

Optimizing conditions for treatment and extraction of collagen from fan-bellied leatherjacket skin *Monacanthus chinensis* (Osbeck, 1765)

Doan Thi Thiet^{1*}, Pham Xuan Ky¹, Phan Bao Vy¹, Nguyen Phuong Anh¹, Le Ho Khanh Hy¹, Dao Viet Ha¹, Vu Ngoc Boi²

¹*Institute of Oceanography, VAST, Vietnam*

²*Nha Trang University, Khanh Hoa, Vietnam*

*E-mail: doanthithiet671990@gmail.com

Received: 28 August 2020; Accepted: 26 October 2020

©2020 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

Abstract

The fan-bellied leatherjacket skin was treated to extract collagen by chemical method. The non-collagenous substances and the pigment in the skin were removed with NaOH and H₂O₂, respectively. Collagen was extracted with acetic acid. The treatment and extraction conditions were optimized by response surface methodology. The concentrations, skin/solution ratios (g/ml) and times were surveyed. The optimum conditions to remove the non-collagenous substances were as follows: the concentration of NaOH at 0.15M, the ratio (g/ml) at 1/13.9, time at 56.9 hours. Using H₂O₂ with the concentration at 6%, the skin/solution ratio (g/ml) at 1/2, time at 10 minutes were suitable values for skin pigmentation removal. For collagen extraction, the concentration of acetic acid at 0.53M, skin/solution ratio at 1/9.6 g/ml and time in 59.6 hours were optimal.

Keywords: Chemical method, fan-bellied leatherjacket skin, non-collagenous substances, pigment.

Nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện xử lý và tách chiết collagen từ da cá bò gai móc *Monacanthus chinensis* (Osbeck, 1765)

Đoàn Thị Thiết^{1*}, Phạm Xuân Kỳ¹, Phan Bảo Vy¹, Nguyễn Phương Anh¹, Lê Hồ Khánh Hỷ¹, Đào Việt Hà¹, Vũ Ngọc Bội²

¹Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

²Trường Đại học Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam

*E-mail: doanthithiet671990@gmail.com

Nhận bài: 28-8-2020; Chấp nhận đăng: 26-10-2020

Tóm tắt

Da cá bò gai móc *Monacanthus chinensis* được xử lý để tách chiết collagen bằng phương pháp hóa học. Tạp chất phi collagen được xử lý bằng NaOH, sắc tố của da cá được loại bỏ bằng H₂O₂ và chiết tách collagen bằng acid acetic. Điều kiện xử lý và tách chiết collagen được tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Nồng độ, tỷ lệ da/dung dịch (g/ml) và thời gian ngâm được kiểm chứng thực nghiệm. Giá trị tối ưu để khử tạp chất phi collagen được xác định: Nồng độ NaOH là 0,15M, tỷ lệ: 1/13,9 g/ml, thời gian ngâm khử: 56,9 giờ. Sử dụng H₂O₂ ở nồng độ 6%, tỷ lệ (g/ml) 1/2, thời gian ngâm 10 phút là thích hợp để tẩy màu da cá. Đối với việc chiết collagen, nồng độ acid acetic 0,53M, tỷ lệ (g/ml) 1/9,6, thời gian ngâm chiết 59,6 giờ là tối ưu.

Từ khóa: Collagen, da cá bò gai móc, hợp chất phi collagen, sắc tố, phương pháp hóa học.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Collagen là một dạng protein đặc biệt chiếm khoảng 25–35% tổng lượng protein trong cơ thể. Có khoảng 27 loại collagen, được đặt tên I–XXVII được phát hiện [1]. Collagen được ứng dụng rộng rãi trong y dược, mỹ phẩm, thực phẩm [2].

Hiện nay, collagen từ da, xương gia súc như lợn, bò được ử dụng rộng rãi trong lĩnh vực thực phẩm và nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng nguồn collagen từ sinh vật biển, đặc biệt là từ da cá biển, có hoạt tính sinh học và có tiềm năng ứng dụng lớn [3–5]. Collagen từ da cá biển ngày càng được quan tâm nhờ tính an toàn cao, dễ hấp thu (do có trọng lượng phân tử thấp), chứa các peptid có khả năng chống oxy hóa, khử gốc tự do và không mang mầm bệnh như từ động vật trên cạn [6].

Trên thế giới, nghiên cứu và tách chiết collagen được thực hiện từ cá nóc hổ (*Takifugu rubripes*) [7], da cá tuyết (*Gadus morhua*) [8], cơ cá khế (*Seriola quinqueradiata*) [9], da cá nóc bạc *Lagocephalus gloveri* [10], xương sọ và hộp sọ cá ngừ (*Katsuwonus Pelamis*) [11], vây và da cá chêm (*Lates calcarifer*) [12], da, xương và cơ cá bò (*Odonus niger*) [13], cá ngừ mắt to *Thunnus obesus* [14]. Trong khi đó, ở Việt Nam, nghiên cứu tách chiết và thành phần collagen từ các sinh vật biển chỉ mới được tiến hành ở cá mối *Saurida* sp. và cá sòng Nhật *Trachurus japonicus* [15].

Xử lý và tách chiết collagen thường được thực hiện bằng phương pháp hóa học với các hóa chất khác nhau. Phan Dinh Tuan et al., [16] đã chiết collagen từ da cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng acid acetic và loại muối trong sản phẩm bằng thẩm

tích. Nhiều công trình khác sử dụng NaOH và Butanol để xử lý và tẩy màu cho da cá và tách chiết collagen bằng acid acetid [17–20], một số tác giả sử dụng H₂O₂ để tẩy màu [21–23]. Những nghiên cứu này đều cho hiệu suất tách chiết khá cao. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào xác định được các giá trị tối ưu của phương pháp hóa học trong tách chiết collagen ở cá biển.

Cá bò gai móc là loài cá phổ biến ở vùng biển Nam Trung Bộ [24]. Phần cơ của cá được dùng làm thực phẩm tươi hoặc chế biến ở dạng khô, phần da cá Bò gai móc thường chiếm một tỷ lệ khoảng 10% nhưng chưa được sử dụng trong việc tách chiết và thu nhận collagen. Dựa trên các quá trình nghiên cứu collagen từ phụ phẩm của các loài cá biển, bài báo này trình bày kết quả tối ưu hóa các yếu tố xử lý và tách chiết collagen từ da

cá bò gai móc ở Việt Nam bằng phương pháp hóa học.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

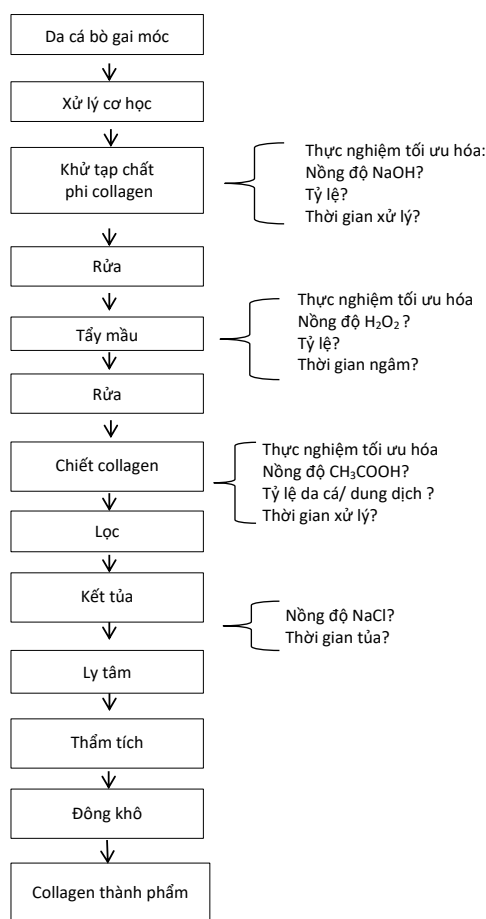
Vật liệu

Cá bò gai móc (*Monacanthus chinensis*) được thu ở vùng biển Ninh Hòa - Khánh Hòa, được rửa sạch bên ngoài, ướp đá xay (nhiệt độ < 4°C) và vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm tại Viện Hải dương học trong vòng 6 giờ. Sau đó, da cá được thu và rửa bằng nước lạnh (nhiệt độ ≤ 10°C), cắt thành những miếng nhỏ có kích thước 1 × 1 cm, để ráo và lưu trữ ở -30°C để dùng làm nguyên liệu nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm

Sơ đồ thí nghiệm quá trình xử lý và tách chiết collagen.



Hình 1. Sơ đồ thí nghiệm quá trình xử lý và tách chiết collagen

Tối ưu hóa điều kiện khử tạp chất phi collagen

Hóa chất được sử dụng là NaOH (Wako, Nhật Bản). Nồng độ NaOH, thời gian xử lý, và tỷ lệ da cá/dung dịch là yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất khử protein phi collagen (PPC) (%) và hiệu suất khử lipid (%).

Nồng độ NaOH được bố trí để tối ưu hóa từ 0,07–0,2M; thời gian 24–72 h; tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá 1/5 - 1/15 g/ml được khảo sát để chọn ra thông số tối ưu nhất. Nhiệt độ để xử lý da cá từ 4–6°C.

Số thí nghiệm theo phương án cấu trúc có tâm cấp hai - ba yếu tố là gồm 17 thí nghiệm trong đó bao gồm 8 thí nghiệm nhân tố, 6 thí nghiệm sao và 3 thí nghiệm ở tâm. Với phương

án cấu trúc có tâm cấp hai - 3 yếu tố, cách tay đòn α có giá trị 1,68.

Phương trình hồi quy đầy đủ biểu diễn sự ảnh hưởng của các biến mã hoá tới hàm mục tiêu là đa thức bậc hai [25] có dạng:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (1)$$

Trong đó: Y là hàm mục tiêu; X_1, X_2, X_3 là các biến mã hoá, b_0 là hệ số tự do; b_1, b_2, b_3 là hệ số bậc 1; b_{11}, b_{22}, b_{33} là hệ số bậc 2; b_{12}, b_{13}, b_{23} là hệ số tương tác của cặp yếu tố X_1, X_2, X_3 .

Thực nghiệm

Sau khi mã hóa các biến và tiến hành thí nghiệm, kết quả thực nghiệm như bảng sau.

Bảng 1. Ma trận thực nghiệm trực giao cấp hai của công đoạn khử tạp chất bằng NaOH (M: Khối lượng mol)

Thí nghiệm	Biến mã hóa biến thực			Biến độc lập			Hàm mục tiêu	
	Nồng độ NaOH X_1	Thời gian xử lý X_2	Tỷ lệ da cá/dung môi X_3	Nồng độ NaOH (M)	Thời gian (giờ)	Tỷ lệ da cá/dung môi (g/ml)	Hiệu suất khử PPC Y_1 (%)	Hiệu suất khử lipid Y_2 (%)
1	1	1	1	0,2	72	1/15	76,5	75,2
2	1	1	-1	0,2	72	1/5	60,1	56,1
3	1	-1	1	0,2	24	1/15	61,2	50,2
4	1	-1	-1	0,2	24	1/5	55,2	46,9
5	-1	1	1	0,07	72	1/15	44,4	48,9
6	-1	1	-1	0,07	72	1/5	38,4	42,7
7	-1	-1	1	0,07	24	1/15	40,2	42,9
8	-1	-1	-1	0,07	24	1/5	35,8	40,1
9	-1,68	0	0	0,03	48	1/10	31,1	36,4
10	1,68	0	0	0,24	48	1/10	84,3	75,2
11	0	-1,68	0	0,14	7,6	1/10	46,1	48,3
12	0	1,68	0	0,14	88,4	1/10	78,2	70,2
13	0	0	-1,68	0,14	48	1/1,6	36,7	35,2
14	0	0	1,68	0,14	48	1/18	78,2	74,5
15	0	0	0	0,14	48	1/10	80,4	80,4
16	0	0	0	0,14	48	1/10	83,1	81,2
17	0	0	0	0,14	48	1/10	81,9	78,9

Loại sắc tố bằng H_2O_2

Sau khi xử lý NaOH, da cá được rửa lại bằng nước lạnh để đưa về pH trung tính rồi đem xử lý H_2O_2 (nồng độ 2, 4, 6, 8% trong nước cất; tỷ lệ (g/ml) là 1/1, 1/2, 1/3, 1/4; thời gian ngâm 5, 10, 15, 20 phút) để tẩy màu cho nguyên liệu nhằm mục đích sản phẩm collagen thu được có màu sáng hơn. Tiến hành xác định độ nhớt của dung dịch sau xử lý và độ trắng của da cá sau xử lý để chọn ra nồng độ, thời gian và tỷ lệ ngâm H_2O_2 thích hợp nhất.

Tối ưu hoá thông số chiết collagen

Hóa chất sử dụng acid acetic (Merk, Đức). Trong công đoạn này, các thông số nồng độ acid (M), thời gian chiết (giờ) và tỷ lệ da cá/dung dịch (g/ml) là yếu tố ảnh hưởng. Các hàm mục tiêu bao gồm: Hiệu suất thu hồi collagen (%) và độ nhớt collagen (cP).

Nồng độ acid từ 0,3–0,7M; thời gian 24–72 h; tỷ lệ da cá/dung dịch (1/5 - 1/12 g/ml) được khảo sát để chọn ra thông số tối ưu nhất. Nhiệt độ chiết da cá từ 4–6°C. Collagen trong dịch

chiết được kết tủa bằng NaCl ở nồng độ 3M, thời gian 20 phút, ly tâm ở 4°C thu kết tủa và xác định khối lượng.

Tương tự như thiết kế thí nghiệm ở phần xử lý da cá, số thí nghiệm cho công đoạn chiết collagen bao gồm 17 thí nghiệm. Phương trình

hồi quy đầy đủ biểu diễn sự ảnh hưởng của các biến mã hoá tới hàm mục tiêu là đa thức bậc hai có dạng tương tự như phương trình (1).

Thực nghiệm

Sau khi mã hóa các biến và tiến hành thí nghiệm, kết quả thực nghiệm như bảng sau.

Bảng 2. Ma trận thực nghiệm trực giao cấp hai của công đoạn chiết collagen (M: Khối lượng mol)

Thí nghiệm	Biến mã hóa - Biến thực			Biến độc lập			Hàm mục tiêu	
	Nồng độ CH ₃ COOH X ₁	Thời gian X ₂	Tỷ lệ ngâm da cá/dung môi X ₃	Nồng độ CH ₃ COOH (M)	Thời gian (giờ)	Tỷ lệ ngâm da cá/dung môi (g/ml)	Hiệu suất (%)	Độ nhớt (cP)
1	1	1	1	0,7	72	1/12	14,2	4,02
2	1	1	-1	0,7	72	1/5	9,09	4,63
3	1	-1	1	0,7	24	1/12	10,3	5,03
4	1	-1	-1	0,7	24	1/5	9,09	5,16
5	-1	1	1	0,3	72	1/12	7,3	5,48
6	-1	1	-1	0,3	72	1/5	6,1	5,43
7	-1	-1	1	0,3	24	1/12	7,2	6,38
8	-1	-1	-1	0,3	24	1/5	5,6	6,43
9	-1,68	0	0	0,16	48	1/8,5	4,15	7,05
10	1,68	0	0	0,84	48	1/8,5	15,1	3,72
11	0	-1,68	0	0,5	7,6	1/8,5	7,71	6,95
12	0	1,68	0	0,5	88	1/8,5	13,7	5,63
13	0	0	-1,68	0,5	48	1/2,6	7,8	6,32
14	0	0	1,68	0,5	48	1/14	10,8	6,88
15	0	0	0	0,5	48	1/8,5	15,2	7,46
16	0	0	0	0,5	48	1/8,5	16	7,52
17	0	0	0	0,5	48	1/8,5	14,9	7,16

Phương pháp phân tích

Xác định hàm lượng collagen: Hàm lượng collagen = Hàm lượng hydroxyproline × 14,7 [26]. Hàm lượng hydroxyproline được xác định bằng sắc ký khí. Phương pháp này được xác định theo Kechaou et al., [27].

Xác định hàm lượng protein: Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp bicinchoninic acid (BCA) theo Smith et al., [28].

Xác định hàm lượng lipid: Được xác định theo phương pháp của Bligh và Dyer [29].

Độ nhớt: được thực hiện trên một máy đo độ nhớt DV- I Prime BROOKFIELD của Hoa Kỳ.

Xác định độ trắng của da cá: Bằng máy đo màu Chroma meter CR-400.

Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu thí nghiệm được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± SE. Phân tích thống kê được thực hiện trên phần mềm R. Sự sai khác của các giá trị trung bình của số liệu thí nghiệm được phân

tích ANOVA cho mô hình đáp ứng bậc 2 và Turkey. Các đồ thị được vẽ được trên phần mềm Microsoft Office Excel 2010. Sử dụng phần mềm Design Expert 6 để xác định các thông số tối ưu của quy trình xử lý và tách chiết collagen.

Xác định hiệu suất khử protein phi collagen và hiệu suất khử lipid:

$$Y_1\% = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} * 100$$

Trong đó: Y₁ là hiệu suất khử protein phi collagen/lipit; m₁ là hàm lượng protein/lipit trong da cá trước xử lý; m₂ là hàm lượng protein/lipit trong da sau xử lý.

Hiệu suất khử protein phi collagen/lipit là tốt nhất khi hàm Y₁ có giá trị lớn nhất.

Xác định hiệu suất thu hồi collagen:

$$Y_2\% = \frac{m_2}{m_1} * 100$$

Trong đó: Y_2 là hiệu suất thu hồi collagen; m_1 là khối lượng da cá ban đầu đưa vào tách chiết collagen; m_2 là hàm lượng collagen thu được sau tách chiết.

Hiệu suất thu hồi collagen là cao nhất khi hàm Y_2 có giá trị lớn nhất.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN
Xác định chế độ xử lý NaOH tách tạp chất
Kết quả xác định mô hình hồi quy cho hàm
mục tiêu hiệu suất khử protein phi collagen

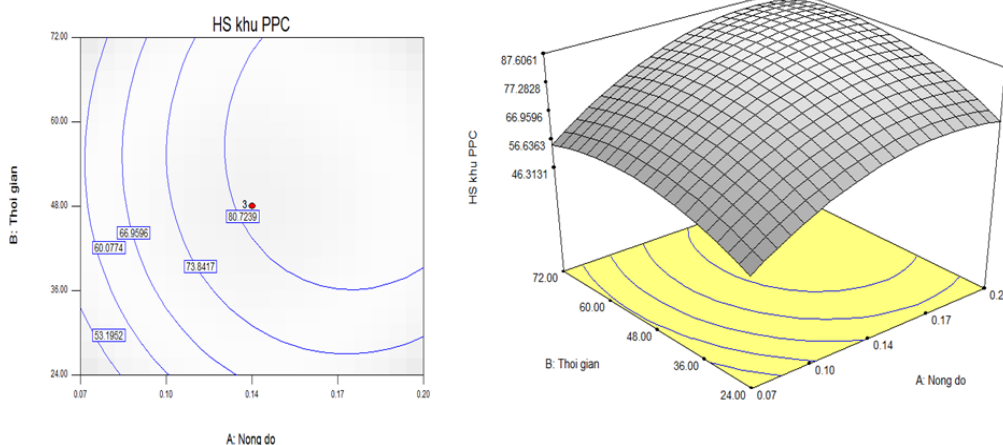
Kết quả phân tích ANOVA cho thấy tương tác giữa các biến: Nồng độ NaOH ($X_1 - M$), thời gian xử lý ($X_2 - \text{giờ}$), tỷ lệ ngâm da cá/dung dịch ($X_3 - \text{g/ml}$) và bình phương của chúng trong mô hình hồi quy bậc 2 với hiệu suất khử PPC (Y_1) là có ý nghĩa ($p < 0,05$). Mô hình này được xây dựng như sau:

$$Y_1 = 82,15 + 12,93X_1 + 5,93X_2 + 7,51X_3 - 10,49X_1^2 - 8,17X_2^2 - 9,83X_3^2 + 1,67X_1X_2 + 1,5X_1X_3 + 1,5X_2X_3$$

DESIGN-EXPERT Plot

HS khu PPC
 X = A: Nồng độ
 Y = B: Thời gian

Actual Factor
 C: Tyle = 10.00



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH, thời gian xử lý và tỷ lệ ngâm da cá/dung dịch đến hiệu suất khử PPC

Bề mặt đáp ứng miêu tả ảnh hưởng của nồng độ NaOH và thời gian xử lý tới hiệu suất khử PPC được thể hiện trên hình 2.

Kết quả thực nghiệm cho thấy khi thời gian xử lý vượt quá 63 giờ thì hiệu suất khử protein phi collagen (PPC) tăng không đáng kể. Nồng độ NaOH cũng ảnh hưởng rõ rệt tới hiệu suất khử PPC, hiệu suất khử PPC tăng khi nồng độ NaOH tăng tới khoảng 0,16M. Nhưng khi nồng độ NaOH vượt quá 0,16M thì hiệu suất khử PPC không tăng nữa mà có xu hướng giảm dần. Như vậy, hiệu suất khử PPC đạt hiệu quả cao

trong khoảng thời gian từ 48–60 giờ và nồng độ NaOH từ 0,14–0,17M, đồng thời tỷ lệ ngâm da cá/dung dịch trong khoảng 1/10 đến 1/13 thì hiệu suất khử PPC là cao nhất, nếu tỷ lệ ngâm thấp quá thì quá trình khử PPC sẽ không triệt để và nếu tỷ lệ cao quá thì sẽ gây lãng phí.

Kết quả xác định mô hình hồi quy cho hàm
mục tiêu hiệu suất khử lipid

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy tương tác giữa các biến: nồng độ NaOH ($X_1 - M$), thời gian xử lý ($X_2 - \text{giờ}$), tỷ lệ ngâm da cá/ dung dịch ($X_3 - \text{g/ml}$) và bình phương của chúng

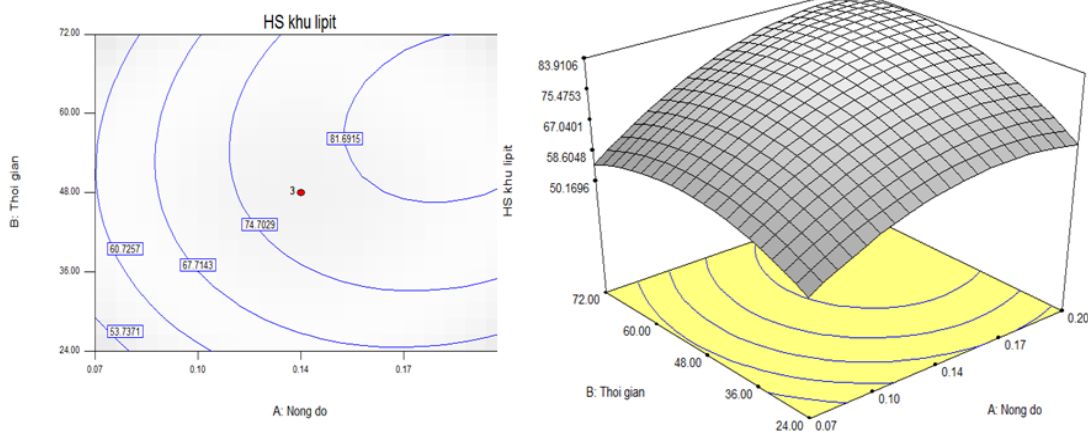
trong mô hình hồi quy bậc 2 cho hiệu suất khử lipid (Y_2 - %) là có ý nghĩa ($p < 0,05$). Vậy mô hình này được xây dựng như sau:

$$Y_1 = 78,75 + 10,40X_1 + 5,33X_2 + 6,65X_3 - 7,86X_1^2 - 799,2^2 - 972X_3^2 + 3X_1X_2 + 0,4X_1X_3 + 0,25X_2X_3$$

DESIGN-EXPERT Plot

HS khu lipid
 $X = A$: Nồng độ
 $Y = B$: Thời gian

Actual Factor
 C : Tỷ lệ = 10.00



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH, thời gian và tỷ lệ ngâm đến hiệu suất khử lipid

Bề mặt đáp ứng miêu tả ảnh hưởng của nồng độ NaOH và thời gian xử lý tới hiệu suất khử lipid được thể hiện trên hình 3.

Kết quả phân tích cho thấy khi nồng độ NaOH càng lớn và thời gian xử lý càng dài thì hiệu suất khử lipid càng cao. Từ các phân tích ở trên cho thấy hiệu suất khử lipid đạt hiệu quả cao khi thời gian xử lý lớn hơn 50 giờ và nồng độ NaOH lớn hơn 0,14M.

Tối ưu thông số cho công đoạn khử tạp chất phi collagen

Kết quả thực nghiệm kiểm chứng số liệu tối ưu hóa theo các thông số với 3 lần lặp lại cho thấy ở nồng độ 0,15M, tỷ lệ ngâm da cá/dung dịch 1/13,9 g/ml và thời gian xử lý là 56,9 giờ thì cho hiệu suất khử PPC và hiệu suất khử lipid là cao nhất, tương ứng 87,13% và 82,3% (bảng 3). Do đó, chúng tôi chọn chế độ xử lý da cá bò gai móc bằng NaOH nồng độ 0,15M, thời gian ngâm chiết là 56,9 giờ, tỷ lệ ngâm da cá/dung dịch NaOH là 1/13,9 g/ml.

Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy sự khác biệt về hiệu suất khử PPC và hiệu suất khử lipid ở nồng độ 0,15M so với các nồng độ 0,14M và 0,16M là có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.

So sánh với các nghiên cứu collagen từ phụ phẩm của các loài cá biển khác ta thấy hầu hết các tác giả đều sử dụng NaOH nồng độ trong khoảng 0,1–0,15M để xử lý da cá. Cụ thể, Li et al., [30] đã sử dụng NaOH 0,1 N tỷ lệ 1/10 g/ml và thời gian ngâm khử là 48 giờ để xử lý da cá thu (*Scomberomorus niphonius*). Benjakul et al., [17] đã xử lý da cá tráp mắt to (*Priacanthus tayenus*) bằng NaOH 0,1M trong 6 giờ. Ngoài ra, nồng độ và tỷ lệ NaOH để xử lý bong bóng bơi của cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*) cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu trong bài báo này, tuy nhiên thời gian xử lý thành phần PPC của loài này chỉ trong 2 giờ ngắn hơn so với thời gian xử lý da cá bò gai móc [31].

Bảng 3. Kết quả dự đoán thông số tối ưu công đoạn khử tạp chất collagen

Các yếu tố ảnh hưởng			Kết quả dự đoán		Kết quả thực nghiệm	
Nồng độ NaOH (M)	Thời gian xử lý (giờ)	Tỷ lệ ngâm (g/ml)	Hiệu suất khử PPC (%)	Hiệu suất khử lipit (%)	Hiệu suất khử PPC (%)	Hiệu suất khử lipit (%)
0,14	60,3	1/14,4	79,21	69,90	79,92b	75,00a
0,15	56,9	1/13,9	86,13	81,90	87,13a	82,30b
0,16	55,6	1/12,7	81,50	77,44	81,90b	77,44c

Ghi chú: Các kí tự khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$.

Xác định chế độ tẩy màu da cá bằng H₂O₂

Số liệu kết quả sử dụng H₂O₂ để tẩy màu cho da cá được thể hiện được trình bày ở hình 4 và hình 5.

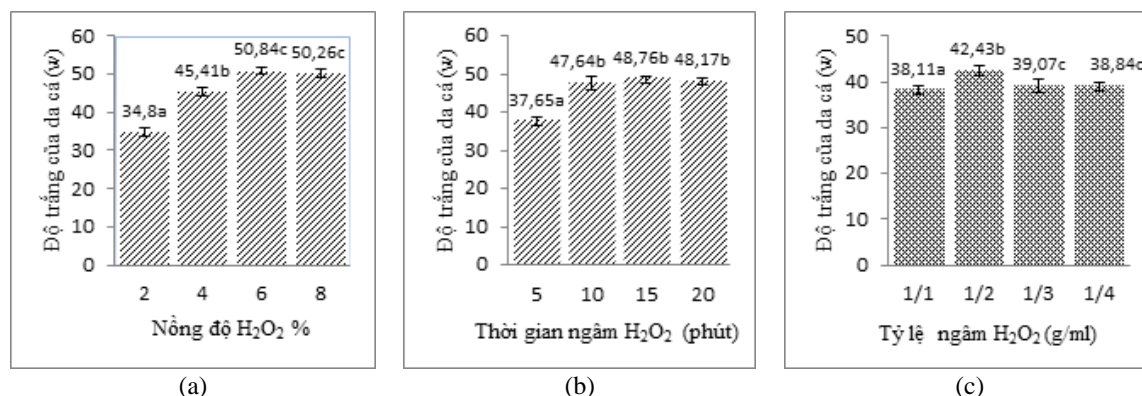
Thực nghiệm cho thấy độ trắng cao nhất là 50,84w khi ngâm H₂O₂ ở nồng độ 6%. Tuy nhiên khi ngâm da cá ở nồng độ H₂O₂ 8% thì độ trắng da cá có xu hướng giảm. Điều này cho thấy xử lý H₂O₂ nồng độ 6% cho độ trắng tốt hơn so với các nồng độ còn lại. Khi xử lý da cá bằng H₂O₂ ở nồng độ 2% và 4% thì độ nhớt của dung dịch sau xử lý khá thấp, tương ứng chỉ 1,09 cP và 1,14 cP, khi xử lý da cá bằng H₂O₂ nồng độ 6% thì độ nhớt dung dịch sau xử lý là 1,25 cP. Ở nồng độ H₂O₂ 8%, độ nhớt của dung dịch sau xử lý là 1,53 cP, tăng cao hơn so với H₂O₂ 6%, nhưng ở nồng độ này da cá trở nên mềm hơn và dễ gây thất thoát collagen trong quá trình xử lý. Do đó nồng độ H₂O₂ thích hợp để tẩy màu cho da cá bò gai móc trong quá trình sản xuất collagen là 6%.

Độ trắng da cá cao nhất là ở thời gian ngâm 15 phút, nhưng đến 20 phút thì độ trắng giảm

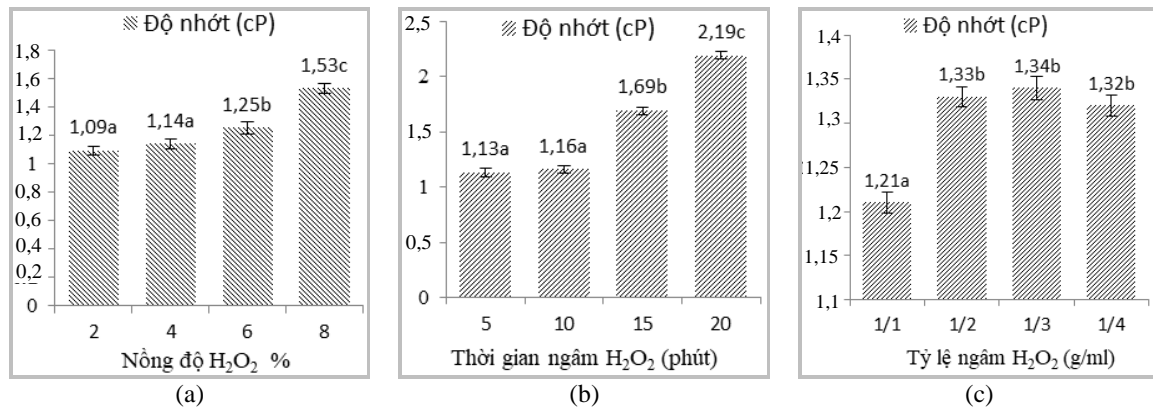
dần. Đồng thời kết quả phân tích thống kê cho thấy, độ trắng da cá ở thời gian ngâm sau 10 phút khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Do đó, thời gian ngâm H₂O₂ thích hợp để tẩy màu cho da cá là 10 phút.

Ngoài ra, khi xử lý da cá bằng H₂O₂ ở thời gian ngâm 5 phút và 10 phút thì độ nhớt của dung dịch sau xử lý tương ứng chỉ 1,13 cP và 1,16 cP, lúc này da cá còn nguyên miếng, nhưng khi xử lý da cá bằng H₂O₂ thời gian 15 phút và 20 phút thì độ nhớt dung dịch sau xử lý tăng lên 1,69 cP và 2,19 cP, da cá mềm và nhũn hơn. Do đó, thời gian ngâm H₂O₂ thích hợp để tẩy màu cho da cá bò gai móc là 10 phút.

Độ trắng da cá cao nhất là 42,43w khi ngâm ở tỷ lệ 1/2 g/ml. Ở tỷ lệ ngâm 1/3 g/ml và 1/4 g/ml thì độ trắng da cá giảm dần. Ngoài ra có sự khác nhau có ý nghĩa ở tỷ lệ ngâm 1/1 g/ml và 1/2 g/ml. Bên cạnh đó ở tỷ lệ ngâm da cá/dung dịch H₂O₂ càng cao thì độ nhớt của dung dịch tăng dần, tuy nhiên đến tỷ lệ 1/4 thì độ nhớt giảm. Do đó, tỷ lệ ngâm da cá/ H₂O₂ thích hợp để tẩy màu cho da cá bò gai móc là 1/2 g/ml.



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ, tỷ lệ và thời gian tẩy màu bằng H₂O₂ đến độ trắng da cá: (a): Ảnh hưởng của nồng độ ngâm H₂O₂ ở thời gian ngâm 10 phút và tỷ lệ ngâm 1/2 g/ml; (b): Ảnh hưởng của thời gian ngâm H₂O₂ ở nồng độ 6% và tỷ lệ ngâm 1/2 g/ml; (c): Ảnh hưởng của tỷ lệ ngâm H₂O₂ ở nồng độ 6% và thời gian 10 phút. Các kí tự khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $P < 0,05$



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ, tỷ lệ và thời gian tẩy màu bằng H₂O₂ đến độ nhớt của dung dịch sau xử lý: (a): Ảnh hưởng của nồng độ ngâm H₂O₂ ở thời gian ngâm 10 phút và tỷ lệ ngâm 1/2 g/ml; (b): Ảnh hưởng của thời gian ngâm H₂O₂ ở nồng độ 6% và tỷ lệ ngâm 1/2 g/ml; (c): Ảnh hưởng của tỷ lệ ngâm H₂O₂ ở nồng độ 6% và thời gian 10 phút. Các ký tự khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $P < 0,05$

Các loại da khác nhau thì có chế độ khử màu khác nhau, đối với cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*) thì được ngâm khử H₂O₂ 10%, tỷ lệ da cá/dung dịch là 1/1 g/ml, thời gian ngâm khử H₂O₂ là 10 phút [23]. Trong khi đó Zang et al., [21] tẩy màu cá da trơn (*Mystus macropterus*) bằng H₂O₂ 3%, và thời gian ngâm khử là 24 h.

Xác định chế độ chiết collagen bằng acid acetic

Xác định mô hình hồi quy cho hàm mục tiêu hiệu suất thu hồi collagen

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy tương tác giữa các biến: nồng độ CH₃COOH (X_1 - M), thời gian xử lý (X_2 - giờ), tỷ lệ ngâm chiết da cá/dung dịch (X_3 - g/ml) và tương tác giữa chúng trong mô hình hồi quy bậc 2 của hàm mục tiêu hiệu suất chiết collagen (Y_1 - %) là có ý nghĩa ($p = 0,05$). Mô hình này được xây dựng như sau:

$$Y_1 = 15,43 - 2,56X_1 + 1,07X_2 + 1,04X_3 - 2,24X_1^2 - 1,86X_2^2 - 2,35X_3^2 + 0,41X_1X_2 + 0,44X_1X_3 - 0,44X_2X_3$$

Kết quả tính toán từ mô hình (hình 6) cho thấy hiệu suất chiết collagen tăng khi nồng độ acid đạt khoảng 0,46–0,58M. Chứng tỏ ở khoảng nồng độ này sẽ tạo ra môi trường pH thích hợp nhất cho quá trình tách chiết collagen ra khỏi da cá. Tuy nhiên nếu tiếp tục tăng nồng độ acid cao hơn, vượt quá nồng độ tối ưu thì hiệu suất chiết thu hồi collagen lại giảm.

Thời gian chiết cũng ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi collagen, hiệu suất chiết tăng rõ rệt khi thời gian chiết tăng từ 34 giờ đến khoảng 55 giờ. Tuy nhiên khi chiết ở thời gian quá lâu, vượt quá 72 giờ thì hiệu suất thu hồi collagen có xu hướng giảm.

Như vậy, có thể thấy rằng hiệu suất chiết collagen đạt giá trị cao khi thực hiện quá trình chiết với nồng độ acid acetic từ 0,46–0,58M và thời gian chiết từ 50–62 giờ. Tỷ lệ chiết cũng ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi collagen, ở tỷ lệ 1/8 - 1/10 g/ml thì hiệu suất thu hồi collagen là cao nhất, nếu tỷ lệ dung dịch ngâm chiết quá ít thì sẽ không chiết được hoàn toàn collagen trong da cá, tuy nhiên nếu cao quá thì sẽ gây lãng phí dung môi.

Xác định mô hình hồi quy cho hàm mục tiêu độ nhớt collagen

Kết quả suy diễn phương trình hồi quy hàm mục tiêu độ nhớt collagen tổng thể ($p < 0,05$) như sau:

$$Y_1 = 7,42 - 0,77X_1 - 0,41X_2 + 0,015X_3 - 0,86X_1^2 - 0,54X_2^2 - 0,43X_3^2 + 0,05X_1X_2 - 0,09X_1X_3 - 0,05X_2X_3$$

Trong đó: Y_1 là độ nhớt collagen (%), X_1 là nồng độ acid acetic (M), X_2 là thời gian chiết (giờ), X_3 là tỷ lệ chiết (g/ml).

Kết quả tính toán từ mô hình (hình 7) cho thấy, khi thời gian chiết ngắn và nồng độ acid

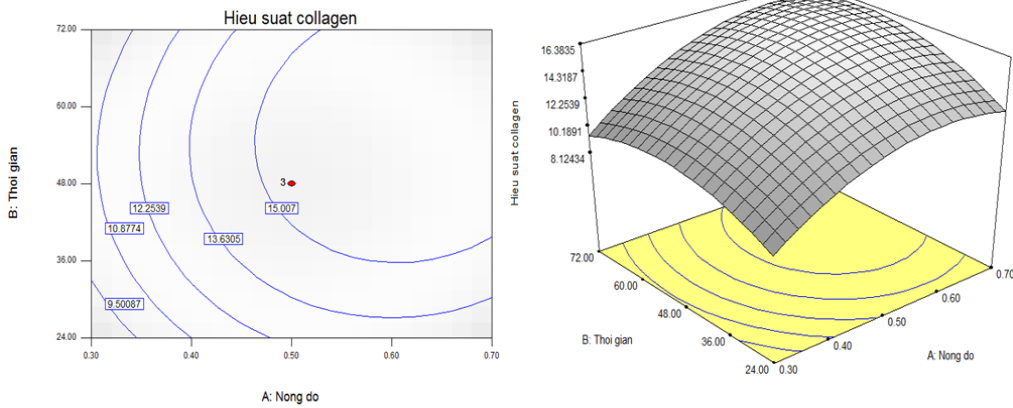
thấp thì độ nhớt collagen sẽ cao hơn khi chiết collagen ở nồng độ acid cao và thời gian dài. Ở nồng độ acid lớn hơn 0,65M và thời gian chiết lâu hơn 68 giờ cho thấy sự giảm mạnh về độ nhớt của sản phẩm collagen. Như vậy, thực

hiện quá trình chiết collagen với điều kiện nồng độ acid acetic nhỏ hơn 0,6M và thời gian chiết ngắn hơn 72 giờ thì sẽ thu được collagen có độ nhớt cao hơn.

DESIGN-EXPERT Plot

Hieu suat collagen
X = A: Nong do
Y = B: Thoi gian

Actual Factor
C: Ty le = 8.50

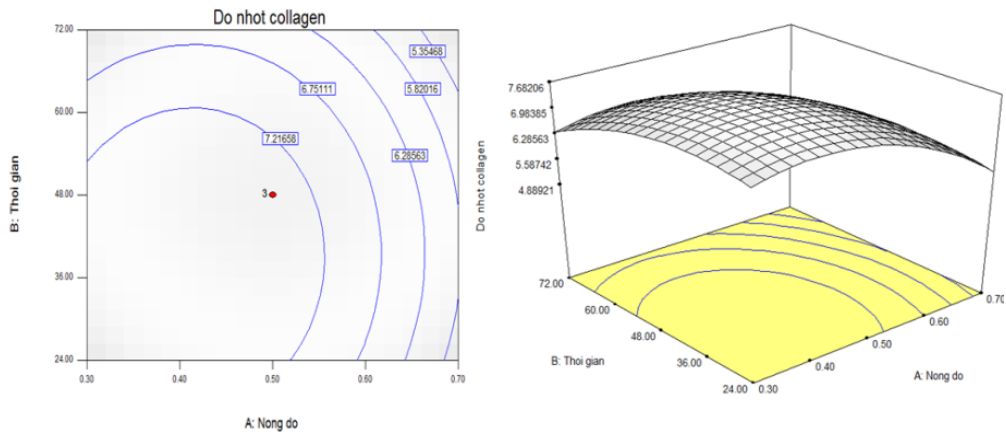


Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ acid acetic, thời gian và tỷ lệ chiết đến hiệu suất collagen

DESIGN-EXPERT Plot

Do nhot collagen
X = A: Nong do
Y = B: Thoi gian

Actual Factor
C: Ty le = 8.50



Hình 7. Ảnh hưởng của nồng độ acid acetic, thời gian và tỷ lệ chiết tới độ nhớt collagen

Bảng 4. Kết quả dự đoán thông số tối ưu công đoạn chiết collagen

Các yếu tố ảnh hưởng			Kết quả dự đoán		Kết quả thực nghiệm	
Nồng độ acid acetic (M)	Thời gian xử lý (giờ)	Tỷ lệ ngâm chiết (g/ml)	Hiệu suất thu hồi collagen (%)	Độ nhớt collagen (cP)	Hiệu suất thu hồi collagen (%)	Độ nhớt collagen (cP)
0,53	59,6	1/9,6	16,20	6,88	16,01a	7,02a
0,55	56,4	1/9,7	16,02	6,69	13,18b	5,93b
0,57	55,1	1/9,8	15,98	6,72	13,22b	6,23c

Ghi chú: Các kí tự khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $P < 0,05$.

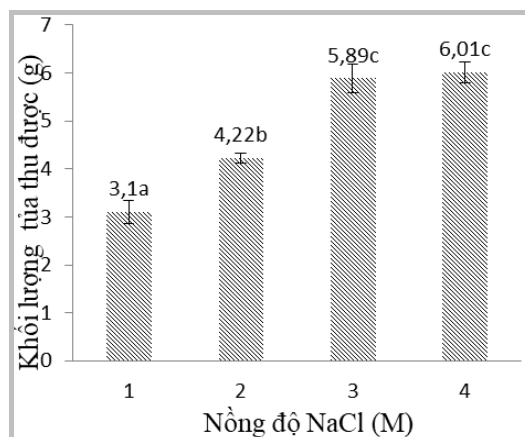
Thực nghiệm kiểm chứng số liệu tối ưu hóa theo các thông số của bảng 4 đã cho thấy nồng độ acid 0,53M, tỷ lệ ngâm chiết da cá/dung dịch là 1/9,6 g/ml và thời gian xử lý là 59,6 giờ thì cho hiệu suất thu hồi collagen và độ nhớt collagen cao nhất, tương ứng với 16,01 cP và 7,02 cP. Do đó, chúng tôi chọn chế độ chiết da cá Bò gai mốc bằng acid acetic nồng độ 0,53M, thời gian ngâm chiết là 59,6 giờ, tỷ lệ ngâm chiết da cá/dung dịch là 1/9,6 g/ml.

Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng acid acetic để tách chiết collagen. Cụ thể, Li et al., [30] đã chiết collagen từ da cá thu (*Scomberomorus niphonius*) bằng acid acetic 0,5M, tỷ lệ ngâm chiết là 1/15 g/ml trong thời gian 2 ngày cho hiệu suất tách chiết 0,37% (% trọng lượng khô). Nagai và cộng sự [7] tách chiết collagen

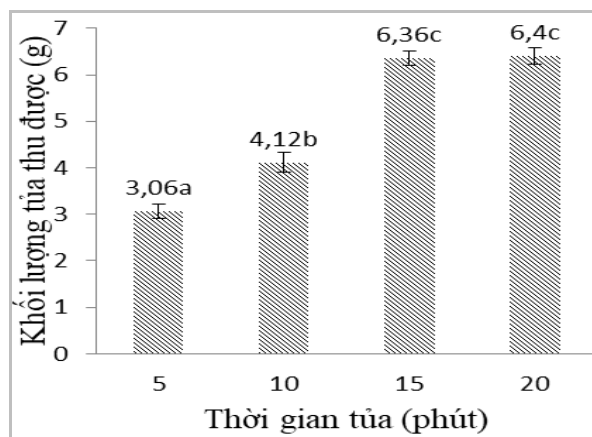
từ da cá nóc bằng acid acetic 0,5M cho hiệu suất 10,7% (% trọng lượng tươi).

Xác định chế độ kết tủa collagen bằng NaCl

Kết quả ở hình 8a cho thấy nồng độ muối có ảnh hưởng rõ rệt tới lượng kết tủa collagen thu được và nồng độ muối càng cao thì lượng kết tủa thu được càng lớn. Khi nồng độ NaCl sử dụng là 1M thì khối lượng tủa thu được chỉ là 3,1 g và khi tăng nồng độ muối lên 4M thì lượng tủa thu được 6,01 g. Khi nồng độ muối thấp thì kết tủa hình thành dạng nhũ tương với lượng kết tủa không nhiều và rất khó tách khỏi dung dịch. Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy không khác biệt về khối lượng tủa thu được ở nồng độ 3M so với 4M ($P > 0,05$). Do đó, nồng độ NaCl 3M được chọn là nồng độ kết tủa collagen tốt nhất.



(a)



(b)

Hình 8. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian kết tủa collagen bằng NaCl, (a): Ảnh hưởng của nồng độ; (b): Ảnh hưởng của thời gian

Kết quả ở hình 8a cho thấy nồng độ muối có ảnh hưởng rõ rệt tới lượng kết tủa collagen thu được và nồng độ muối càng cao thì lượng kết tủa thu được càng lớn. Khi nồng độ NaCl sử dụng là 1M thì khối lượng tủa thu được chỉ

là 3,1 g và khi tăng nồng độ muối lên 4M thì lượng tủa thu được 6,01 g. Khi nồng độ muối thấp thì kết tủa hình thành dạng nhũ tương với lượng kết tủa không nhiều và rất khó tách khỏi dung dịch. Kết quả phân tích thống kê cũng cho

thấy không khác biệt về khối lượng tua thu được ở nồng độ 3M so với 4M ($P > 0,05$). Do đó, nồng độ NaCl 3M được chọn là nồng độ kết tua collagen tốt nhất.

Kết quả trình bày ở hình 8b cho thấy thời gian tua có ảnh hưởng rõ rệt tới khối lượng kết tua collagen thu được và thời gian kết tua càng dài thì khối lượng kết tua thu được càng lớn. Cụ thể, ở thời gian tua 5 phút thì khối lượng tua thu được là 3,06 g, thời gian tua 20 phút thì khối lượng tua thu được 6,4 g. Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy không khác biệt về khối lượng tua thu được ở thời gian 15 phút so với 20 phút ($P > 0,05$). Do đó, thời gian 15 phút được chọn là thời gian kết tua collagen thích hợp nhất.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ NaOH 0,15M, tỷ lệ 1/13,9 g/ml, thời gian 56,9 giờ và nồng độ H_2O_2 6%, tỷ lệ da cá/ dung dịch H_2O_2 là 1/2 g/ml, thời gian 10 phút là tối ưu cho việc khử tạp chất phi collagen và tẩy màu da cá. Việc sử dụng nồng độ acid acetic 0,53M, tỷ lệ 1/9,6 g/ml trong thời gian 59,6 giờ là tối ưu để tách chiết và NaCl 3M trong 15 phút là tối ưu để tách chiết để thu hồi collagen.

Lời cảm ơn: Bài báo được hỗ trợ của đề tài VAST, Mã số: VAST 04.04/15–16. Tác giả chân thành cảm ơn Ths. Lê Thị Thu Thảo, phòng Động vật có xương sống biển, đã hỗ trợ trong việc định danh loài cá này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Birk, D. E., and Bruckner, P., 2005. Collagen Suprastructures. *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*, 247, 185–205.
- [2] Silva, T. H., Moreira-Silva, J., Marques, A. L., Domingues, A., Bayon, Y., and Reis, R. L., 2014. Marine origin collagens and its potential applications. *Marine drugs*, 12(12), 5881–5901. <https://doi.org/10.3390/md12125881>.
- [3] Benjakul, S., Nalinanon, S., and Shahidi, F., 2012. Fish collagen. *Food Biochemistry and Food Processing*, 365–387. <https://doi.org/10.1002/9781118308035.ch20>.
- [4] Kim, H. K., Kim, Y. H., Park, H. J., and Lee, N. H., 2013. Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from the skins of sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Fisheries Science*, 79(5), 849–856. Doi: 10.1007/s12562-013-0648-z.
- [5] Yamada, S., Yamamoto, K., Ikeda, T., Yanagiguchi, K., and Hayashi, Y., 2014. Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. *BioMed Research International*, 2014, 302932. <https://doi.org/10.1155/2014/302932>.
- [6] Li, Z., Liu, J. Z., Wang, Y. J., Liu, S. H., and Sun, M., 2013. Comparison between thermal hydrolysis and enzymatic proteolysis processes for the preparation of tilapia skin collagen hydrolysates. *Czech Journal of Food Sciences*, 31(1), 1–4. <https://doi.org/10.17221/49/2012-CJFS>.
- [7] Nagai, T., Araki, Y., and Suzuki, N., 2002. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). *Food chemistry*, 78(2), 173–177. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00396-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00396-X).
- [8] Sadowska, M., Kołodziejaska, I., and Niecikowska, C., 2003. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 81(2), 257–262. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00420-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00420-X).
- [9] Nishimoto, M., Mizuta, S., and Yoshinaka, R., 2004. Characterization of molecular species of collagen in muscles of Japanese amberjack, *Seriola quinqueradiata*. *Food Chemistry*, 84(1), 127–132. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00183-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00183-3).
- [10] Senaratne, L. S., Park, P. J., and Kim, S. K., 2006. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technology*, 97(2), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.024>.
- [11] Di, Y. U., Chang-Feng, C. H. I., Bin, W. A. N. G., Guo-Fang, D. I. N. G., and Zhong-Rui, L. I., 2014. Characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna

- (*Katsuwonus pelamis*). *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(9), 712–720. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60110-2](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60110-2).
- [12] Sankar, S., Sekar, S., Mohan, R., Rani, S., Sundaraseelan, J., and Sastry, T. P., 2008. Preparation and partial characterization of collagen sheet from fish (*Lates calcarifer*) scales. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(1), 6–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.08.003>.
- [13] Muralidharan, N., Shakila, R. J., Sukumar, D., and Jeyasekaran, G., 2013. Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6), 1106–1113. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0440-y>.
- [14] Jeong, H. S., Venkatesan, J., and Kim, S. K., 2013. Isolation and characterization of collagen from marine fish (*Thunnus obesus*). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(6), 1185–1191. Doi: 10.1007/s12257-013-0316-2.
- [15] Okazaki, E., and 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>.
- [16] Tuan, P. D., and Dzung, N. H., 2014. Extraction and isolation of collagen from the skins of basa fish (*Pangasius hypophthalmus*). *Vietnam Journal of Science and Technology*, 52(4), 431–440.
- [17] Benjakul, S., Thiansilakul, Y., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Kishimura, H., Prodpran, T., and Meesane, J., 2010. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(1), 132–138. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3795>.
- [18] Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., and Tanaka, M., 2005. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 93(3), 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.026>.
- [19] Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Kishimura, H., 2008. Tuna pepsin: characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threadfin bream (*Nemipterus* spp.). *Journal of Food Science*, 73(5), C413–C419. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00777.x>.
- [20] Nalinanon, S., Benjakul, S., and Kishimura, H., 2010. Collagens from the skin of arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*) solubilized with the aid of acetic acid and pepsin from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) stomach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(9), 1492–1500. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3973>.
- [21] Zhang, M., Liu, W., and Li, G., 2009. Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). *Food Chemistry*, 115(3), 826–831. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.006>.
- [22] Xu, S., Yang, H., Shen, L., and Li, G., 2017. Purity and yield of collagen extracted from southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) skin through improved pretreatment methods. *International Journal of Food Properties*, 20(Sup1), S141–S153. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1291677>.
- [23] Le, P. T. H., Tran, Q. T., 2017. Extraction of collagen from salmon skin (*Oncorhynchus mykiss*) by chemical method. *Journal of Food Science and Technology*, 12, 108–117.
- [24] Le, T. T. T., Vo, V. Q., Nguyen, P. U. V., Tran, T. H. H., Tran, C. T., 2015. Investigation and make up collection of common and rare fish in the South Central Coast. *Scientific Report sponsored by IOC/UNESCO, Institute of Oceanography, Nha Trang*.

- [25] George, E. P., Hunter, J. S., Hunter, W. G., Bins, R., Kirilin IV, K., and Carroll, D., 2005. Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery (pp. 235–273). *New York, NY, USA: Wiley*.
- [26] Anonymous, 1978. Meat and meat products-determination of L (-) hydroxyproline content (reference method). *Int Stand ISO*, 3496(E).
- [27] Kechaou, E. S., Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Jaouen, P., Gouygou, J. P., Bergé, J. P., and Amar, R. B., 2009. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(2), 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.10.018>.
- [28] Smith, P. E., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... and Klenk, D. C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- [29] Bligh, E. G., and Dyer, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- [30] Li, Z. R., Wang, B., Chi, C. F., Zhang, Q. H., Gong, Y. D., Tang, J. J., ... and Ding, G. F., 2013. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). *Food Hydrocolloids*, 31(1), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.001>.
- [31] Kaewdang, O., Benjakul, S., Kaewmanee, T., and Kishimura, H., 2014. Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Chemistry*, 155, 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.076>.