

CHIẾT COLLAGEN TỪ DA CÁ HỒI (*Oncorhynchus mykiss*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP HÓA HỌC

Lê Phan Thùy Hạnh*, Trần Quyết Thắng

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: *hanhlpt@cntp.edu.vn*

Ngày nhận bài: 10/8/2016; Ngày chấp nhận đăng: 12/9/2017

TÓM TẮT

Collagen của da cá hồi đã được tách chiết bằng phương pháp hóa học. Dung môi tách chiết là axit axetic. Hàm mục tiêu của các thí nghiệm tách chiết là độ nhớt – đo bằng nhớt kế OSVAL. Điều kiện của quá trình tách chiết được tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology). Đầu tiên, da cá được xử lý bằng NaOH 0,05 M, tỷ lệ w/v = 1/6, trong thời gian 2 giờ nhằm loại bỏ các tạp chất phi collagen, rồi tiếp tục xử lý H₂O₂ 10%, tỷ lệ w/v = 1/1, trong thời gian 10 phút để khử các sắc tố trên da cá. Quá trình chiết collagen được thực hiện với axit axetic 0,25 M, tỷ lệ w/v = 1/3 trong 24 giờ, dịch chiết được kết tủa collagen bằng NaCl 4 M trong 5 phút. Collagen thu được ở dạng miếng và có màu trắng xám.

Từ khóa: Collagen, chiết collagen, da cá hồi, *Oncorhynchus mykiss*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Collagen là một loại protein cấu trúc chính của cơ thể, có rất nhiều chức năng trong cơ thể con người và được ứng dụng rộng rãi trong ngành y dược, mỹ phẩm, thực phẩm [1-3].

Với nhu cầu rất lớn về collagen trên thế giới cũng như ở Việt Nam trong những năm gần đây, thêm vào đó là nguồn nguyên liệu da cá để sản xuất collagen ở nước ta khá dồi dào, giá rẻ và có tiềm năng phát triển nên đề tài “Nghiên cứu quy trình chiết collagen từ da cá hồi” được thực hiện với mong muốn tạo ra nhiều sản phẩm có chất lượng từ collagen để phục vụ cho sức khỏe và đời sống con người, góp phần nâng cao hiệu quả kinh tế cho các ngư dân và các doanh nghiệp sản xuất, đồng thời cũng góp phần vào việc giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

Mặc khác, collagen da cá có thể được sử dụng thay thế cho collagen động vật trên cạn với ưu điểm không có chất béo và tỷ lệ hấp thu cao [4].

Cho đến nay, đã có một số nghiên cứu quy trình chiết collagen từ da các loài cá nhiệt đới và ôn đới khác, tuy nhiên chưa có nhiều nghiên cứu về quy trình chiết collagen từ da cá hồi. Mục đích của nghiên cứu này là bước đầu xây dựng quy trình thu nhận collagen từ da cá hồi ở Việt Nam bằng phương pháp hóa học.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Da cá hồi được thu mua ở dạng tươi sau phi lê, còn nguyên miếng, còn vảy, thịt cá và mỡ còn sót trong da cá.

Nguyên liệu sau khi tiếp nhận được xử lý loại sạch vảy phía ngoài da, lớp mỡ và thịt cá còn sót trong da cá, sau đó rửa lại bằng nước sạch. Dùng dao cắt thành những miếng nhỏ có

kích thước khoảng 2 x 2 cm, sau đó rửa sạch lại bằng nước sạch và để ráo (trong quá trình xử lý da được bảo quản bằng nước đá có nhiệt độ $\leq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Da cá sau khi ráo được cân thành gói, mỗi gói 50 g và được bảo quản trong ngăn đông của tủ lạnh.

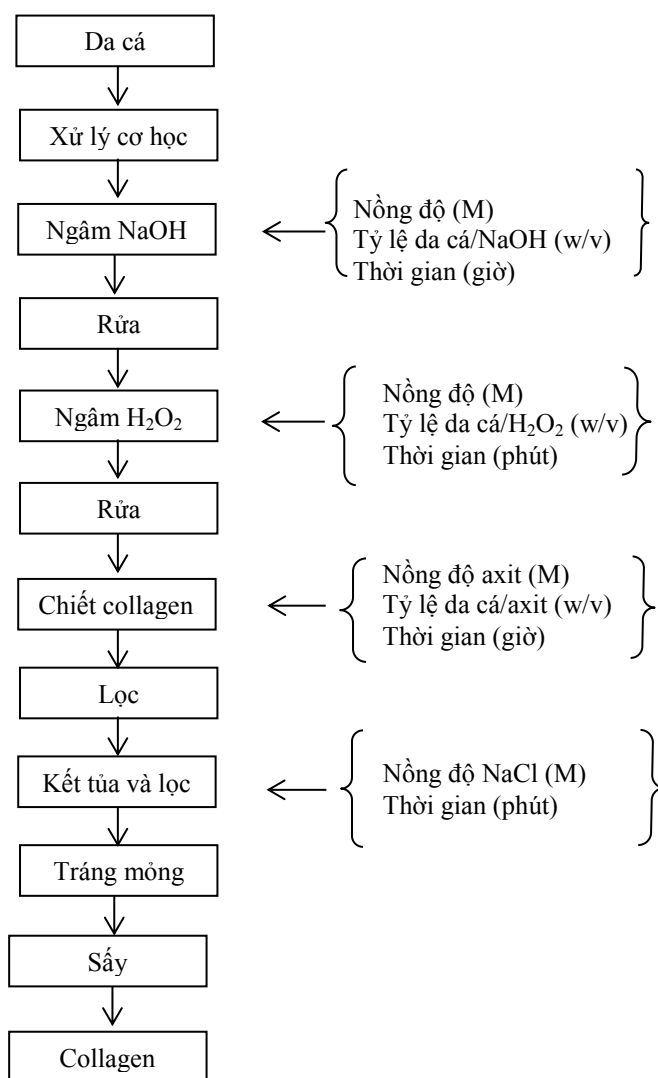
2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân tích

Xác định hàm lượng lipid bằng phương pháp Soxhlet. Xác định hàm lượng khoáng bằng phương pháp nung theo TCVN 5105-90. Xác định màu mẫu thử bằng máy đo màu NR – 3000. Xác định độ nhớt bằng nhớt kế OSVAL: cấu tạo thuộc loại nhớt kế mao quản, độ nhớt của dung dịch cần đo tỷ lệ với thời gian chảy của một thể tích dung dịch qua ống [5]. Collagen có thể hòa tan trong dung dịch axit tạo thành dung dịch keo [6]. Dung dịch keo có độ nhớt càng cao thì hàm lượng collagen càng nhiều [7].

2.2.2. Bố trí thí nghiệm

Các công đoạn nghiên cứu được bố trí theo Hình 2.1.



Hình 2.1. Quy trình tách chiết collagen từ da cá hồi
w - Khối lượng (g); v - Thể tích (mL)

Da cá sau khi rửa, cắt nhỏ với kích thước khoảng 2 x 2 cm được xử lý qua kiềm NaOH (nồng độ 0,0125, 0,025, 0,05, 0,1, 0,15 M; tỷ lệ (w/v) là 1/4, 1/6, 1/8, 1/10, 1/12; thời gian 1, 2, 3, 4, 5 giờ) để khử các tạp chất phi collagen như lipid, protein, khoáng, sắc tố và một số chất trên nguyên liệu da cá. Sau đó, da cá được rửa lại bằng nước rồi đem xử lý H₂O₂ (nồng độ 5, 10, 15, 20 %; tỷ lệ (w/v) là 1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5; thời gian 5, 10, 15, 20 phút) để tẩy màu cho nguyên liệu nhằm mục đích sản phẩm collagen thu được có màu sáng hơn. Kế tiếp, da cá được tách chiết collagen bằng axit axetic (nồng độ 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 M; tỷ lệ (w/v) là 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6; thời gian 12, 24, 36, 48, 60 giờ) nhằm tìm ra điều kiện chiết hiệu quả nhất. Sau khi xác định được điều kiện chiết collagen tối ưu, dịch chiết được kết tủa bằng NaCl (nồng độ 1, 2, 3, 4, 5 M; thời gian 2, 5, 10, 15 phút), rồi lọc thu kết tủa và xác định hiệu suất chiết collagen.

2.2.3. Phân tích 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 (\pm SD). Phần mềm SPSS được sử dụng để tìm ra sự khác biệt giữa các thí nghiệm qua xử lý ANOVA và LSD. Phần mềm Modde 5.0 (Umetrics AB) được ứng dụng để qui hoạch thực nghiệm và tối ưu hóa quá trình trích ly. Đồ thị được vẽ bằng công cụ Microsoft Excel.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định chế độ xử lý NaOH tách tạp chất

Sau khi xử lý cơ học, da cá được xử lý bằng NaOH. Xác định hàm lượng khoáng, lipid, protein còn lại trong da cá và độ nhớt của dung dịch NaOH sau xử lý. Hàm lượng protein, lipid, khoáng, độ nhớt xác định được thấp nhất sẽ tương ứng với hiệu quả khử protein, lipid và khoáng tốt nhất và ngược lại.

Số liệu kết quả xử lý NaOH được thể hiện dưới dạng trung bình cộng của 3 lần làm thí nghiệm và được trình bày ở Bảng 3.1, Bảng 3.2, Bảng 3.3.

Bảng 3.1: Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến hàm lượng protein, lipid, khoáng và độ nhớt.

Nồng độ (M)	Tỷ lệ (w/v)	Thời gian (giờ)	Hàm lượng protein (%)	Hàm lượng lipid (%)	Hàm lượng khoáng (%)	Độ nhớt (Pa.S)
0,025	1/10	2	15,75 \pm 0,560	0,57 \pm 0,020	0,17 \pm 0,001	1,13 \pm 0,046
0,05			11,65 \pm 0,330	0,11 \pm 0,005	0,13 \pm 0,002	1,26 \pm 0,046
0,1			10,20 \pm 0,400	0,24 \pm 0,010	0,12 \pm 0,001	1,72 \pm 0,046
0,15			6,84 \pm 0,286	0,32 \pm 0,010	0,12 \pm 0,00	2,21 \pm 0,12

Bảng 3.2: Ảnh hưởng của tỷ lệ da cá/NaOH đến hàm lượng protein, lipid, khoáng và độ nhớt.

Nồng độ (M)	Tỷ lệ (w/v)	Thời gian (giờ)	Hàm lượng protein (%)	Hàm lượng lipid (%)	Hàm lượng khoáng (%)	Độ nhớt (Pa.S)
0,05	1/4	2	16,36 \pm 0,39	0,20 \pm 0,000	0,15 \pm 0,001	1,13 \pm 0,046
	1/6		12,36 \pm 0,36	0,10 \pm 0,005	0,13 \pm 0,002	1,18 \pm 0,040
	1/8		12,20 \pm 0,36	0,11 \pm 0,005	0,12 \pm 0,002	1,26 \pm 0,046
	1/10		7,89 \pm 0,27	0,10 \pm 0,005	0,12 \pm 0,001	1,72 \pm 0,046

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH đến hàm lượng protein, lipid, khoáng và độ nhớt.

Nồng độ (M)	Tỷ lệ (w/v)	Thời gian (giờ)	Hàm lượng protein (%)	Hàm lượng lipid (%)	Hàm lượng khoáng (%)	Độ nhớt (Pa.S)
0,05	1/6	1	16,68 ± 0,42	0,30 ± 0,000	0,14 ± 0,003	1,11 ± 0,046
		2	12,93 ± 0,23	0,10 ± 0,005	0,12 ± 0,002	1,21 ± 0,040
		3	8,40 ± 0,36	0,12 ± 0,005	0,09 ± 0,002	1,28 ± 0,046
		4	3,84 ± 0,21	0,12 ± 0,008	0,09 ± 0,002	1,74 ± 0,046

Khi xử lý da cá với nồng độ kiềm NaOH càng cao và thời gian càng dài thì hiệu suất khử tạp chất càng lớn trong khi đó tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch không ảnh hưởng nhiều đến kết quả khử tạp chất phi collagen.

Điều này được giải thích bởi kiềm có tác dụng làm sạch các tạp chất phi collagen bao gồm lipid, khoáng, sắc tố, protein khác. Cơ chế khử lipid của kiềm chính nhờ phản ứng xà phòng hóa các axit béo - sản phẩm thủy phân của triglycerit. Ngoài ra kiềm còn tác dụng phá vỡ các liên kết mạch bên, các cầu liên kết ion làm cho khoáng và sắc tố tách ra dễ dàng. Một số protein phi collagen trong da cá có thể bị phá vỡ cấu trúc bậc cao và tách ra khỏi nguyên liệu. Điều này chứng tỏ, khi ngâm nguyên liệu trong dung dịch kiềm NaOH ở nồng độ càng cao thì cấu trúc protein bị phá hủy, cắt mạch rất lớn dẫn tới hiệu suất khử protein càng cao. Tuy nhiên, khi sử dụng nồng độ kiềm lớn thì xuất hiện các dấu hiệu tác động không có lợi cho mạch collagen của da cá, cụ thể là collagen ở trạng thái không bền nên dễ bị thủy phân thành những mạch ngắn, dung dịch xử lý có độ nhớt. Còn tỷ lệ NaOH/da cá càng cao thì hiệu suất khử các tạp chất phi collagen càng tăng nhưng tới một ngưỡng nào đó thì tăng chậm hoặc hầu như là không tăng nữa. Ở đây, chỉ cần tỷ lệ nhỏ đã đủ để khử các tạp chất. Mặt khác, dưới tác động của môi trường kiềm mạnh trong thời gian dài làm cho cấu trúc mạch collagen kém bền và lỏng lẻo.

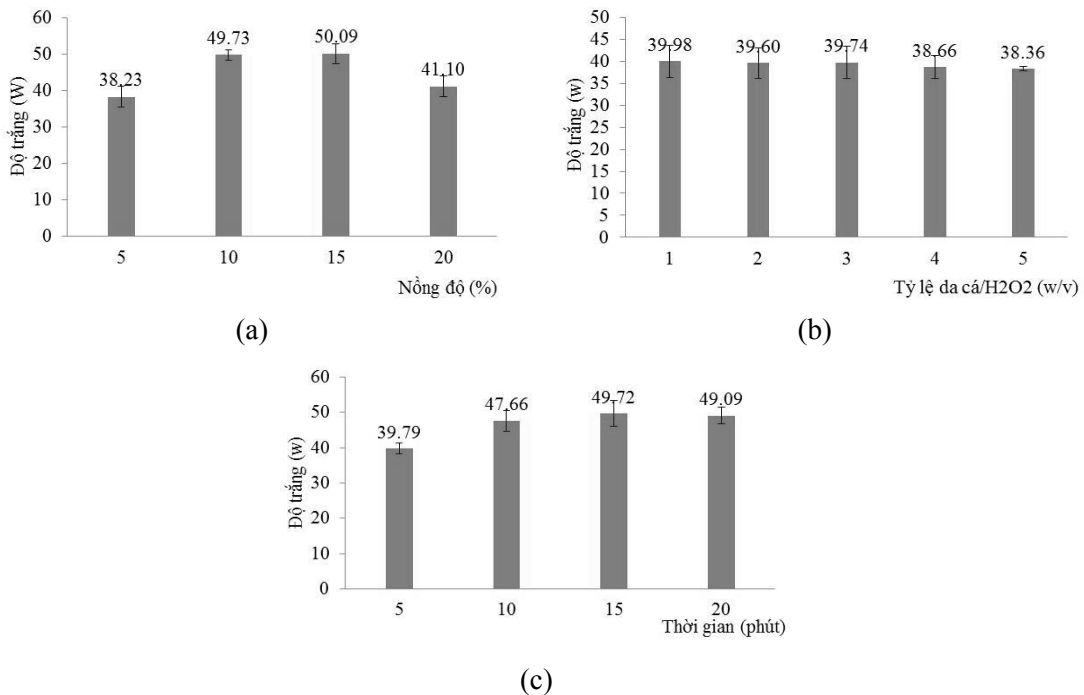
Thực tế cho thấy khi nồng độ NaOH là 0,15 M thì hàm lượng protein còn lại trong da cá đạt giá trị nhỏ nhất là 6,84 %, khi nồng độ là 0,05 M thì hàm lượng lipid và khoáng còn lại trong da cá đạt giá trị nhỏ nhất là 0,11 % và 0,13%. Tuy nhiên, khi sử dụng nồng độ kiềm lớn hơn 0,05 M thì xuất hiện các dấu hiệu tác động không có lợi cho mạch collagen của da cá, cụ thể là collagen ở trạng thái không bền nên dễ bị thủy phân thành những mạch ngắn, dung dịch xử lý có độ nhớt. Vì vậy, nồng độ NaOH 0,05 M được chọn là nồng độ khử tạp chất tốt nhất.

Trong khi đó hàm lượng protein còn lại thay đổi rõ rệt khi tỷ lệ da cá/NaOH tăng từ 1:4 đến 1:12, hàm lượng lipid và khoáng thay đổi không đáng kể, còn độ nhớt trong dung dịch xử lý tăng dần theo tỷ lệ. Khi tiến hành so sánh các cặp tỷ lệ với nhau, ở tỷ lệ 1:4 và 1:6 thì hàm lượng protein, lipid và khoáng có sự khác biệt có ý nghĩa với khoảng tin cậy 95%. Còn các cặp tỷ lệ 1/6 so với 1/8; 1/10 và 1/12 không có ý nghĩa. Đồng thời, ở cặp tỷ lệ 1:4 và 1:6 độ nhớt của dung dịch sau xử lý ít nhất. Tuy nhiên, khi xét đến tính kinh tế về hóa chất nhằm tiết kiệm hay việc thải các chất sau xử lý ra môi trường, chọn tỉ lệ 1/6 là tỉ lệ khử tạp chất tốt nhất.

Bên cạnh đó, hiệu suất khử lipid chỉ tăng ở thời gian 1 giờ đến 2 giờ sau đó không tăng nữa. Trong khi đó, hàm lượng protein, khoáng và độ nhớt thì tăng theo thời gian xử lý. Do đó, dựa vào các phân tích trên và thực tế làm thí nghiệm cho thấy thời gian khoảng 2 giờ sẽ cho hiệu quả khử tạp chất phi collagen là phù hợp.

3.2. 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 dưới dạng trung bình cộng của 3 lần làm thí nghiệm được trình bày ở Hình 3.1 và Bảng 3.4, Bảng 3.5 và Bảng 3.6.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ, tỷ lệ và thời gian tẩy màu bằng H₂O₂ đến độ trắng.
(a): Ảnh hưởng của nồng độ; (b): Ảnh hưởng của tỷ lệ; (c): Ảnh hưởng của thời gian

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ H₂O₂ đến độ nhớt

Nồng độ (%)	Tỷ lệ (w/v)	Thời gian (phút)	Độ nhớt (Pa.S)
5	1/3	10	1,11 ± 0,046
10			1,13 ± 0,046
15			1,21 ± 0,040
0			1,51 ± 0,046

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ da cá/H₂O₂ đến độ nhớt

Nồng độ (%)	Tỷ lệ (w/v)	Thời gian (phút)	Độ nhớt (Pa.S)
10	1/1	10	1,11 ± 0,046
	1/2		1,13 ± 0,046
	1/3		1,16 ± 0,000
	1/4		1,13 ± 0,046

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của thời gian xử lý H₂O₂ đến độ nhớt

Nồng độ (%)	Tỷ lệ (w/v)	Thời gian (phút)	Độ nhớt (Pa.S)
10	1/1	5	1,13 ± 0,046
		10	1,15 ± 0,023
		15	1,72 ± 0,046
		20	2,21 ± 0,117

Từ thực nghiệm, ở nồng độ H₂O₂ 10% cho kết quả xử lý độ trắng tốt hơn ở nồng độ H₂O₂ 5% và khác nhau không có ý nghĩa về độ trắng với nồng độ H₂O₂ 15%. Khi nồng độ xử lý H₂O₂ 20% thì độ trắng có xu hướng giảm. Đồng thời, độ nhớt của dung dịch sau xử lý ở nồng độ H₂O₂ 5% và 10% không nhiều, da cá còn nguyên miếng nhưng đến nồng độ H₂O₂ 20%, độ nhớt của dung dịch sau xử lý tăng lên, da cá trở nên mềm hơn. Điều này dễ gây thất

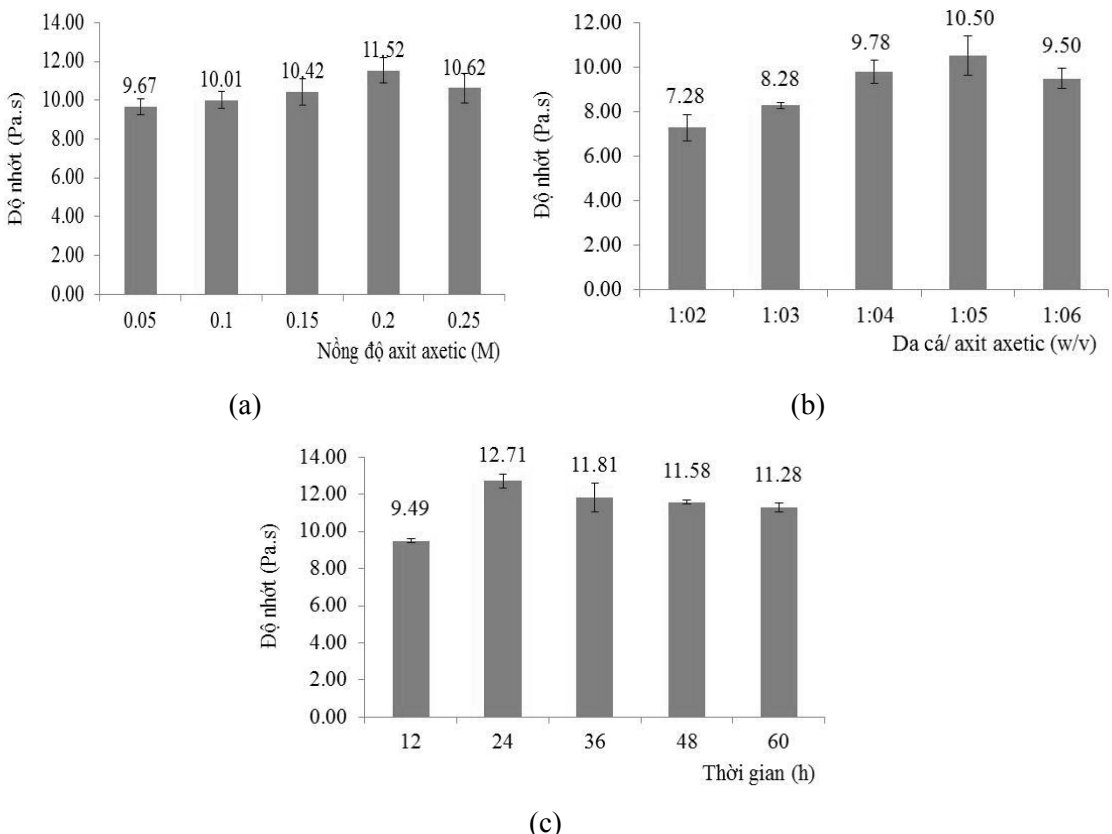
thoát collagen trong quá trình xử lý. Vì vậy, nồng độ H₂O₂ 10% là nồng độ thích hợp nhất để xử lý tẩy màu cho da cá.

Khi tiến hành xử lý Anova, sự thay đổi về độ trắng cũng như độ nhớt thu được ở từng tỉ lệ da cá/H₂O₂ là không có sự khác biệt về mặt thống kê trong khoảng tin cậy 95%. Đồng thời, khi xử lý LSD, các cặp tỷ lệ không khác nhau có ý nghĩa ($P > 0,05$). Vì vậy, tỷ lệ da cá/H₂O₂ (w/v) 1/1 là tỷ lệ thích hợp nhất để xử lý tẩy màu cho da cá.

Trong khi đó, độ trắng tăng từ 39,79 (w) lên 49,09 (w) trong khoảng thời gian từ 5 phút đến 15 phút. Tuy nhiên, độ nhớt lại giảm theo thời gian xử lý H₂O₂. Điều này có thể được giải thích là do H₂O₂ tác động lên các yếu tố trên tế bào da, có tác dụng chủ yếu là tẩy màu da cá. Khi thời gian tăng lên, lúc này các sắc tố trên da cá đã mất hết làm biến đổi các liên kết khác trên tế bào, phá vỡ tế bào, gây ra hiện tượng cháy H₂O₂, da có màu vàng, đồng thời độ nhớt của dung dịch sau xử lý tăng.

Đồng thời, khi xử lý LSD cho thấy các cặp thời gian trong xử lý H₂O₂ về độ trắng ở 5 phút và 10 phút có sự khác biệt, còn ở 10 phút, 15 phút và 20 phút gần như không có sự thay đổi. Bên cạnh đó, ở cặp thời gian trong xử lý H₂O₂ về độ nhớt ở 5 phút và 10 phút không có sự khác biệt và khác biệt rất rõ với các thời gian 15, 20 phút. Vì vậy, thời gian ngâm da là 10 phút với dung dịch H₂O₂ là phù hợp.

3.3. Xác định chế độ chiết collagen bằng axit axetic



Hình 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ, tỷ lệ và thời gian chiết bằng axit axetic đến độ nhớt.
(a): Ảnh hưởng của nồng độ; (b): Ảnh hưởng của tỷ lệ; (c): Ảnh hưởng của thời gian

Độ nhớt ở nồng độ 0,05 M đến 0,20 M, tăng từ 9,67 lên 11,52 Pa.S (giá trị độ nhớt cao nhất tương ứng với hiệu quả chiết collagen tốt nhất). Khi nồng độ axit là 0,25 M thì độ nhớt lại bắt đầu giảm. Điều này được giải thích bởi khả năng hòa tan của collagen phụ thuộc vào pH của dung dịch, pH càng giảm hoặc nồng độ axit càng tăng thì độ hòa tan của collagen

trong dịch chiết càng cao. Tuy nhiên, 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 [8]. Đồng thời, sự khác biệt về kết quả đo độ nhớt của mẫu được ngâm nồng độ 0,20 M là có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95% và kết quả đo độ nhớt là lớn nhất. Vì vậy, nồng độ axit axetic 0,20 M được chọn là nồng độ chiết collagen tốt nhất.

Ở tỉ lệ 1/4; 1/5 và 1/6 đạt giá trị độ nhớt là cao hơn so với tỉ lệ 1/2 và 1/3. Từ đó, cho thấy tỉ lệ ảnh hưởng đến hiệu quả chiết collagen từ da cá hồi, sự tăng dần độ nhớt tỉ lệ thuận với tỷ lệ, với tỉ lệ 1/5 thì kết quả độ nhớt đo được là lớn nhất. Với tỉ lệ 1/2 thì chưa đủ thể tích để tạo điều kiện cho dung môi hòa tan hết lượng collagen có trong da cá, do đó độ nhớt đo được là thấp nhất. So sánh các cặp tỉ lệ với nhau thì sự khác biệt giữa cặp tỉ lệ 1/4 so với 1/2 và 1/3 là có ý nghĩa ($P < 0,05$) còn cặp 1/4 so với 1/5 và 1/6 không có ý nghĩa ($P > 0,05$). Chọn tỉ lệ thích hợp để chiết collagen từ da cá hồi có hiệu quả tốt nhất là tỉ lệ 1/4 hoặc 1/5. Tuy nhiên, để tiết kiệm ngân sách và giảm thiểu việc thải các chất sau xử lý ra môi trường, chọn tỷ lệ 1/4 là tỷ lệ tốt nhất để chiết collagen.

Khi ngâm da cá trong dung dịch axit axetic 0,20 M, tỷ lệ 1/4 sau 24 giờ độ nhớt đo được cao hơn so với các thời gian còn lại. Độ nhớt tăng từ 9,47 ở 12 giờ lên 12,71 Pa.S sau 24 giờ ngâm. Nhưng khi ngâm từ 24 giờ đến 60 giờ độ nhớt lại giảm dần. Vì vậy, thời gian ngâm 24 giờ được chọn là thời gian chiết collagen tốt nhất.

Qua kết quả khảo sát các yếu tố độc lập, cả 3 yếu tố: nồng độ dung môi, tỷ lệ da cá/dung môi và thời gian ngâm đều ảnh hưởng đến kết quả độ nhớt ($P < 0,05$). Để tối ưu hóa quá trình chiết collagen, yếu tố thời gian được cố định là 24 giờ, như vậy còn lại hai yếu tố: nồng độ dung môi axit axetic, tỷ lệ da cá/dung môi được khảo sát đồng thời.

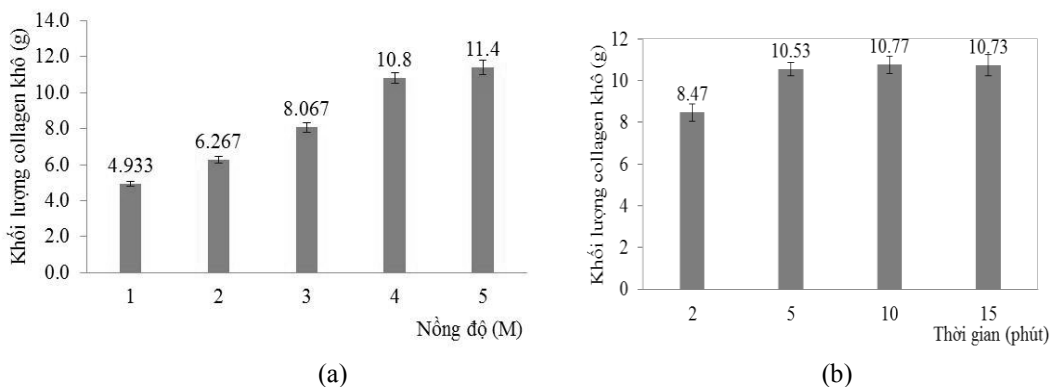
Phương trình hồi qui thực nghiệm có dạng như sau:

$$Y = 8,6 + 0,55X_1 - 3,47X_2 + 1,26X_{12} + 1,98X_{22}$$

Kết quả kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi qui với thực nghiệm cho thấy các yếu tố thí nghiệm có ảnh hưởng mạnh đến kết quả đo độ nhớt ($P < 0,05$). Tính tương thích của phương trình hồi qui (lack of fit) được kiểm tra với sự hỗ trợ của phần mềm Modde 5.0. Kết quả kiểm định “lack of fit” là không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$); như vậy, phương trình hồi qui có sự tương thích cao với thực nghiệm. Tóm lại, mô hình thống kê có thể được sử dụng để dự đoán điều kiện tối ưu của quá trình trích ly.

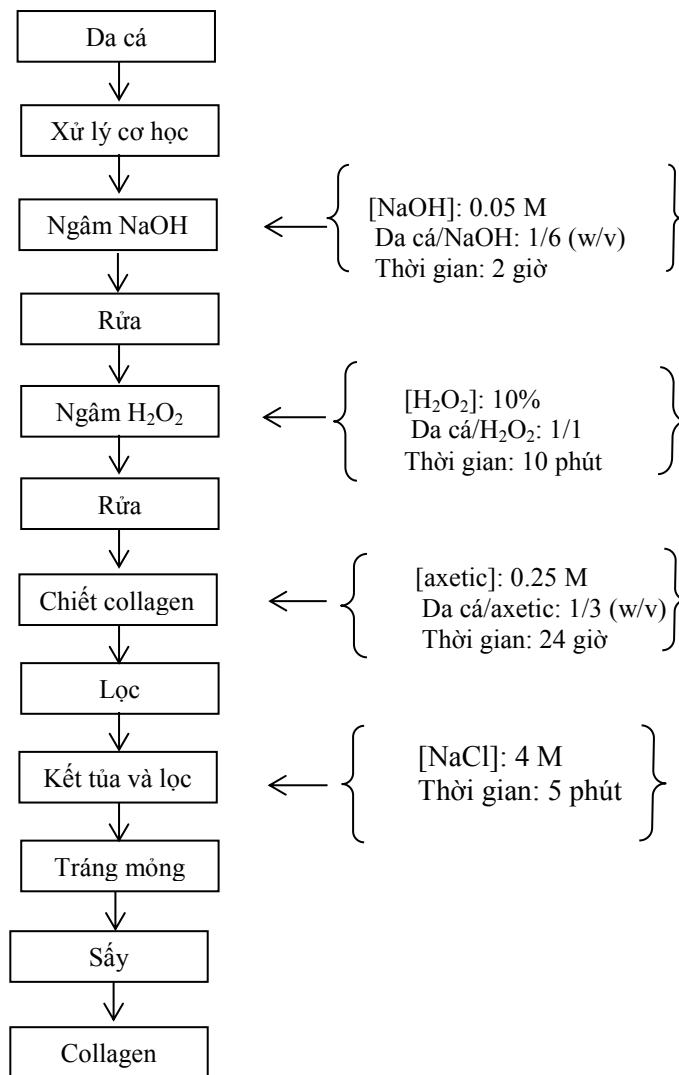
Sử dụng phần mềm Modde 5.0 để xử lý kết quả thí nghiệm đã tối ưu được các chế độ xử lý axit axetic như sau: nồng độ 0,25 M, tỉ lệ 1/3 và thời gian 24 giờ.

3.4. Xác định chế độ kết tủa collagen bằng NaCl



Hình 3.3. 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

Khi nồng độ muối thấp (1 M) thì khối lượng collagen khô thu được thấp (4,933 g). Điều này phù hợp với quy luật lý thuyết vì bình thường trong dung dịch, các gốc kỵ nước của phân tử protein tập trung trên bề mặt, tiếp xúc trực tiếp với các phân tử nước. Các phân tử nước này ngăn cản quá trình hình thành liên kết để tạo kết tủa giữa các phân tử protein với nhau. Khi nồng độ dung dịch muối tăng, các phân tử muối bị solvate hóa làm giảm số phân tử nước xung quanh bề mặt các phân tử protein tạo điều kiện cho các bề mặt kỵ nước tiến đến gần nhau và kết tủa xuống. Vì vậy 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. Khi sử dụng muối có nồng độ lần lượt là 2 M, 3 M, 4 M thì khối lượng collagen khô thu được tăng dần lên và đến nồng độ 5 M thì khối lượng collagen khô thu được tăng chậm. Sự khác biệt về khối lượng collagen thu được ở nồng độ 4 M so với các nồng độ 1 M, 2 M và 3 M là có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95% và khối lượng collagen khô thu được là lớn nhất. Vì vậy, nồng độ NaCl 4 M được chọn là nồng độ kết tủa collagen tốt nhất.



Hình 3.4. Quy trình tách chiết collagen từ da cá hồi

w - Khối lượng (g); v - Thể tích (mL)

Ở thời gian 2 phút là quá ngắn, không đủ để kết tủa collagen nên khối lượng collagen khô thu được thấp (8,47 g) hơn so với các thời gian 5, 10 và 15 phút. Sự khác biệt về khối lượng collagen thu được ở thời gian 5 phút so với thời gian 2 phút là có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95%, trong khi đó khối lượng collagen thu được ở thời gian 5 phút so với thời gian 10 và 15 phút là không có ý nghĩa thống kê. Vì vậy, thời gian 5 phút được chọn là thời gian kết tủa collagen tốt nhất.

3.5. Đề xuất qui trình tách chiết collagen từ da cá hồi

Qui trình tách chiết collagen từ da cá hồi được đề xuất ở Hình 3.4. 100 g da cá hồi tươi đem tách chiết collagen theo qui trình này, sau khi chiết và kết tủa thu được 10 g collagen khô dạng miếng và có màu trắng xám.

4. KẾT LUẬN

Trong phạm vi khảo sát, chúng tôi đã xác định được chế độ tách tạp chất phi collagen bằng NaOH ở nồng độ 0,05 M, tỷ lệ da cá/NaOH là 1/6 (w/v) trong thời gian 2 giờ; chế độ tẩy màu da cá bằng H₂O₂ ở nồng độ 10%, tỷ lệ da cá/H₂O₂ là 1/1 (w/v) trong thời gian 10 phút; tối ưu được công đoạn chiết collagen ở nồng độ axit axetic 0,25 M, tỷ lệ da cá/axit axetic là 1/3 (w/v) trong thời gian 24 giờ; thực hiện kết tủa collagen bằng NaCl 4 M trong 5 phút; đề xuất được quy trình sản xuất collagen từ da cá hồi. Với qui trình này, cứ 100 g da cá tươi, sau khi chiết và kết tủa thu được 10 g collagen khô dạng miếng và có màu trắng xám.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. and Tanaka, M. - Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*), Food Chemistry **93** (2005) 475-484.
2. Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Kishimura, H. - Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*), Food Chemistry **104** (2007) 593-601.
3. Inwoo Bae *et al.* - Biochemical properties of acid - soluble collagens extracted from the skins of underutilized fishes, Food Chemistry **108** (2008) 49-54.
4. Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Kishimura, H. - Tuna pepsin: Characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threadfin bream (*Nemipterus spp.*), Journal of Food Science **73** (2008) 413-419.
5. Nguyễn Thị Hồng Hạnh. - Hướng dẫn thí nghiệm phân tích thực phẩm, Đại học Bách khoa Tp.HCM, 2008.
6. Skierka, E., and Sadowska, M. - The Influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of baltic cod (*Gadus morhua*), Food Chemistry **105** (2007) 1302-1306.
7. Yulong Lia, Congde Qiaoa, Lei Shia, Qingwei Jianga & Tianduo Lia. - Viscosity of collagen solutions: Influence of concentration, temperature, adsorption, and role of intermolecular interactions, Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics **53:5** (2014) 893-901.
8. Peck Loo Kiew and Mashital Mat Don. - The influence of acetic acid concentration on the extractability of collagen from the skin of hybrid Clarias sp. and its physicochemical properties: A preliminary study, Focusing on Modern Food Industry (FMFI) **2** (3) (2013) 123-128.

ABSTRACT

EXTRACTION OF COLLAGEN FROM SALMON SKIN (*Oncorhynchus mykiss*)
BY CHEMICAL METHOD

Le Phan Thuy Hanh*, Tran Quyet Thang
Ho Chi Minh City University of Food Industry
*Email: hanhlpt@cntp.edu.vn

The collagen of salmon skin was extracted using acetic acid. The objective of the extraction experiments is the viscosity - measured by viscometer OSVAL. The extraction conditions were optimized by Response Surface Methodology. Firstly, salmon skin was treated with 0.05M NaOH, with a solid/solution ratio of 1/6 (w/v) during 2 hours in order to clean impurities, and then treated in 10% H₂O₂, with a solid/solution ratio of 1/1 (w/v) in 10 minutes to reduce the pigment in the fish skin. Collagen extraction process was performed with 0.25 M acetic acid, a solid/solution ratio of 1/3 (w/v) in 24 hours. Collagen extracts were precipitated by 4 M NaCl in 5 minutes. The obtained collagen is grey white and in pieces.

Keywords: Collagen, collagen extract, salmon skin, *Oncorhynchus mykiss*.