethane) đến khi pH đạt từ 6,8-7,2. Tạo kết tủa bằng cách thêm NaCl 2,6 M, sau đó thu kết tủa bằng cách ly tâm với tốc độ 8.000 vòng/phút trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Kết tủa được hoà tan với axit acetic 0,6 M, thẩm tách trong axit acetic 0,1 M và nước cất, sau đó sấy đông khô để thu collagen [6]. Mẫu collagen được đo màu, đo độ nhớt, cân để tính hiệu suất thu hồi, phân tích phổ FTIR. Từ đó chọn ra nồng độ enzyme pepsin thích hợp nhất. Khối lượng mỗi mẫu là 30 g (15 g da và 15 g vảy).

2.2.3. Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian chiết tách collagen từ da và vảy cá lóc bằng pepsin

Tiến hành thí nghiệm: Chọn nồng độ enzyme pepsin thích hợp từ thí nghiệm 2, tiến hành thí nghiệm 3. Da và vảy cá được xử lý và thực hiện các công đoạn tương tự thí nghiệm 2, sau đó ngâm trong dung dịch pepsin với 5 mốc thời gian lần lượt là 12,

24, 36, 48 và 60 giờ. Mẫu sau khi ngâm được thực hiện các bước tiếp theo tương tự như thí nghiệm 2 để thu collagen. Mẫu collagen được đo màu, đo độ nhớt, cân để tính hiệu suất thu hồi, phân tích phổ FTIR. Từ đó chọn ra thời gian ngâm pepsin thích hợp nhất. Khối lượng mỗi mẫu là 30 g (15 g da và 15 g vảy).

Mẫu collagen tối ưu được phân tích thành phần axit amin, đo độ hoà tan ở các pH và NaCl khác nhau và nhiệt độ biến tính.

2.3. Phương pháp phân tích

Xác định hàm lượng khoáng bằng phương pháp nung theo AOAC (2000) [7].

Hiệu suất thu hồi collagen bằng phương pháp kiểm tra khối lượng, $H = \frac{Y}{X} \times 100$ với X (g) là khối lượng của hỗn hợp da và vảy cá sau khi xử lý; Y (g) là khối lượng collagen sau khi sấy.

Màu sắc (L^* , a^* , b^*): mẫu collagen được trải đều và đủ dày trên một tờ giấy trắng và đo màu bằng thiết bị Colorimeter PCE-CSM 2 (Trung Quốc). Tổng sự chênh lệch màu sắc (ΔE) giữa mẫu collagen và mẫu tiêu chuẩn được xác định bởi công thức. Mẫu tiêu chuẩn có các giá trị $L^* = 93,5$; $a^* = -0,29$ và $b^* = 1,57$.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Độ nhớt: Collagen hòa tan trong 0,1 M axit acetic để đạt được nồng độ cuối cùng là 6,67% và tiến hành đo độ nhớt ở nhiệt độ phòng bằng máy Brookfield DV.

Thành phần acid amin được xác định bằng thiết bị HPLC theo phương pháp của Thuy và cs (2014) [6]. 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, lọc bằng màng cellulose. Dịch lọc được sử dụng để phân tích thành phần axit amin bằng hệ thống HPLC.

Độ hòa tan của collagen ở các từ pH 1-10: pha dung dịch 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 các dung dịch collagen có pH từ 1-10 và thể tích cuối cùng được điều chỉnh đến 10 mL bằng nước cất. Độ hòa tan của collagen trong các nồng độ muối NaCl từ 0 đến 1,2 M theo phương pháp của Thuy và cs (2014) [6]: pha dung dịch 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. Sau đó, hỗn hợp collagen được đi ly tâm với tốc độ 8.000 vòng trong 20 phút ở 4°C thu được phần

dịch lỏng. Hàm lượng protein trong dịch lỏng được xác định theo phương pháp Lowry và cs (1951) [8] sử dụng huyết thanh bò làm chuẩn, được đo trên máy so màu quang phổ UV, bước sóng 750 nm, từ đó tính được độ hòa tan của collagen [6].

Nhiệt độ biến tính được xác định bằng phương pháp quét vi sai nhiệt lượng DSC (Pyris 1; PerkinElmer Co., Ltd., Yokohama, Japan) được mô tả bởi Thụy và cs (2014) [6] với một vài điều chỉnh nhỏ. Tỷ lệ mẫu collagen/dung dịch axit acetic 0,1 M là 1:40 (w/v), phân tích được thực hiện với tốc độ quét 1°C/phút ở nhiệt độ quét 20-50°C.

Quang phổ hồng ngoại (phổ FTIR) được ghi nhận lại từ máy quang phổ ALPHA FTIR của Bruker Optics trong phạm vi bước sóng từ 4.000 đến 500 cm⁻¹ [6]. Dữ liệu được thực hiện bởi chương trình phần mềm OPUS 7.5 (Bruker, Ettingen, Đức).

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập tính trung bình ± độ lệch chuẩn bằng chương trình Microsoft Excel 2013. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức của các yếu tố 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. Ảnh hưởng của thời gian ngâm và nồng độ dung dịch EDTA-2Na đến khả năng khử khoáng từ vảy cá lóc

Hàm lượng khoáng còn lại trong vảy sau khi ngâm dung dịch EDTA-2Na qua các mốc thời gian và nồng độ khác nhau được trình bày ở bảng 1.

Từ bảng 1 cho thấy, khi tăng thời gian ngâm và nồng độ EDTA-2Na thì hàm lượng khoáng còn lại trong vảy cá lóc giảm, cụ thể từ 27,6% xuống còn 1,47% khử được 94,7% khoáng trong nguyên liệu. Nghiệm thức 24 giờ và nồng độ EDTA-2Na 0,8 M, hàm lượng khoáng còn lại trong vảy cá lóc là 1,99% (loại được 92,8% khoáng) và khác biệt không có ý nghĩa thống kê với mẫu 28 giờ nồng độ EDTA-2Na 0,8 M. Nguyên nhân EDTA-2Na cho kết quả khử

khoáng tốt là do EDTA-2Na có khả năng tạo phức mạnh mẽ với hầu hết các ion kim loại nên chúng có thể loại bỏ Ca, Zn và các ion kim loại khác [9]. Nồng độ EDTA-2Na và thời gian khử khoáng có thể khác nhau tùy thuộc vào loại nguyên liệu ban đầu. Đối với hỗn hợp vảy cá mòi, cá đối, cá chẽm, cá sòng và cá chuồn cần sử dụng EDTA-2Na 0,5 M trong 24 giờ cho hiệu quả khử khoáng đạt 96,5% [6]. Trong nghiên cứu này, nồng độ EDTA-2Na và thời gian ngâm thích hợp được chọn là 0,8 M trong 24 giờ với hàm lượng khoáng còn lại 1,99% loại được 92,8% khoáng.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian ngâm và nồng độ EDTA-2Na đến hàm lượng khoáng

Thời gian (giờ)	Nồng độ EDTA-2Na (M)	Hàm lượng khoáng (%)
Đối chứng	-	27,6±0,54
20	0,6	3,27±0,16 ^a
20	0,8	2,95±0,15 ^b
20	1,0	2,36±0,06 ^d
24	0,6	2,72±0,15 ^c
24	0,8	1,99±0,14 ^e
24	1,0	1,65±0,14 ^f
28	0,6	2,45±0,13 ^d
28	0,8	1,83±0,14 ^e
28	1,0	1,47±0,19 ^g

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

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ pepsin đến hiệu suất thu hồi, độ nhớt, màu sắc và phổ FTIR của collagen chiết tách từ da và vảy cá lóc

3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ pepsin đến hiệu suất thu hồi, độ nhớt và màu sắc collagen

Hiệu suất thu hồi (H), độ nhớt, màu sắc của collagen từ da và vảy cá lóc theo các nồng độ pepsin khác nhau được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ pepsin đến H, độ nhớt và màu sắc của collagen

Nồng độ (%)	L*	a*	b*	ΔE*	H (%)	Độ nhớt (mPa.s)
0,05	82,2±1,78 ^c	2,15±0,10 ^a	5,09±0,12 ^c	15,3±1,73 ^a	12,4 %±0,82 ^d	17,4±1,19 ^c
0,10	87,5±1,85 ^a	1,75±0,23 ^{bc}	6,17±0,82 ^{ab}	10,8±1,40 ^c	19,0%±0,69 ^{ab}	19,6±0,85 ^{ab}
0,15	87,7±2,09 ^a	1,41±0,26 ^c	5,29±0,14 ^{bc}	10,1±2,00 ^c	19,6%±1,23 ^a	20,1±0,49 ^a
0,20	85,1±0,92 ^b	1,93±0,07 ^{ab}	6,37±0,58 ^a	12,9±0,92 ^b	17,1%±0,68 ^{bc}	18,3±0,96 ^{bc}
0,25	82,5±0,89 ^c	1,61±0,13 ^{bc}	6,09±0,31 ^{ab}	15,2±0,73 ^a	15,3%±1,20 ^c	15,0±0,25 ^d

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

Từ bảng 2 cho thấy, khi tăng nồng độ pepsin từ 0,05% lên 0,15% thì hiệu suất thu hồi collagen và độ nhớt tăng tương ứng từ 12,4% và 17,4 mPa.s lên 19,6% và 20,1 mPa.s. Tuy nhiên, hiệu suất thu hồi và độ nhớt có xu hướng giảm khi tăng nồng độ pepsin đến 0,25%. Nghiệm thức 0,10% pepsin cho hiệu suất thu hồi collagen là 19,0% và độ nhớt là 19,6 mPa.s khác biệt không có ý nghĩa thống kê với mẫu 0,15% pepsin. Theo Skierka và Sadowska (2007) [10] thì 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 và hòa tan vào dung dịch. Hơn nữa, Liu và cs (2015) [5] còn cho rằng pepsin chỉ phá vỡ các liên kết ngang ở vùng telopeptide mà không gây ảnh hưởng đến cấu trúc xoắn bộ ba của phân tử collagen. Vì vậy, khi tăng nồng độ pepsin thì hiệu suất thu hồi và độ nhớt collagen tăng. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ enzyme quá cao sẽ thúc đẩy việc cắt mạch mạnh mẽ, cấu trúc collagen bị thay đổi nên hiệu suất thu hồi và độ nhớt giảm. Hiệu suất thu hồi collagen ở nghiên cứu này cao hơn so với các nghiên cứu trước đây của Thụy và cs (2014) [6], khi chiết tách vảy cá bằng phương pháp axit acetic thì hiệu suất thu hồi collagen của cá thu Nhật là 1,5%, cá đối xám là 0,43%, cá thu Việt Nam là 0,64% và hiệu suất thu hồi collagen từ da cá hồi bằng axit acetic 0,25 M trong 24 giờ là 10% [11]. Như vậy, tùy vào loại nguyên liệu và điều kiện tách chiết mà hiệu suất thu hồi khác nhau.

Bên cạnh hiệu suất thu hồi và độ nhớt thì màu sắc của collagen cũng ảnh hưởng rất lớn đến tính ứng dụng của collagen. Từ bảng 2 cho thấy, khi nồng độ pepsin tăng từ 0,05% lên 0,15%, độ sáng (L^*) của collagen từ da và vảy cá lóc tăng từ 82,2 lên 87,7. Ở nồng độ 0,10% pepsin có độ sáng (L^*) cao 87,5 khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với mẫu 0,15% pepsin. Bên cạnh đó cường độ sẫm màu (ΔE^*) giảm xuống từ 15,3 xuống còn 10,1. Tuy nhiên, độ sáng L^* của mẫu collagen giảm và cường độ sẫm màu (ΔE^*) lại tăng khi nồng độ pepsin tăng đến 0,25%. Nguyên nhân có thể do nồng độ enzyme cao thúc đẩy việc phân cắt mạch mạnh mẽ và giải phóng ra các axit amino tự do, các axit amino này có thể tham gia phản ứng hóa nâu không enzyme (maillard) với các nhóm khác nhau như đường khử, carbohydrate trong nguyên liệu và gây sẫm màu cho collagen.

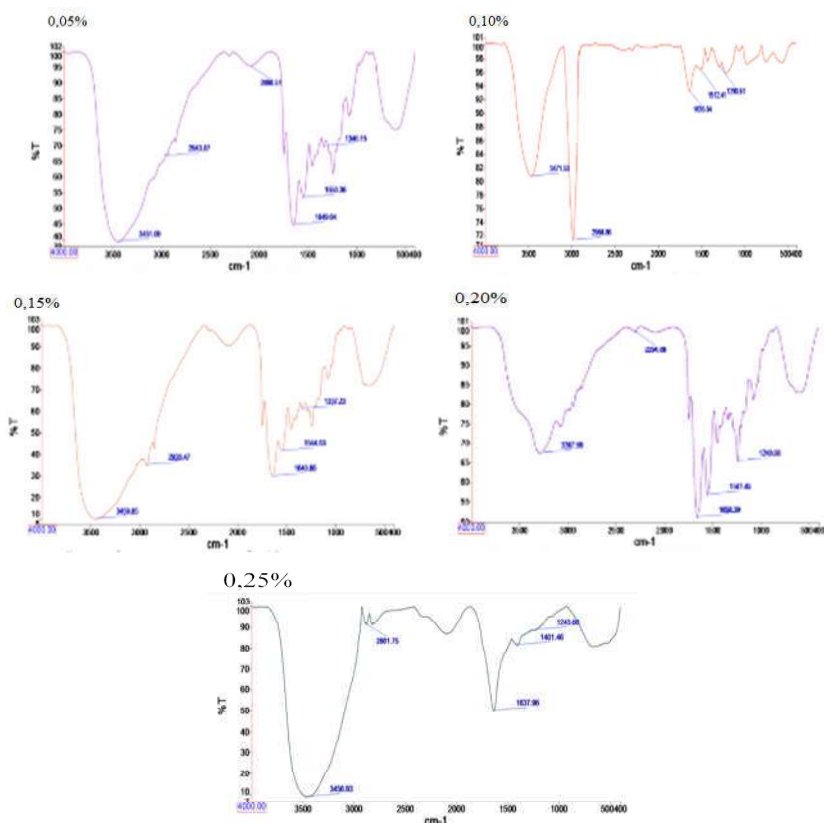
3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ pepsin đến phổ FTIR của collagen từ da và vảy cá lóc

Phổ FTIR của các mẫu collagen từ da và vảy cá lóc được chiết tách ở các nồng độ pepsin khác nhau được trình bày ở hình 1.

Quang phổ hồng ngoại (phổ FTIR) giúp nhận diện các nhóm chức năng có trong phân tử collagen. Phổ FTIR của collagen loại I, được đặc trưng bởi các dải Amide A ($3.400-3.440\text{ cm}^{-1}$); Amide I ($1.600-1.660\text{ cm}^{-1}$); Amide II ($\sim 1.500\text{ cm}^{-1}$); Amide III ($1.320-1.220\text{ cm}^{-1}$). Amide A thể hiện tần số giãn của nhóm NH (nằm ở mạch bên của phân tử collagen) liên kết hydrogen với phân tử nước. Dao động giãn của nhóm NH tự do xảy ra ở vùng $3.400 - 3.440\text{ cm}^{-1}$, khi nhóm NH tham gia tạo liên kết hydrogen với nước, tần số dao động sẽ giảm, số sóng $< 3.400\text{ cm}^{-1}$. Amide I biểu thị dao động giãn của nhóm $C=O$ hoặc liên kết hydrogen với nhóm COO^- . Amide II biểu thị dao động uốn của nhóm NH liên kết với dao động giãn của nhóm CN, dao động giãn bất đối xứng của nhóm COO^- , dao động xoắn của nhóm CH_2 . Amide III biểu thị dao động giãn CO và dao động uốn của nhóm NH trên cùng mặt phẳng, dao động này liên quan tới tương tác giữa các phân tử trong collagen. Tỷ số cường độ tính theo chiều cao đỉnh amide III/chiều cao đỉnh tại vị trí số sóng 1.454 cm^{-1} được dùng để giải thích cấu trúc xoắn bộ ba của collagen, tỷ số này ≈ 1 collagen ở dạng cấu trúc xoắn bộ ba nguyên thể [4].

Nhìn chung, ở các nồng độ pepsin khác nhau từ 0,05%; 0,10%; 0,15%; 0,20%; 0,25% các mẫu collagen thu nhận được phổ FTIR có bước sóng đều nằm trong vùng amide A lần lượt là 3451,09; 3471,53; 3459,85; 3287,59; 3456,93 cm^{-1} ; Amide B (2943,07; 2966,86; 2928,47; 2294,89; 2981,75 cm^{-1}); amide I (1649,64; 1635,04; 1640,88; 1658,39; 1637,96 cm^{-1}); amide II (1550,36; 1512,41; 1544,53; 1547,45; 1401,46 cm^{-1}) và amide III (1340,15; 1290,51; 1337,23; 1240,88; 1243,80 cm^{-1}). Thông qua dữ liệu phân tích phổ FTIR cho thấy, collagen được chiết tách từ da và vảy cá lóc ở các nồng độ pepsin khác nhau có đầy đủ các nhóm chức năng của collagen loại I.

Từ kết quả tính hiệu suất thu hồi, đo độ nhớt, màu sắc và phân tích phổ FTIR của collagen cho thấy nghiệm thức 0,10% pepsin được chọn là thích hợp nhất.



Hình 1. Phổ FTIR của collagen ở các nồng độ pepsin khác nhau

3.3. Ảnh hưởng của thời gian ngâm pepsin đến hiệu suất thu hồi, độ nhớt, màu sắc và phổ FTIR của collagen chiết tách từ da và vây cá lóc

3.3.1. Ảnh hưởng thời gian ngâm pepsin đến hiệu suất thu hồi, độ nhớt và màu sắc collagen

Hiệu suất thu hồi (H), độ nhớt và màu sắc của collagen chiết tách từ da và vây cá lóc ở các thời gian ngâm pepsin khác nhau được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian ngâm pepsin đến H, độ nhớt và màu sắc collagen

Thời gian (giờ)	L*	a*	b*	ΔE^*	H (%)	Độ nhớt (mPa.s)
12	63,2±0,72 ^d	3,00±0,10 ^a	10,9±0,22 ^a	35,0±0,74 ^a	6,09±0,25 ^c	12,3±0,91 ^d
24	76,2±1,03 ^c	3,02±0,19 ^a	5,93±0,27 ^c	21,3±1,04 ^b	10,3±1,28 ^d	14,6±0,53 ^c
36	78,8±1,01 ^b	3,19±0,10 ^a	5,20±0,39 ^c	18,8±0,98 ^c	14,7±1,23 ^c	16,9±0,87 ^b
48	87,9±1,25 ^a	1,93±0,08 ^c	5,41±0,61 ^c	11,3±0,56 ^e	20,8±0,56 ^a	18,6±0,46 ^a
60	86,5±0,85 ^a	2,34±0,33 ^b	7,39±0,75 ^b	13,0±0,71 ^d	18,3±1,40 ^b	20,1±0,95 ^a

Ghi chú: Số liệu 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 bảng 3 cho thấy, khi tăng thời gian ngâm pepsin từ 12 giờ lên 48 giờ thì hiệu suất thu hồi và độ nhớt collagen từ da và vây cá lóc tăng từ 6,09% và 12,3 mPa.s lên 20,8% và 18,6 mPa.s. Tuy nhiên, tiếp tục tăng thời gian ngâm pepsin lên 60 giờ thì hiệu suất thu hồi giảm xuống 18,3% và độ nhớt tăng nhẹ. Thời gian phản ứng phải đảm bảo đủ để pepsin có thể tác động lên hai đầu telopeptide của sợi collagen làm cho collagen dễ dàng tách ra, vì vậy hiệu suất thu hồi và độ nhớt tăng khi tăng thời gian ngâm [10]. Tuy

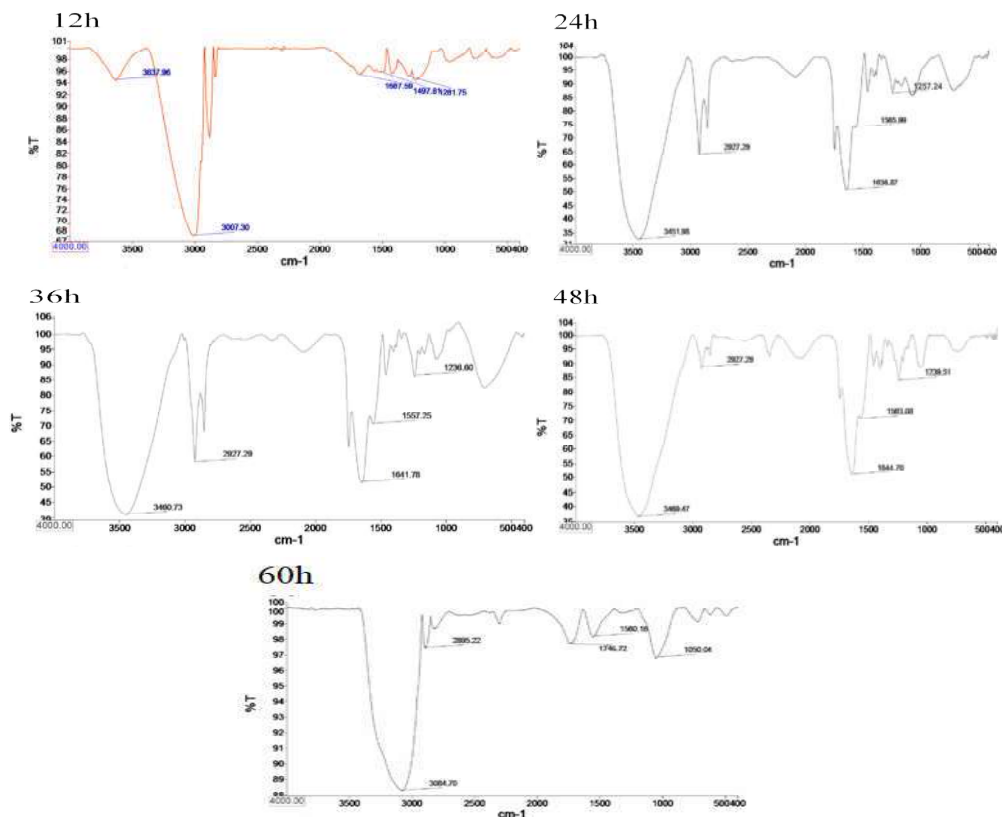
nhiên, kéo dài thời gian quá mức thì enzyme cắt mạch mạnh mẽ, cấu trúc collagen bị thay đổi dẫn đến hiệu suất thu hồi và độ nhớt giảm [12]. Kết quả ở bảng 3 cho thấy, các giá trị L* của collagen từ da và vây cá lóc tăng tương ứng từ 63,2 lên 87,9 khi thời gian ngâm pepsin tăng từ 12 giờ lên 48 giờ. Bên cạnh đó cường độ sẫm màu (ΔE^*) giảm từ 35,0 xuống 11,3. Ở mốc 48 giờ cho kết quả L* cao, ΔE^* là nhỏ nhất thể hiện màu sắc collagen sáng nhất. Kéo dài thời gian ngâm thì độ sáng L* tăng. Điều này có thể

lý giải do thời gian chiết rút ngắn chỉ loại được sắc tố chưa tách chiết hoàn toàn collagen trong da và vảy. Tuy nhiên, khi tăng thời gian ngâm quá mức lên 60 giờ thì L^* giảm xuống 86,5 và ΔE^* tăng lên 13,0. Nguyên nhân là do kéo dài thời gian ngâm quá mức

các mạch phân tử bị cắt nhiều ảnh hưởng đến màu sắc collagen.

3.3.2. Ảnh hưởng của thời gian ngâm pepsin đến phổ FTIR của collagen từ da và vảy cá lóc

Phổ FTIR của collagen ở các thời gian ngâm pepsin khác nhau được thể hiện trên hình 2.



Hình 2. Phổ FTIR của collagen ở các thời gian ngâm pepsin khác nhau

Nhìn chung, ở các thời gian ngâm pepsin khác nhau từ 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ và 60 giờ các mẫu collagen thu nhận được có phổ FTIR có bước sóng đều nằm trong vùng amide A lần lượt là 3637,96; 3451,98; 3460,73; 3469,47; 3084,70 cm^{-1} ; Amide B (3007,30; 2927,29; 2927,29; 2927,29; 2895,22 cm^{-1}); amide I (1687,59; 1638,87; 1641,78; 1644,70; 1746,72 cm^{-1}); amide II lần lượt là 1497,81; 1565,99; 1557,25; 1563,08; 1560,16 cm^{-1} và amide III lần lượt là 1281,75; 1257,24; 1236,60; 1239,51; 1050,04 cm^{-1} . Thông qua các dữ liệu đo quang phổ FTIR, collagen được chiết tách từ da và vảy cá lóc ở các mốc thời gian khác nhau đều có các nhóm chức năng của collagen loại I.

Như vậy, từ kết quả phân tích hiệu suất thu hồi, độ nhớt, màu sắc, phổ FTIR cho thấy điều kiện chiết tách collagen bằng pepsin với nồng độ 0,10% pepsin trong thời gian 48 giờ ở 4°C với tỉ lệ hỗn hợp da vảy/dung dịch pepsin (w/v) là 1 : 20 cho hiệu suất thu hồi cao là 20,8% có màu sắc, độ nhớt và phổ FTIR

tốt nhất nên được chọn là thông số tối ưu cho quá trình chiết tách collagen từ da và vảy cá lóc bằng pepsin.

3.4. Chất lượng collagen thành phẩm

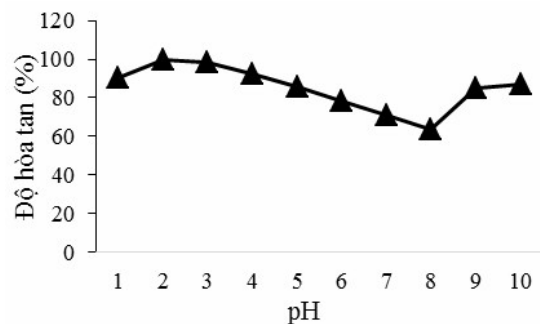
3.4.1. Độ hòa tan của collagen từ da và vảy cá lóc

Độ hòa tan của mẫu collagen từ da và vảy cá lóc ở pH từ 1 đến 10 (Hình 3) và NaCl ở các nồng độ từ 0 đến 1,2 M (Hình 4).

Sự thay đổi độ hòa tan của collagen ở các pH (1 - 10) được thể hiện ở hình 3. Từ đồ thị cho thấy pH từ 1 đến 4 thì collagen có độ hòa tan cao khoảng 80% đến 100%. Khi pH xa điểm đẳng điện, các axit amino tích điện cùng dấu làm gia tăng lực đẩy lẫn nhau trong phân tử protein (thuận lợi cho sự hòa tan), dẫn đến sự mở rộng chuỗi protein (thuận lợi cho khả năng kết hợp với nước) [2]. Tuy nhiên pH từ 6 đến 8 thì độ hòa tan của collagen có xu hướng giảm, là do gần vùng đẳng điện nên điện tích protein rất nhỏ đồng thời xảy ra hiện tượng đối kháng làm cho tính

chất chức năng của collagen giảm [2]. Độ hòa tan của collagen có khuynh hướng tăng nhẹ ở pH 9 – 10 có thể là do lực đẩy giữa các chuỗi trong phân tử collagen vì pH > pI [4].

Mẫu collagen từ da và vảy cá lóc có độ hòa tan ở nồng độ NaCl từ 0,2 -1,2 M được thể hiện trong hình 4. Có thể thấy độ hòa tan cao (trên 80%) ở các nồng độ muối từ 0,2 đến 0,4 M. Khi nồng độ NaCl cao hơn 0,6 M thì độ hòa tan có xu hướng giảm mạnh và khi tăng lên 1,2 M thì chỉ còn khoảng 36,7%. Điều này



Hình 3. Độ hòa tan của mẫu collagen từ da và vảy cá lóc ở pH từ 1 đến 10

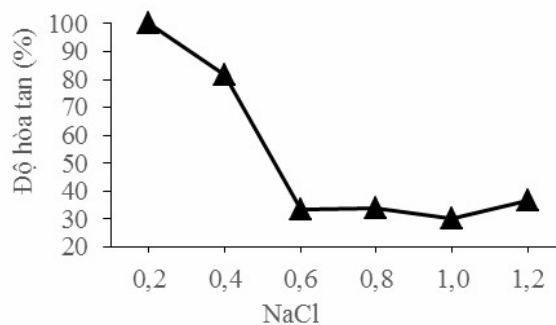
3.4.2. Thành phần axit amin của collagen từ da và vảy cá lóc

Kết quả thành phần axit amin được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Thành phần axit amin của collagen chiết tách từ da và vảy cá lóc

STT	Thành phần axit amin	Hàm lượng (đơn vị/1.000 đơn vị)
1	Aspartic acid	39
2	Threonine	21
3	Serine	39
4	Glutamic acid	76
5	Glycine	330
6	Alanine	130
7	Valine	15
8	Cystein	8
9	Methionine	16
10	Tryptophan	0
11	Isoleucine	7
12	Leucine	16
13	Tyrosine	4
14	Phenylalanine	10
15	Hydrolysine	5
16	Lysine	23
17	Histidine	6
18	Arginine	55
19	Hydroxyproline	89
20	Proline	111

chứng tỏ rằng khi nồng độ NaCl càng cao thì độ hòa tan sẽ càng thấp và ngược lại. 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 [2]. 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 dẫn đến độ hòa tan cao [12].



Hình 4. Độ hòa tan của mẫu collagen từ da và vảy cá lóc ở các nồng độ NaCl từ 0 - 1,2

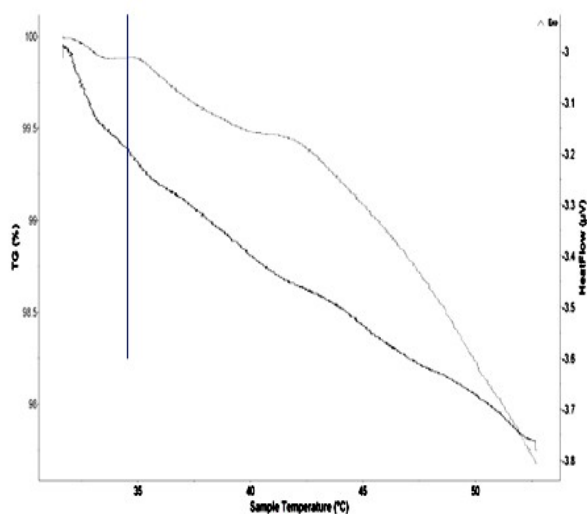
Thành phần axit amin của collagen từ da và vảy cá lóc tương đối giống với các collagen loại I khác, điểm đặc trưng nhất của collagen là có hàm lượng glycine rất cao $\geq 30\%$ [13]. Từ kết quả phân tích thành phần axit amin ở bảng 4 cho thấy, glycine là axit amin được tìm thấy nhiều nhất trong collagen từ da và vảy cá lóc chiếm 33% trên tổng số axit amin. Kết quả này gần giống với collagen loại I từ da cá chép là 33,2% [13] và da cá chêm là 33,1% [14]. Ngoài ra, collagen từ da và vảy cá lóc bao gồm các loại axit amin khác nhau như proline, alanine, hydroxyproline và axit glutamic tương tự như collagen từ các loài khác [13]. Không phát hiện ra thành phần axit amin loại tryptophan trong collagen từ da và vảy cá lóc. Hàm lượng axit imino (proline và hydroxyproline) trong collagen có mối liên hệ chặt chẽ đến cấu trúc và nhiệt độ biến tính của collagen. Hàm lượng axit imino của collagen từ da và vảy cá lóc là 20,0% cao hơn da cá chép là 19,0% [13], da cá chêm là 19,6% [14].

3.4.3. Nhiệt độ biến tính của collagen từ da và vảy cá lóc

Nhiệt độ biến tính của collagen từ da và vảy cá lóc được thể hiện trong hình 5.

Kết quả ở hình 5 cho thấy nhiệt độ biến tính của collagen từ da và vảy cá lóc là 34°C cao hơn so với da cá thát lát 33,1°C [3]. Hàm lượng axit imino trong

collagen càng cao thì nhiệt độ biến tính càng tốt. Như vậy axit imino có mối quan hệ chặt chẽ với nhiệt độ biến tính của collagen [6].



Hình 5. Nhiệt độ biến tính của collagen

4. KẾT LUẬN

Tiền xử lý để loại khoáng bằng cách ngâm vẩy cá lóc trong dung dịch EDTA-2Na 0,8 M trong thời gian 24 giờ cho hàm lượng khoáng còn lại là 1,99% loại được 92,8% khoáng. Chiết tách collagen từ da và vẩy cá lóc được thực hiện với pepsin 0,10% được pha trong dung dịch đệm axit acetic 0,6 M trong thời gian 48 giờ cho hiệu suất thu hồi collagen cao là 20,8%, màu sắc, độ nhớt, phổ FTIR của collagen tốt.

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”.

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 Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn, mã số VINIF.2021.TS.093.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thanh Trúc, Nguyễn Văn Mười (2019). Nghiên cứu trích ly lipase (EC 3.1.1.3) từ nội tạng cá lóc nuôi. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55 (2), 174-184.

2. Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessaguan, 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.

3. 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.

4. 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.

5. Liu, D., Zhang, X., Li, T., Yang, H., Zhang, H., Regensteinc, J. M., & Zhou, P. (2015). Extraction and characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Bioscience*, 9, 68-74.

6. 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.

7. AOAC (2020). *Official methods of Analysis of AOAC international*, (20th ed.). George W.Latimer, Jr (Eds), Volume I.

8. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., R. J & Randall (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 256-275.

9. Wang, Y. & Regensteinc, J. M. (2009). Effect of EDTA, HCl and Citric Acid on Ca salt removal from asian (*sliver*) carp scales prior to gelatin extraction. *Journal of Food Science*, 74(6), 426-431.

10. 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>

11. 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.

12. 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, 97–105.
13. 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.
14. 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.

STUDY ON THE PRE-TREATMENT AND COLLAGEN EXTRACTION CONDITIONS FROM SNAKEHEAD FISH (*Channa striata*) SKIN AND SCALES BY USING PEPSIN

Truong Thi Mong Thu^{1,2,*}, Le Thi Minh Thuy², Tran Thanh Truc³

¹*PhD student of Food Technology course 2020, Can Tho University*

²*College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University*

³*College of Agriculture, Can Tho University*

**Email: ttmtthu@ctu.edu.vn*

Summary

Study on the pre-treatment and collagen extraction conditions by using pepsin was performed to produce good collagen quality. Research includes three experiments: (i) effects of EDTA-2Na concentration and soaking time on the demineralizing ability from snakehead scale; (ii) effects of pepsin concentration and (iii) pepsin soaking time on the collagen extraction process from snakehead scale and skin mixture. The results showed that snakehead scale treated in 0.8 M EDTA-2Na solution for 24 hours gave the best demineralizing efficiency, the remaining amount of minerals was 1.99%. After treatment, samples were extracted with 0.10% pepsin which gave high collagen yield of 19.0%, viscosity of 19.6 mPa.s and bright color of collagen with L* of 87.5. Sample was extracted in 0.10% pepsin for 48 hours which gave highest collagen yield of 20.8%, viscosity of 18.6 mPa.s and maximum solubility at pH 1- 4 and NaCl concentration from 0.2 - 0.4 M. Base on the FTIR spectral analysis showed the close relationship between the number of wavelengths in the amide I and amide III regions, especially the stability of the triple helix structure, shows that collagen has a full functional group of type I collagen. Imino acid content account for 20.0%, so that collagen has denaturation temperature up to 34°C. Therefore, snakehead skin and scales can use as raw materials for collagen production.

Keywords: *Collagen, FTIR spectrum, pepsin, pre-treatment, snakehead fish skin and scales.*

Người phản biện: TS. Đỗ Văn Nam

Ngày nhận bài: 3/3/2022

Ngày thông qua phản biện: 30/3/2022

Ngày duyệt đăng: 22/7/2022