

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

Trương Thị Mộng Thu^{1,3*}, Trần Thanh Trúc², Lê Thị Minh Thủy³

TÓM TẮT

Nghiên cứu điều kiện tiền xử lý và chiết tách collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc bằng acetic acid được thực hiện nhằm sản xuất collagen đạt chất lượng tốt. Kết quả cho thấy, da cá lóc được xử lý bằng dung dịch NaOH 0,1 M trong 6 giờ cho hiệu quả loại protein phi collagen tốt nhất, hàm lượng protein thô còn lại 24,5%. Hỗn hợp da và vây cá lóc được chiết tách collagen bằng 0,6 M acetic acid cho hiệu suất thu hồi collagen đạt 2,090%, màu sắc sáng với giá trị L^* là 81,4. Cố định nồng độ 0,6 M acetic acid, ngâm hỗn hợp da và vây cá lóc trong 3 ngày cho hiệu suất thu hồi collagen cao nhất, đạt 3,180% và giá trị L^* đạt 83,6. Collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc hòa tan cực đại ở pH 2 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 acid chiếm 22,6% nên collagen có nhiệt độ biến tính lên đến 35,78°C. Từ các kết quả trên cho thấy, có thể tận dụng nguồn phụ phẩm da và vây từ quá trình chế biến cá lóc làm nguồn nguyên liệu để sản xuất collagen, vừa gia tăng giá trị nguồn nguyên liệu và giúp giảm ô nhiễm môi trường do phụ phẩm cá thải ra.

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

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá lóc (*Channa striata*) là loài cá nước ngọt có chất lượng thịt ngon và giá trị dinh dưỡng cao nên được người tiêu dùng ưa chuộng [1]. Do đó, sản phẩm chế biến từ cá lóc cũng ngày càng phát triển như khô, mắm, chà bông. Tuy nhiên, trong quá trình chế biến cá sẽ có một lượng phụ phẩm loại ra gồm đầu, xương, da, vây, vảy, nội tạng. Trong đó da và vây cá chiếm khoảng 17 - 20%, đây là nguồn nguyên liệu dồi dào để nghiên cứu và sản xuất collagen [2].

Nguồn nguyên liệu 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, tín ngưỡng tôn giáo đã ảnh hưởng phần nào đến việc sản xuất collagen có nguồn gốc từ động vật có vú. Chính vì thế cần tìm nguồn nguyên liệu để sản xuất collagen an toàn và nguy cơ truyền bệnh thấp, trong đó phụ phẩm từ quá trình chế biến thủy sản có thể đáp ứng những điều này, điển hình là da và vây cá [2].

Để có thể chiết được collagen thành phẩm có chất lượng cao phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố, trong đó có bước tiền xử lý như loại protein phi collagen. Nguyễn Công Bình và Trần Phương Kiều (2019) [3] đã nghiên cứu ứng dụng NaOH để khử protein phi collagen từ da cá ngừ vây vàng. Hơn nữa, công đoạn quyết định đến chất lượng collagen là công đoạn tách chiết, Duan và cs (2009) [4] đã nghiên cứu sử dụng acetic acid để chiết tách collagen từ da, vây và xương cá chép. Trương Thị Mộng Thu và cs (2021) [5] cũng đã nghiên cứu chiết tách collagen từ da cá lóc bằng pepsin. Tuy nhiên, trong quá trình chế biến cá lóc thì một lượng lớn vây cá được loại ra và chưa có hướng tận dụng nguồn phụ phẩm này. Vì thế, “Nghiên cứu điều kiện tiền xử lý và chiết tách collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc (*Channa striata*) bằng acetic acid” đã được thực hiện nhằm tìm được nồng độ và thời gian xử lý da cá lóc trong NaOH; tìm được nồng độ và thời gian ngâm acetic acid để chiết tách collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc đạt chất lượng tốt và hiệu suất thu hồi collagen cao.

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). Cá lóc (*Channa striata*) có khối lượng 700 - 800 g/con được cơ sở khô 7 Chóp mua tại các ao nuôi ở tỉnh An

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

² Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

³ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Email: ttmthu@ctu.edu.vn

Giang trong vùng được kiểm soát về kháng sinh, kim loại, hóa chất theo Quyết định số 53/2009/QĐ-UBND tỉnh An Giang. Tại cơ sở, da và vảy cá lóc được thu trong quá trình chế biến các sản phẩm khô nguyên con, thịt cá lóc cắt sợi làm khô. Da và vảy cá lóc được làm đông ở $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ tại cơ sở và đóng thùng chuyển về Trường Đại học Cần Thơ không quá 6 giờ. Da cá được loại thịt, mỡ và vảy còn sót lại, rửa sạch, phơi ráo, cắt nhỏ với kích thước $2 \times 1 \text{ cm}$. Vảy được rửa sạch, phơi ráo. Da và vảy cá lóc sau xử lý bảo quản đông nhiệt độ $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ cho đến khi tiến hành thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ và thời gian ngâm NaOH đến khả năng khử protein phi collagen từ da cá lóc

Tiến hành thí nghiệm: da cá lóc được xử lý như mục 2.1, được ngâm quay trong dung dịch NaOH với 3 mức nồng độ lần lượt là 0,06; 0,10 và 0,14 M và 3 mốc thời gian lần lượt là 4, 6 và 8 giờ. Các thông số cố định trong quá trình ngâm quay được mô tả bởi Thuy và cs (2014) [6] ở nhiệt độ $0 - 4^\circ\text{C}$, tiến hành khuấy trộn 30 phút/lần, tỷ lệ da cá: dung dịch NaOH (w/v) là 1 : 8. Sau đó, da cá được rửa bằng nước cho đến khi đạt pH trung tính, phơi ráo. Khối lượng mẫu là 50 g/mẫu.

Chỉ tiêu phân tích: hàm lượng protein thô còn lại trong da cá sau khi ngâm dung dịch NaOH để tìm được nồng độ và thời gian ngâm NaOH thích hợp nhất.

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

Tiến hành thí nghiệm: da cá xử lý trong dung dịch NaOH theo nồng độ và thời gian tốt nhất được chọn từ thí nghiệm 1. Vảy cá được xử lý như mục 2.1 và được ngâm trong dung dịch 0,8 M EDTA-2Na trong 24 giờ ở $0 - 4^\circ\text{C}$ với tỷ lệ vảy cá/dung dịch EDTA-2Na (w/v) là 1 : 8 để khử khoáng theo nghiên cứu của Thuy và cs (2014) [6]. Tiến hành trộn da và vảy cá theo tỷ lệ 1 : 1 (w/w) và chiết tách collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc trong dung dịch acetic acid với 5 mốc nồng độ acetic acid là 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 M. Cố định tỷ lệ hỗn hợp da và vảy cá lóc/dung dịch acetic acid (w/v) là 1 : 10, ở $0 - 4^\circ\text{C}$ trong 3 ngày. Mẫu sau khi ngâm acetic acid 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 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 acetic acid 0,5 M, thẩm tách trong acetic acid 0,1 M và nước cất, sấy đông khô để thu collagen theo nghiên cứu của Thuy và cs (2014) [6]. Khối lượng mỗi mẫu là 30 g (15 g da và 15 g vảy cá).

Chỉ tiêu phân tích: mẫu collagen được đo màu (L^* , a^* , b^*), cân để tính hiệu suất thu hồi, phân tích phổ FTIR để tìm được nồng độ acetic acid thích hợp nhất.

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

Tiến hành thí nghiệm: khảo sát được thực hiện tương tự thí nghiệm 2, với nồng độ acetic acid được chọn từ thí nghiệm 2. Hỗn hợp da và vảy cá được ngâm trong dung dịch acetic acid với 5 mốc thời gian lần lượt là 1, 2, 3, 4 và 5 ngày. Mẫu sau khi ngâm được thực hiện các bước tiếp theo tương tự như thí nghiệm 2 để thu collagen. Khối lượng mỗi mẫu là 30 g (15 g da và 15 g vảy cá).

Chỉ tiêu phân tích: mẫu collagen được đo màu (L^* , a^* , b^*), cân để tính hiệu suất thu hồi, phân tích phổ FTIR. Từ đó chọn ra thời gian ngâm acetic acid thích hợp nhất.

Mẫu collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc tối ưu được phân tích thành phần acid amin, đo độ hoà tan ở các pH và NaCl khác nhau và nhiệt độ biến tính.

2.3. Phương pháp phân tích

Hàm lượng protein thô trong da cá lóc trước và sau khi ngâm NaOH bằng hàm lượng nitơ tổng số nhân với hệ số 6,25 (hàm lượng protein thô = $[N_{ts}] \times 6,25$). Trong đó, hàm lượng nitơ tổng số (N_{ts}) được xác định bằng phương pháp Kjeldahl theo AOAC (2000) [7].

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

Màu sắc (L^* , a^* , b^*): mẫu collagen được trải đều với đường kính khoảng 20 mm và chiều cao khoảng 5 mm trên tờ giấy trắng và đo màu bằng thiết bị Colorimeter PCE-CSM 2 (Trung Quốc).

Quang phổ hồng ngoại (phổ FTIR) của collagen được ghi nhận lại từ máy quang phổ ALPHA FTIR trong phạm vi bước sóng từ 4.000 đến 500 cm^{-1} [6].

Thành phần acid amin của collagen được xác định theo phương pháp của Thụy và cs (2014) [6]. Thủy phân 20 mg collagen trong HCl 6 M ở nhiệt độ 110°C trong 22 giờ trong chân không, trung hòa với NaOH 6 M và 0,6 M, lọc bằng màng cellulose, phân tích bằng hệ thống HPLC.

Nhiệt độ biến tính của collagen được xác định bằng phương pháp quét vi sai nhiệt lượng DSC được mô tả bởi Thụy và cs (2014) [6]. Tỷ lệ mẫu collagen/dung dịch acetic acid 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.

Độ hòa tan của collagen ở các pH từ 1 - 10 theo phương pháp của Thụy và cs (2014) [6]: 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 ở các nồng độ muối NaCl từ 0 đến 1,2 M theo phương pháp của Thụy và cs (2014) [6]: pha dung dịch collagen có nồng độ 6 mg/mL trong acid acetic 0,1 M, lấy 5 mL collagen cho vào 5 mL dung dịch NaCl để được hỗn hợp có nồng độ NaCl từ 0,2 đến 1,2 M. Hỗn hợp collagen có pH từ 1 - 10 và nồng độ NaCl từ 0,2 - 1,2 M được đi ly tâm với tốc độ 8.000 vòng trong 20 phút ở 4°C thu phần dịch lỏng. Hàm lượng protein trong dịch lỏng được xác định bằng phương pháp của Lowry và cs (1951) [8] sử dụng huyết thanh bò làm chuẩn, từ đó tính được độ hòa tan của collagen.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập được tính trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn bằng phần mềm Microsoft Excel 2013. Phân tích phương sai ANOVA và phép thử LSD để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức với mức ý nghĩa 95%, bằng phần mềm Stagraphic Centurion XV version 15.01.02.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của thời gian ngâm và nồng độ dung dịch NaOH đến khả năng loại protein phi collagen từ da cá lóc

Hàm lượng protein thô còn lại trong da cá lóc sau khi ngâm trong dung dịch NaOH qua các mốc

thời gian và nồng độ NaOH khác nhau được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian ngâm và nồng độ NaOH đến hàm lượng protein thô còn lại ở da cá lóc sau xử lý

Nghiệm thức	Thời gian (giờ)	Nồng độ (M)	Hàm lượng protein thô (%)
ĐC	-	-	33,0 $\pm$ 0,410 ^a
1	4	0,06	27,1 $\pm$ 0,969 ^b
2	4	0,10	26,2 $\pm$ 0,590 ^{bc}
3	4	0,14	25,7 $\pm$ 0,586 ^c
4	6	0,06	26,0 $\pm$ 0,202 ^c
5	6	0,10	24,5 $\pm$ 0,937 ^d
6	6	0,14	23,9 $\pm$ 0,242 ^d
7	8	0,06	24,0 $\pm$ 0,543 ^d
8	8	0,10	20,0 $\pm$ 0,538 ^e
9	8	0,14	19,1 $\pm$ 0,612 ^e

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

Bảng 1 cho thấy, hàm lượng protein thô trong da cá có xu hướng giảm khi tăng nồng độ NaOH và thời gian ngâm. Khi tăng nồng độ dung dịch NaOH từ 0 đến 0,10 M và thời gian ngâm từ 0 đến 6 giờ thì hàm lượng protein thô giảm dần và đạt thấp là 24,5% ở nghiệm thức 5 (NaOH 0,10 M và 6 giờ). Nguyên nhân có thể là do dung dịch NaOH có khả năng phá vỡ các liên kết mạch bên, do đó một số protein phi collagen trong da cá bị phá vỡ cấu trúc bậc cao và tách ra khỏi nguyên liệu, dẫn đến hàm lượng protein thô giảm [9]. Hàm lượng protein thô không đổi khi nồng độ dung dịch NaOH tiếp tục tăng đến 0,14 M ở 6 giờ hay thời gian tăng 8 giờ ở nồng độ NaOH 0,06 và 0,10 M. Hàm lượng protein thô ổn định cho thấy có thể protein phi collagen hầu như còn lại rất ít hoặc đã được loại hết. Do vậy nồng độ dung dịch NaOH và thời gian ngâm phù hợp sẽ giúp loại bỏ thành phần protein phi collagen trong da cá một cách tốt nhất mà không làm thất thoát collagen [10]. Tuy nhiên, hàm lượng protein thô lại giảm còn 19,1% khi nồng độ dung dịch NaOH tăng đến 0,14 M và thời gian 8 giờ. Điều này được giải thích là do khi ngâm da cá trong dung dịch NaOH ở nồng độ cao và thời gian quá dài có thể dẫn đến việc cắt mạch collagen, kết quả là tổn thất collagen trong quá trình rửa, do đó hàm lượng protein thô lại tiếp tục giảm [3]. Do đó, trong nghiên cứu này chọn nồng

độ NaOH là 0,10 M và thời gian ngâm 6 giờ để loại protein phi collagen từ da cá lóc là thích hợp nhất.

3.2. Ảnh hưởng nồng độ acetic acid đến khả năng chiết tách collagen từ hỗn hợp da và vảy cá

3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ acetic acid đến màu sắc và hiệu suất thu hồi collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc

Hiệu suất thu hồi và màu sắc collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc theo nồng độ acetic acid khác nhau được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ acetic acid đến hiệu suất thu hồi collagen và màu sắc của collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc

Nồng độ acetic acid (M)	Màu sắc			H (%)
	L*	a*	b*	
0,2	69,0±1,315 ^d	2,35±0,357 ^a	5,67±0,765 ^b	0,457±0,017 ^c
0,4	74,0±1,736 ^{bc}	1,39±0,2116 ^b	4,89±0,905 ^{bc}	1,190±0,327 ^b
0,6	81,4±0,898 ^a	1,45±0,278 ^b	3,59±1,183 ^c	2,090±0,157 ^a
0,8	72,2±1,937 ^c	1,83±0,295 ^{ab}	7,99±0,465 ^a	0,696±0,033 ^c
1,0	76,2±2,185 ^b	2,23±0,299 ^a	7,94±0,540 ^a	0,561±0,023 ^c

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

Từ kết quả bảng 2 cho thấy, khi nồng độ acetic acid tăng từ 0,2 lên 0,6 M thì hiệu suất thu hồi collagen tăng từ 0,457% lên 2,090%. Tuy nhiên, hiệu suất thu hồi collagen giảm còn 0,561% khi nồng độ acetic acid tiếp tục tăng đến 1,0 M. Nguyên nhân là do ở giai đoạn đầu của quá trình chiết tách, khi da và vảy cá tiếp xúc với dung dịch acetic acid sẽ xảy ra hiện tượng hydrate hóa sợi collagen [11]. Vì vậy, nồng độ acetic acid thấp, collagen hydrate hóa không hoàn toàn dẫn đến hiệu suất chiết tách chưa cao. Khi tăng dần nồng độ acetic acid sẽ làm thay đổi tương tác tĩnh điện và cấu trúc sợi collagen theo sự thay đổi pH, mức độ hydrate hóa tăng, làm tăng độ hòa tan của collagen trong dịch chiết, dẫn đến hiệu suất chiết tách collagen tăng [12]. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ acetic acid lên 1,0 M thì hiệu suất thu hồi collagen giảm. Điều này có thể giải thích là do ở một giá trị pH rất thấp của dung môi chiết sẽ làm giảm khả năng hấp thụ nước của collagen, do đó làm giảm khả năng hòa tan của collagen, dẫn đến hiệu suất thu hồi collagen giảm [13]. Điều này giải thích cho các quan sát trong nghiên cứu này rằng ngoài nồng độ acetic acid 0,6 M, hiệu suất thu hồi collagen đều giảm đáng kể. Khi tăng nồng độ acetic acid từ 0,2 M đến 0,6 M thì độ sáng (L*) cũng tăng dần từ 69,0 lên 81,4; trong khi a* và b* giảm tương ứng từ 2,35 và 5,67 xuống 1,45 và 3,59. Tuy nhiên, độ sáng (L*) giảm còn 76,2 thì a* và b* tăng tương ứng lên 2,23 và 7,94 khi nồng độ acetic acid tăng lên 1,0 M. Điều này có thể được giải thích là do acetic acid tác động lên các sắc tố trên tế bào da và vảy cá, có tác dụng chủ yếu là tẩy

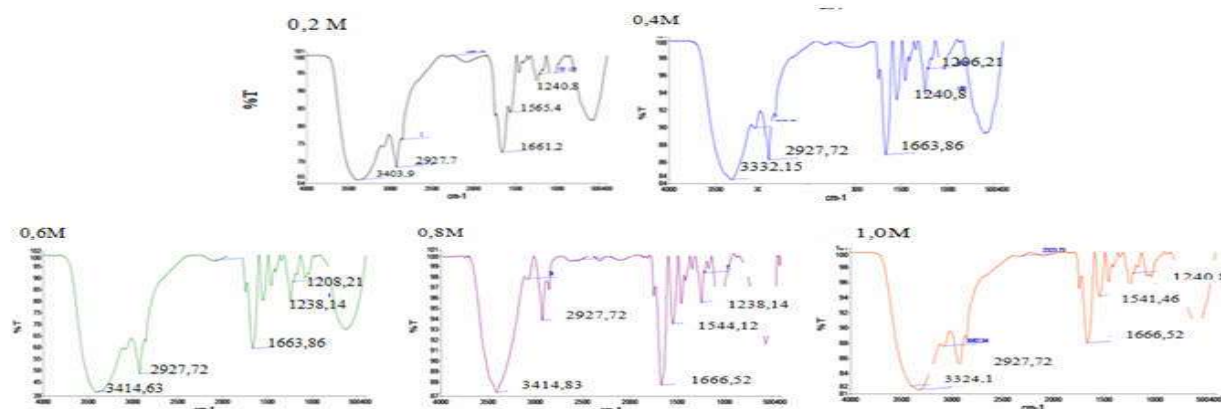
màu da và vảy cá, do đó giá trị L* tăng và a*, b* giảm khi tăng nồng độ acetic acid. Tuy nhiên, khi nồng độ acetic acid tăng cao có thể làm biến đổi các liên kết khác trên tế bào, phá vỡ tế bào, ảnh hưởng đến màu của collagen, nên giá trị L* giảm và a*, b* tăng [9]. Kết quả cho thấy chiết tách collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc ở nồng độ acetic acid 0,6 M là thích hợp nhất.

3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ acetic acid đến phổ FTIR của collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc

Phổ FTIR của các mẫu collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc được chiết tách ở các nồng độ acetic acid 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 (3400-3440 cm⁻¹); Amide I (1600-1660 cm⁻¹); Amide II (~1500 cm⁻¹); Amide III (1320-1220 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 số sóng 3400 – 3440 cm⁻¹, khi nhóm NH tham gia tạo liên kết hydrogen với nước, tần số dao động sẽ giảm, số sóng < 3400 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 CH₂; Amide III biểu thị dao động giãn C-O 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 [4].



Hình 1. Phổ FTIR của collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lọc ở các nồng độ acetic acid khác nhau

Nhìn chung, các mẫu collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lọc ở các nồng độ acetic acid khác nhau từ 0,2 M; 0,4 M; 0,6 M; 0,8 M; 1,0 M thu nhận được có phổ FTIR tương tự nhau về bước sóng tại vùng amide A tương ứng lần lượt là 3403,99; 3332,15; 3414,63; 3414,83; 3324,1 cm^{-1} . Amide B (2927,72; 2927,72; 2927,72; 2927,72; 2927,72 cm^{-1}), amide I (1661,2; 1663,86; 1663,86; 1666,52; 1666,52 cm^{-1}), amide II (1265,4; 1240,8; 1238,14; 1544,12; 1541,46 cm^{-1}) và amide III (1240,8; 1206,21; 1208,21; 1238,14; 1240,8 cm^{-1}). Thông qua các dữ liệu đo phổ FTIR, collagen được chiết tách từ hỗn hợp da và vảy cá lọc có đầy đủ các nhóm chức năng của collagen loại I.

3.3. Ảnh hưởng thời gian ngâm acetic acid đến khả năng chiết tách collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lọc

3.3.1. Ảnh hưởng của thời gian ngâm acetic acid đến màu sắc và hiệu suất thu hồi collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lọc

Hiệu suất thu hồi và màu sắc của collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lọc theo thời gian ngâm acetic acid khác nhau được trình bày ở bảng 3.

Từ kết quả bảng 3 cho thấy, khi thay đổi thời gian chiết tách trong acetic acid từ 1 ngày lên 3 ngày thì hiệu suất thu hồi collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lọc tăng từ 0,706% lên 3,180%. Tuy nhiên, tiếp tục tăng từ 3 ngày lên 5 ngày thì hiệu suất thu hồi collagen giảm còn 0,862%. Nguyên nhân là do xử lý acetic acid giúp da và vảy cá trương nở, dẫn đến quá trình chiết tách collagen đạt hiệu quả cao, do đó hiệu suất thu hồi tăng khi kéo dài thời gian ngâm [3]. Tuy nhiên, hiệu suất thu hồi tăng đến một giới hạn nhất định và giảm xuống khi thời gian ngâm acetic acid kéo dài. Điều này có thể là do kéo dài thời gian ngâm acetic acid quá mức có thể dẫn đến cắt mạch collagen nên hiệu suất thu hồi giảm [9]. Khi tăng thời gian chiết tách collagen trong acetic acid từ 1 lên 3 ngày thì độ sáng (L^*) cũng tăng từ 72,6 lên 83,6 trong khi a^* và b^* giảm tương ứng từ 1,76 và 4,42 xuống 1,30 và 3,36. Tiếp tục tăng lên 5 ngày thì độ sáng (L^*) của mẫu collagen giảm còn 78,6 thì a^* và b^* tăng tương ứng lên 1,57 và 4,11. Kết quả cho thấy chiết tách collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lọc bằng acetic acid với thời gian ngâm 3 ngày là thích hợp nhất.

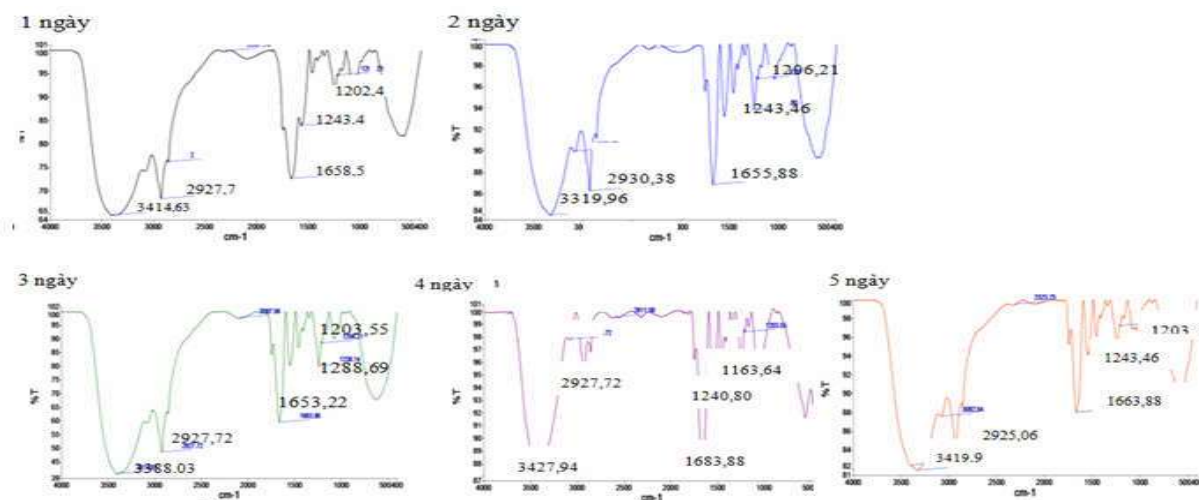
Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian ngâm acetic acid đến hiệu suất thu hồi collagen và màu sắc của collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lọc

Thời gian ngâm (ngày)	Màu sắc			H (%)
	L^*	a^*	b^*	
1	76,7 $\pm$ 2,368 ^b	2,58 $\pm$ 0,200 ^a	5,70 $\pm$ 0,365 ^a	1,510 $\pm$ 0,283 ^b
2	83,6 $\pm$ 2,172 ^a	1,30 $\pm$ 0,252 ^c	3,36 $\pm$ 0,153 ^c	3,180 $\pm$ 0,737 ^a
3	76,6 $\pm$ 2,046 ^b	2,27 $\pm$ 0,796 ^{ab}	4,59 $\pm$ 0,765 ^b	1,420 $\pm$ 0,147 ^{bc}
4	78,6 $\pm$ 1,153 ^b	1,57 $\pm$ 0,149 ^{bc}	4,11 $\pm$ 0,922 ^{bc}	0,862 $\pm$ 0,347 ^{bc}
5				

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

3.3.2. Ảnh hưởng của thời gian ngâm acetic acid đến phổ FTIR của collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc

Phổ FTIR của các mẫu collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc theo thời gian chiết tách bằng acetic acid khác nhau được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Phổ FTIR của collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc theo thời gian chiết tách khác nhau trong dung dịch acetic acid

Nhìn chung, các mẫu collagen từ da và vảy cá lóc ở các thời gian chiết tách khác nhau từ 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày thu nhận được có phổ FTIR tương tự nhau về bước sóng tại vùng amide A dao động trong khoảng 3388,03-3427,94 cm^{-1} . Amide B (2925,06-2930,38 cm^{-1}), amide I (1653,22-1683,88 cm^{-1}), amide II lần lượt là 1238,14-1243,46 cm^{-1} và amide III lần lượt là 1163,54-1208,1 cm^{-1} . Từ kết quả phân tích phổ FTIR, collagen được chiết tách từ hỗn

hợp da và vảy cá lóc có các nhóm chức năng của collagen loại I.

3.4. Chất lượng của collagen thành phẩm từ hỗn hợp da và vảy cá lóc

3.4.1. Thành phần acid amin của collagen thành phẩm từ hỗn hợp da và vảy cá lóc

Thành phần acid amin của collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc được trình bày ở bảng 4.

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

STT	Thành phần acid amin	Hàm lượng (đơn vị/1.000 đơn vị)	STT	Thành phần amino acid	Hàm lượng (đơn vị/1.000 đơn vị)
1	Alanine	91	12	Lysine	30
2	Arginine	54	13	Methionine	12
3	Aspartic acid	49	14	Phenylalanine	17
4	Cystein	2	15	Proline	131
5	Glutamic acid	76	16	Serine	36
6	Glycine	314	17	Threonine	21
7	Histidine	6	18	Tryptophan	0
8	Hydrolysine	6	19	Tyrosine	4
9	Hydroxyproline	95	20	Valine	23
10	Isoleucine	9	21	Imino acid **	226
11	Leucine	24			

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

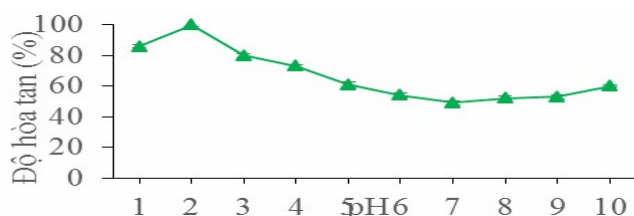
Từ kết quả phân tích ở bảng 4 cho thấy, glycine là amino acid được tìm thấy nhiều nhất trong collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc, chiếm 314 đơn

vị/1000 đơn vị (tương đương 31,4%). Thành phần amino acid của collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc tương đối giống với các collagen loại I khác vì có

chung điểm đặc trưng nhất của collagen là có hàm lượng glycine $\geq 30\%$ [14]. Kết quả này gần giống với collagen loại I từ da cá chép là 33,2% [4], vây cá sòng (Nhật) là 33,8%, vây cá sòng (Việt Nam) là 33,6% [6] và da cá lóc là 33,6% [5]. Ngoài ra, collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc chứa các acid amin khác như proline, alanine, hydroxyproline và glutamic acid tương tự như collagen từ các loài khác [14]. Không phát hiện tryptophan trong collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc. Hàm lượng imino acid (proline và hydroxyproline) của collagen từ da và vây cá lóc là 226 đơn vị/1.000 đơn vị (tương đương 22,6%) cao hơn collagen từ da cá lóc là 20,4% trong nghiên cứu của Trương Thị Mộng Thu và cs (2021) [5]. Điều này được giải thích là do hàm lượng imino acid có mối liên hệ chặt chẽ đến cấu trúc của collagen. Hàm lượng imino acid trong collagen càng nhiều thì cấu trúc xoắn ba của collagen càng ổn định [3]. Do đó, collagen từ da cá lóc được chiết tách bằng pepsin (chuẩn bị trong dung dịch acetic acid) trong nghiên cứu của Trương Thị Mộng Thu và cs (2021) [5] thì cấu trúc xoắn ba của collagen có thể bị ảnh hưởng bởi tác dụng của cả acetic acid và pepsin nên hàm lượng imino acid thấp hơn collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc chỉ chiết tách bằng acetic acid trong nghiên cứu này.

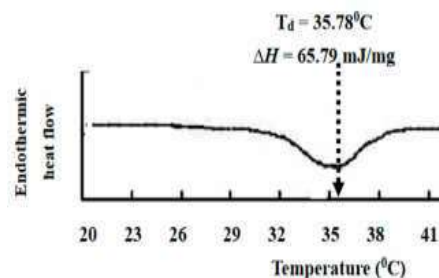
3.4.2. Nhiệt độ biến tính của collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc

Nhiệt độ biến tính của collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc được thể hiện ở hình 3.



Hình 4. Độ hòa tan của collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc ở các pH khác nhau

Từ biểu đồ hình 4 cho thấy, mẫu collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc có độ hòa tan cao ở các pH có tính acid (pH từ 1 – 4). Độ hòa tan của collagen giảm trong khoảng pH từ 6 - 8. Sự giảm độ hòa tan trong phạm vi pH này có thể là do sự gia tăng tương tác kỵ nước của các phân tử collagen, do đó dẫn đến sự kết tủa collagen, đặc biệt là tại điểm đẳng điện pI [2]. Độ hòa tan của collagen có xu hướng tăng nhẹ ở

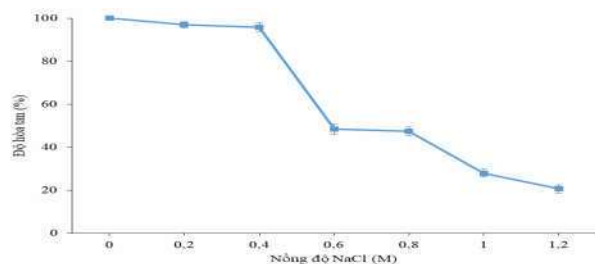


Hình 3. Nhiệt độ biến tính của collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc

Kết quả ở hình 3 cho thấy, nhiệt độ biến tính của collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc là 35,78°C, cao hơn collagen từ da cá Minh Thái (24,6°C) [15], nhưng thấp hơn collagen từ da cá rô sông Nile (36,5°C) [14]. Collagen từ các loại nguyên liệu khác nhau có nhiệt độ biến tính khác nhau là do sự khác nhau về hàm lượng hydroxyproline, collagen sẽ có nhiệt độ biến tính cao khi có hàm lượng hydroxyproline cao. Vì hydroxyproline có vai trò quan trọng duy trì sự ổn định cấu trúc xoắn ba của collagen. Ngoài ra sự khác nhau về nhiệt độ biến tính của collagen còn liên quan tới nhiệt độ môi trường sống và nhiệt độ cơ thể của từng loài [15].

3.4.3. Độ hòa tan của collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc

Độ hòa tan của collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc ở các pH từ 1 đến 10 và trong dung dịch NaCl ở các nồng độ từ 0 đến 1,2 M thể hiện trong hình 4 và hình 5.



Hình 5. Độ hòa tan của collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc ở các nồng độ NaCl khác nhau

pH 10 có thể là do sự tăng cường lực đẩy của các phân tử collagen khi pH > pI [2].

Qua hình 5 cho thấy collagen từ hỗn hợp da và vây cá lóc có độ hòa tan cao (trên 90%) ở nồng độ muối từ 0,2 đến 0,4 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 hydrate hóa trên các miền dẫn đến độ hòa tan cao [2]. Khi nồng độ

NaCl cao hơn 0,6 M thì độ hòa tan có xu hướng giảm mạnh và chỉ còn khoảng 20% với NaCl 1,2 M. Nguyên nhân là do NaCl càng cao thì sự tăng cường tương tác kỵ nước giữa các chuỗi protein càng cao dẫn đến kết tủa và giảm độ hòa tan [9].

4. KẾT LUẬN

Hỗn hợp da và vảy cá lóc có thể sử dụng là nguồn nguyên liệu để chiết tách collagen bằng acetic acid. Điều kiện tiền xử lý loại protein phi collagen từ da cá lóc tốt nhất là ngâm da cá trong dung dịch NaOH 0,1 M và thời gian ngâm 6 giờ. Chiết tách collagen từ hỗn hợp da và vảy cá lóc được thực hiện với 0,6 M acetic acid và thời gian ngâm 3 ngày cho hiệu suất thu hồi collagen cao, màu sắc, 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 Minh Phú, Đào Thị Mộng Trinh, Lê Thị Minh Thủy và 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(3), 147–155. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2018.051>
2. 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>
3. Nguyễn Công Bình và Trần Phương Kiều (2019). Loại bỏ phi collagen trên da cá ngừ vây vàng bằng dung dịch NaOH. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 19(1), 114–124.
4. 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>
5. Trương Thị Mộng Thu, Nguyễn Đỗ Quỳnh, Trần Thanh Trúc và Lê Thị Minh Thủy (2021). Nghiên cứu điều kiện tiền xử lý và chiết tách collagen từ da cá lóc (*Channa striata*) bằng pepsin. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 57 (6), 178–188. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.185>
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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.094>
7. AOAC (2020). Official methods of Analysis of AOAC international, (20th ed.). George W. Latimer.
8. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
9. Trần Thị Luyến, Đỗ Minh Phụng và Nguyễn Anh Tuấn (2006). *Sản xuất các chế phẩm kỹ thuật và y dược từ phế liệu thủy sản*. Nxb Nông nghiệp. Thành phố Hồ Chí Minh.
10. Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>
11. 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>
12. Ahmad, M., & Benjakul, S. (2010). Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Chemistry*, 120(3), 817–824. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.019>
13. Kiew, P. L., & Don, M. M. (2013). The influence of acetic acid concentration on the extractability of collagen from the skin of hybrid

Clarias sp. and its physicochemical properties. Focusing on Modern Food Industry (FMFI), 2(3), 123–128.

14. Wang, L., Yang, B., Du, X., Yang, Y., & Liu, J. (2008). Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface

methodology. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9(4), 604–607.

15. Yan, M., Li, B., Zhao, X., Ren, G., Zhuang, Y., Hou, H., Zhang, X., Chen, L., & Fan, Y. (2008). Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry*, 107(4), 1581–1586. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.027>

EXTRACTION OF ACID-SOLUBLE COLLAGEN FROM SNAKEHEAD FISH (*Channa striata*) SKIN AND SCALES MIXTURE

Truong Thi Mong Thu^{1,3}, Tran Thanh Truc², Le Thi Minh Thuy³

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

²College of Agriculture, Can Tho University

³College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University

Email: tththu@ctu.edu.vn

Summary

Study on the pre-treatment and collagen extraction conditions from snakehead fish skin and scales mixture by using acetic acid was performed to produce good collagen quality. The results showed that snakehead skin treated in 0.1 M NaOH solution for 6 hours gave the best removed protein non-collagen efficiency, the remaining amount of crude protein was 24.5%. After treatment, snakehead fish skin and scales mixture was extracted with 0.6 M acetic acid which gave high collagen yield of 2.090% and bright color of collagen with L* of 81.4. Snakehead fish skin and scales mixture was extracted in 0.6 M acetic acid for 3 days which gave highest collagen yield of 3.180%, L* value of 83.6. Collagen from snakehead fish skin and scales mixture had maximum solubility at pH 2 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 22.6%, so that collagen has denaturation temperature up to 35.78°C. From the above results, it is possible to utilize the skin and scale from the processing of snakehead fish as a source of raw materials for collagen production, both increasing the value of raw materials and helping to reduce environmental pollution caused by fish waste.

Keywords: Collagen, FTIR spectrum, acetic acid, pre-treatment, snakehead fish skin and scales.

Người phản biện: PGS.TS. Vũ Ngọc Bội

Ngày nhận bài: 15/7/2022

Ngày thông qua phản biện: 5/8/2022

Ngày duyệt đăng: 4/11/2022