

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN THỦY PHÂN COLLAGEN TỪ DA CÁ NGỪ VÂY VÀNG (*Thunnus albacares*) THEO MÔ HÌNH BOX-BEHNKEN

Nguyễn Công Bình*, Đinh Hữu Đông, Trần Thị Phương Kiều,
Đào Thị Tuyết Mai, Trần Quốc Đám

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: binhnc@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 10/6/2022; Ngày chấp nhận đăng: 05/9/2022

TÓM TẮT

Collagen thủy phân từ da cá ngừ được ứng dụng rộng rãi trong mỹ phẩm, dược phẩm và công nghiệp thực phẩm. Để tối ưu hóa điều kiện tách chiết collagen từ da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*) bằng enzyme pepsin, các thí nghiệm được thiết kế theo Box-Behnken với các yếu tố ảnh hưởng là nhiệt độ thủy phân (X_1 : 35-45 °C), pH (X_2 : 1,5-2,5), nồng độ pepsin (X_3 : 25-35 UI/g) và thời gian thủy phân (X_4 : 3-5 giờ) với hai hàm mục tiêu là độ thủy phân (DH) Y_1 (%) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR) Y_2 (%) là cao nhất. Kết quả điều kiện tối ưu để thủy phân collagen từ da cá ngừ như sau: $X_1 = 39,5$ °C (nhiệt độ thủy phân), $X_2 = 2$ (pH), $X_3 = 32$ NFU/g (nồng độ pepsin) và $X_4 = 4,5$ giờ (thời gian thủy phân). DH và NR ở điều kiện tối ưu lần lượt là 13,65% và 64,43%. Dịch thủy phân collagen từ da cá ngừ vây vàng thu được với 6 phân đoạn, trong đó 10% peptide có phân tử khối nhỏ hơn 17,24 kDa, 20% (17,24 kDa đến 34,93 kDa), 20% (34,93 kDa đến 58,40 kDa), 20% (58,40 kDa đến 96,25 kDa), 20% (96,25 kDa đến 162,55 kDa) và 10% còn lại là các peptide có khối lượng phân tử từ 162,55 kDa đến 500 kDa.

Từ khóa: Collagen, hiệu suất thu hồi nitrogen, độ thủy phân, da cá ngừ vây vàng, thủy phân bằng enzyme.

1. GIỚI THIỆU

Theo Ban Thư ký Cộng đồng Thái Bình Dương (2014), phụ phẩm từ quy trình chế biến cá ngừ phi lê là 50% so với nguyên liệu, bao gồm 18% đầu cá, 14% da và thịt còn sót lại, 8% xương, 2% vây và 8% mang và nội tạng. Tổng số lượng cá ngừ trên thế giới là khoảng 4 triệu tấn. Trong đó 65% được khai thác ở Thái Bình Dương, 21% ở Ấn Độ Dương và 14% ở Đại Tây Dương. Trong đó cá ngừ vây vàng khoảng 30%, cá ngừ mắt to 10% và cá ngừ vây dài 5% [1]. Collagen cấu thành 27,1% da cá ngừ vây vàng ở Hàn Quốc [2]. Các số liệu trên cho thấy da cá ngừ vây vàng, sản phẩm phụ từ chế biến cá ngừ phi lê, là một nguồn collagen quan trọng, có khả năng thay thế nguồn collagen từ động vật trên cạn.

Collagen được tách chiết bằng enzyme pepsin (PSC) từ da cá được sử dụng cho các sản phẩm thực phẩm cần tăng khả năng tạo gel, kết dính, ổn định, tạo màng, thay thế chất béo hoặc tạo bọt như kẹo dẻo, marshmallow [3]. Collagen thủy phân kết hợp với chitosan để tạo màng giúp khắc phục các lỗ rỗng trên màng.

Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) được sử dụng để thực hiện tối ưu hóa quá trình thủy phân. RSM được áp dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm để đánh giá mối quan hệ giữa các giá trị dự đoán của các biến độc lập và biến phụ thuộc [4]. Ưu điểm chính của

RSM là giảm số lượng các thí nghiệm, ít tốn thời gian để xác định giá trị của biến độc lập và sự tương tác của nó so với các phương pháp truyền thống.

Nghiên cứu này đã xác định điều kiện tối ưu độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitrogen. Vì collagen có bản chất là protein nên hiệu suất thu hồi nitrogen cao cũng chính là hiệu suất thu hồi collagen cao. Ngoài ra, nghiên cứu cũng xác định được sự phân bố các phân đoạn peptide trong dung dịch collagen thủy phân làm tiền đề cho việc tinh sạch và tách riêng các phân đoạn này cũng như nghiên cứu các hoạt tính sinh học và tính năng công nghệ của các phân đoạn.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*) được cung cấp bởi Công ty TNHH J.K.Fish (tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam). Da cá ngừ vây vàng được đông lạnh ở $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ sau đó được bảo quản trong thùng cách nhiệt và chuyển đến phòng thí nghiệm. Enzyme pepsin (RM712) có hoạt tính 10.000 NFU/g được mua từ HIMEDIA, Ấn Độ. Axit clorua, 1 – fluoro– 2,4 – dinitrobenzene (DNFB), axit boric (H_3BO_3) được mua từ Merck (Darmstadt, Đức). Tất cả các thuốc thử được sử dụng trong nghiên cứu này đều là loại tinh khiết phân tích.

2.2. Tiền xử lý da cá ngừ vây vàng

Da cá ngừ vây vàng được rửa đông bằng nhiệt độ nước $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, loại bỏ phần vảy, phần thịt bám bên ngoài và rửa sạch bằng nước lạnh $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Da cá đã làm sạch được cắt thành các miếng nhỏ ($1 \times 1\text{ cm}$). Để loại bỏ protein phi collagen và lipid, các mẫu được ngâm với dung dịch kiềm (NaOH 0,93N) với tỷ lệ 5:1 (v/w) trong 28 giờ ở $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Da cá ngừ sau khi tiền xử lý có độ ẩm $77,69 \pm 0,02\%$, hàm lượng protein, collagen, lipid và khoáng tính theo hàm lượng chất khô lần lượt là $92,54 \pm 0,03\%$; $85,58 \pm 0,06\%$; $5,50 \pm 0,02\%$ và $1,60 \pm 0,07\%$ [5]. Sau khi các mẫu đã xử lý bằng NaOH được rửa bằng nước cất cho đến khi đạt được độ pH trung tính, để ráo trong 5 phút và được nghiền bằng máy nghiền trục vít có đường kính lỗ sàng 0,5 cm. Mẫu sau khi đã nghiền sử dụng để tách chiết collagen.

2.3. Thủy phân da cá ngừ vây vàng bằng enzyme pepsin

Hỗn hợp để thủy phân bao gồm: Mẫu da cá ngừ đã tiền xử lý (5 g), enzym pepsin (25-35 NFU/g), tỷ lệ da cá tiền xử lý/nước là 1:1 (v/w). Các điều kiện thủy phân được khảo sát là pH (1,5–2,5), nhiệt độ ($35\text{--}45\text{ }^{\circ}\text{C}$), và thời gian (3–5 giờ). Hỗn hợp sau khi thủy phân được nâng nhiệt lên $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút để ức chế hoạt tính của enzyme. Sau đó ly tâm (Hermle, Đức) thu dịch ở $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ với 5.000 vòng/phút (3070 rcf) trong 20 phút, phần tạp chất và các enzym biến tính là phần rắn phía dưới ống. Phần nổi được bảo quản ở $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ để xác định độ thủy phân, hiệu suất thu hồi nitrogen và phân bố khối lượng phân tử peptide trong dịch thủy phân.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Thiết kế thí nghiệm

Tối ưu hóa điều kiện thủy phân collagen da cá ngừ vây vàng theo phương pháp quy hoạch nghiệm bậc 2 (Box-Behnken) với 4 yếu tố: nhiệt độ thủy phân (X_1 : $35\text{--}45\text{ }^{\circ}\text{C}$), pH (X_2 : 1,5–2,5), nồng độ pepsin (X_3 : 25–35 NFU/g) và thời gian thủy phân (X_4 : 3–5 giờ) đến độ thủy phân (DH %) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR%). Các biến được mã hóa ở ba mức (-1, 0, +1), tất cả 27 thí nghiệm bao gồm 3 lần lặp lại ở trung tâm. Phạm vi và mức độ của các biến được bố trí

trong Bảng 1. Bằng cách sử dụng phần mềm JMP 10 để phân tích thiết kế bề mặt (RSM) của dữ liệu. Các hàm mục tiêu gồm phân trăm độ thủy phân DH ($Y_1, \%$) và hiệu suất thu hồi nitrogen NR ($Y_2, \%$). Các phương trình mô hình cơ bản được hiển thị trong công thức sau:

$$Y_1 = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

$$Y_2 = \alpha_0 + \sum_{i=1}^4 \alpha_i X_i + \sum_{i=1}^4 \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \alpha_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

Trong đó: Y_1 và Y_2 là hàm mục tiêu; β_0, α_0 là hằng số; $\beta_i, \beta_{ij}, \alpha_i, \alpha_{ij}$ là hệ số của phương trình hồi quy; X_i, X_j là biến độc lập.

Bảng 1. Phạm vi thiết kế thí nghiệm của các biến độc lập đối với thủy phân collagen từ da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*)

Biến độc lập	Ký hiệu	Phạm vi		
		-1	0	+1
Nhiệt độ thủy phân (°C)	X_1	35	40	45
pH	X_2	1,5	2	2,5
Nồng độ pepsin (NF U/g)	X_3	25	30	35
Thời gian thủy phân (h)	X_4	3	4	5

2.4.2. Phương pháp phân tích

2.4.2.1. Hàm lượng nitrogen và hiệu suất thu hồi

Hàm lượng nitơ tổng (nitrogen) được xác định bằng phương pháp Kjeldahl, sử dụng thiết bị phân tích Kjeldtec 2200 (Foss, Đan Mạch). Hiệu suất thu hồi nitrogen (NR) được tính theo phương trình (3) dưới đây:

$$NR(\%) = \frac{N_1}{N_2} \times 100 \quad (3)$$

Trong đó: NR là hiệu suất thu hồi nitrogen (%); N_1 là nitrogen chứa trong mẫu da cá đã tiền xử lý (g); N_2 là nitrogen chứa trong dịch thủy phân đã loại bỏ phần không tan (g).

2.4.2.2. Độ thủy phân

Độ thủy phân (DH, %) của collagen được xác định phần trăm các liên kết peptide bị cắt so với tổng liên kết peptide trong collagen. DH được tính dựa vào nhóm amin tự do trong dung dịch sau khi thủy phân (mol/L) theo phương pháp của Goodwin [6] với đường chuẩn glycine.

Collagen thủy phân được ly tâm ở 4 °C với tốc độ 10000 vòng/phút trong 20 phút và tách lấy phần dịch trong pha loãng 100 lần bằng nước cất. 01 mL mẫu đã pha loãng được trộn với 1 mL dung dịch tetraborate 2% trong nước, 0,25 mL dung dịch 1 - fluoro - 2,4 - dinitrobenzene (DNFB) (DNFB/ethanol (v/v) là 0,013/1) (các ống nghiệm được bọc bằng giấy bạc trước khi cho hóa chất vào). Sau đó các ống nghiệm được giữ ở 60 °C trong 10 phút và làm lạnh ở nhiệt độ phòng. Sau khi làm lạnh, mỗi ống nghiệm được thêm vào 2 mL axit chlohydric đậm đặc, lắc đều, để yên trong 10 phút, dung dịch có màu da cam và đo độ hấp thụ màu ở bước sóng 410 nm. Mẫu trắng được chuẩn bị như mẫu thử nhưng thay dung dịch mẫu bằng nước cất.

Đường chuẩn glycine (nồng độ trong phạm vi 0 - 0,001 mM) được xây dựng tương tự như mẫu chỉ thay mẫu collagen thủy phân bằng glycine. Số lượng nhóm amin tự do trong dịch thủy phân (A, mol/L) được tính toán theo phương trình đường chuẩn (1).

$$\text{Phương trình đường chuẩn glycine: } y = 1422,6x - 0,0176 \quad (R^2 = 0,9992) \quad (1)$$

Trong đó: y độ hấp thụ của dung dịch glycine ở 410 nm, x nồng độ glycine (mM).

$$\text{Độ thủy phân (DH, \%)} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 = \frac{A \times d}{P \times 11,1} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó:

h: số liên kết peptide bị bẻ gãy; h_{tot} : tổng số liên kết peptide; A: số nhóm amin tự do trong dịch thủy phân (mol/L); d: hệ số pha loãng (100); 11,1: Số liên kết peptide trong 1 gam collagen; P: Protein trong collagen thủy phân (g/mL).

2.4.2.3. Khối lượng phân tử của các peptide collagen trong dịch thủy phân

Sự phân bố khối lượng phân tử (MW) của các peptide collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng được đo bằng sắc ký lọc gel (GPC) bằng hệ thống HPLC (Agilent 1200, Hoa Kỳ), cột Ultrahydrogen 250 x 7,8 x 300 mm (cột Ultrahydrogen 250 x 7,8 x 300 mm (cột nước) và cảm biến RID. Mẫu được pha loãng trong pha động (axit trifluoroacetic 0,1% trong nước), sau đó ổn định trong 30 phút trước khi tiêm vào hệ thống sắc ký. HPLC được chạy ở tốc độ dòng 1 mL/phút ở 40 °C. Polyethylen glycol được sử dụng làm tiêu chuẩn [7].

2.4.3. Phương pháp phân tích dữ liệu

Phần mềm JMP10 được dùng để bố trí thí nghiệm và phân tích dữ liệu. Ngoài ra, phần mềm Microsoft Excel 2010 và SPSS 18 đã được sử dụng để xử lý số liệu thống kê khi nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố đơn lẻ ($p < 0,05$).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kiểm tra chẩn đoán mô hình

Tất cả đều là 27 thí nghiệm, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và các hàm mục tiêu Y_1 (%) và Y_2 (%) được trình bày trong Bảng 2. Y_1 và Y_2 được thể hiện mối quan hệ bậc nhất, bậc hai và tương tác của các biến độc lập bằng cách sử dụng phân tích phương sai (ANOVA). Thông qua phân tích phương sai (ANOVA), mô hình hồi quy đa thức bậc hai được lựa chọn với các biến bậc một (X_1, X_2, X_3, X_4), các biến bậc hai và tương tác ($X_1^2, X_2^2, X_3^2, X_4^2, X_1X_2, X_1X_3, X_1X_4, X_2X_3, X_2X_4, X_3X_4$) được đánh giá ở mức ($p < 0,05$). Cả hai biến phụ thuộc Y_1 và Y_2 đều có các hệ số tương quan cao ($R^2 \geq 0,97$) với giá trị p tương ứng là 0,0001 và 0,0001. Sự thiếu phù hợp của cả hai mô hình có giá trị p lần lượt là 0,2940 và 0,3595, không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Do đó, cả hai mô hình thực nghiệm cho kết quả hàm mục tiêu Y_1 và Y_2 có độ tin cậy cao.

Bảng 2. Ma trận thực nghiệm và kết quả thủy phân da cá ngừ vây vàng

STT	Biến mã hóa				Biến thực				Hàm mục tiêu	
	x_1	x_2	x_3	x_4	X_1	X_2	X_3	X_4	Y_1	Y_2
1	-1	+	0	0	35	2,5	30	4	9,34	40,15
2	0	0	+1	+1	40	2,0	35	5	13,45	64,32
3	-1	-1	0	0	35	1,5	30	4	8,14	36,75
4	+1	-1	0	0	45	1,5	30	4	6,28	32,18
5	0	-1	0	-1	40	1,5	30	3	10,25	45,28
6	0	+1	0	-1	40	2,5	30	3	12,05	56,49
7	0	0	0	0	40	2,0	30	4	13,47	64,31
8	0	+1	0	+1	40	2,5	30	5	12,03	52,35
9	0	-1	-1	0	40	1,5	25	4	10,25	45,20
10	0	0	0	0	40	2,0	30	4	13,48	64,30
11	+1	0	+1	0	45	2,0	35	4	7,53	44,68
12	+1	0	0	-1	45	2,0	30	3	7,02	35,25
13	0	0	0	0	40	2,0	30	4	13,15	61,09
14	-1	0	-1	0	35	2,0	25	4	8,66	37,87
15	+1	0	0	+1	45	2,0	30	5	7,54	34,72
16	0	-1	+1	0	40	1,5	35	4	11,47	51,89
17	+1	0	-1	0	45	2,0	25	4	7,54	32,74
18	0	0	-1	-1	40	2,0	25	3	12,63	58,43
19	0	-1	0	+1	40	1,5	30	5	11,87	54,15
20	0	0	-1	+1	40	2,0	25	5	12,05	56,42
21	+1	+1	0	0	45	2,5	30	4	7,48	33,97
22	-1	0	0	-1	35	2,0	30	3	9,48	40,41
23	0	+1	+1	0	40	2,5	35	4	11,97	55,24
24	0	+1	-1	0	40	2,5	25	4	11,47	51,85
25	-1	0	+1	0	35	2,0	35	4	9,57	40,57
26	0	0	+1	-1	40	2,0	35	3	11,58	52,25
27	-1	0	0	+1	35	2,0	30	5	10,56	46,71

X_1 : Nhiệt độ thủy phân ($^{\circ}\text{C}$); X_2 : pH; X_3 : Nồng độ pepsin (NFU/g); X_4 : Thời gian thủy phân (h); Y_1 : DH (%), Y_2 : NR (%).

Dựa vào giá trị của p trong Bảng 3, để xác định hệ số của phương trình hồi quy Y_1 và Y_2 , chỉ chấp nhận hệ số của các biến độc lập khi giá trị p của biến đó nhỏ hơn 0,05 ($p < 0,05$).

Bảng 3. Hệ số của phương trình đa thức bậc hai của hàm mục tiêu Y_1 (%), Y_2 (%) dựa trên p

Tham số	Hệ số tham số		Độ lệch chuẩn		p	
	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2
Hằng số	13,367	63,233	0,1875	1,4984	<0,0001	<0,0001
$X_1(35,45)$	-1,030	-2,410	0,0938	0,7492	<0,0001	0,0074
$X_2(1.5,2.5)$	0,507	2,050	0,0938	0,7492	0,0002	0,0181
$X_3(25,35)$	0,248	2,203	0,0938	0,7492	0,0216	0,0124
$X_4(3,5)$	0,374	1,713	0,0938	0,7492	0,0018	0,0412
$X_1 * X_2$	0,000	-0,403	0,1624	1,2977	1,0000	0,7618
$X_1 * X_3$	-0,230	2,310	0,1624	1,2977	0,1821	0,1004
$X_2 * X_3$	-0,180	-0,825	0,1624	1,2977	0,2894	0,5369
$X_1 * X_4$	-0,140	-1,708	0,1624	1,2977	0,4055	0,2128
$X_2 * X_4$	-0,410	-3,253	0,1624	1,2977	0,0267	0,0276
$X_3 * X_4$	0,613	3,520	0,1624	1,2977	0,0027	0,0189
$X_1 * X_1$	-4,230	-20,445	0,1406	1,1238	<0,0001	<0,0001
$X_2 * X_2$	-1,367	-8,007	0,1406	1,1238	<0,0001	<0,0001
$X_3 * X_3$	-0,671	-3,512	0,1406	1,1238	0,0005	0,0088
$X_4 * X_4$	-0,378	-2,847	0,1406	1,1238	0,0197	0,0263

X_1 : Nhiệt độ thủy phân ($^{\circ}C$); X_2 : pH; X_3 : Nồng độ pepsin (NFU/g); X_4 : Thời gian thủy phân (h)

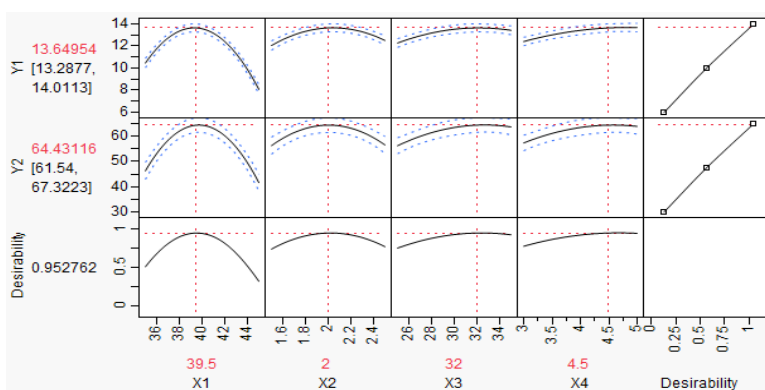
Từ Bảng 3 phương trình hồi quy của hàm mục tiêu Y_1 và Y_2 được thiết lập như sau:

$$Y_1 = 13,667 - 1,030X_1 + 0,507X_2 + 0,248X_3 + 0,374X_4 - 0,410X_2X_4 + 0,613X_3X_4 - 4,300X_1^2 - 1,367X_2^2 - 0,671X_3^2 - 0,378X_4^2$$

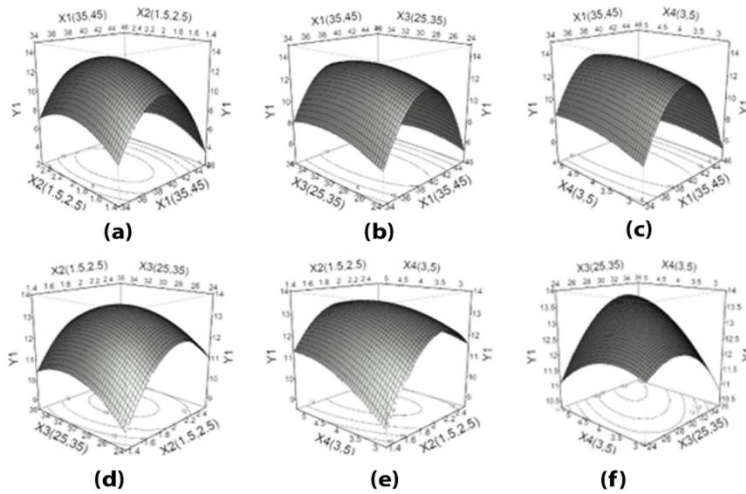
$$Y_2 = 63,233 - 2,410X_1 + 2,050X_2 + 2,203X_3 + 1,713X_4 - 3,253X_2X_4 + 3,520X_3X_4 - 20,445X_1^2 - 8,007X_2^2 - 3,512X_3^2 - 2,847X_4^2$$

3.2. Điều kiện tối ưu của hàm mục tiêu

Điều kiện tối ưu quá trình thủy phân da cá ngừ vây vàng bằng enzyme pepsin, như sau: Nhiệt độ thủy phân $X_1 = 39,5^{\circ}C$, pH $X_2 = 2$, nồng độ pepsin $X_3 = 32$ NFU/g, thời gian thủy phân $X_4 = 4,5$ giờ với hàm mục tiêu Y_1 , Y_2 lần lượt là 13,65% và 64,43% (Hình 2). Bề mặt đáp ứng ba chiều thể hiện sự kết hợp khác nhau giữa các yếu tố trên DH và NR được thể hiện ở Hình 3.



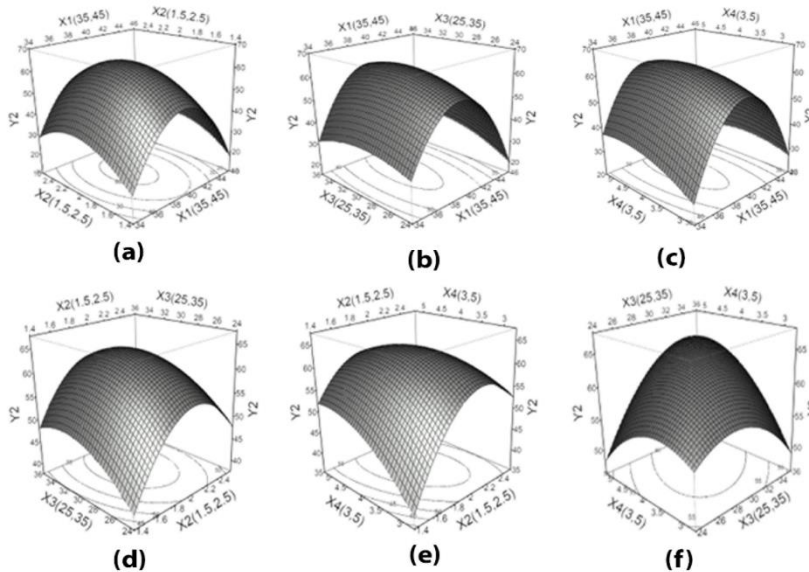
Hình 2. Dự đoán độ thủy phân (Y_1) và hiệu suất thu hồi nitrogen (Y_2) với yếu tố tác động



Hình 3. Bề mặt đáp ứng 3D và đường đồng mức 2D của (Y1) dưới ảnh hưởng của yếu tố tác động

Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ trong phạm vi nghiên cứu này là rất lớn đến DH và NR (Hình 3 và Hình 4). Điều này thể hiện pH và nhiệt độ quá cao ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme [8]. Điều kiện tối ưu thu được từ kết quả của RSM được thể hiện trong Hình 2, với nhiệt độ thủy phân 39,5 °C (X_1) và pH 2 (X_2).

Hình dạng của đường cong thủy phân có liên quan đến sự bất hoạt của enzyme, sự ức chế sản phẩm bởi các sản phẩm thủy phân được hình thành ở mức độ thủy phân cao, các peptide hòa tan hoạt động như đối thủ cạnh tranh cơ chất hiệu quả với protein chưa bị thủy phân và có thể tự động tiêu hóa enzyme [9].



Hình 4. Bề mặt đáp ứng 3D và họ đường đồng mức 2D của (Y2) với ảnh hưởng của các biến độc lập

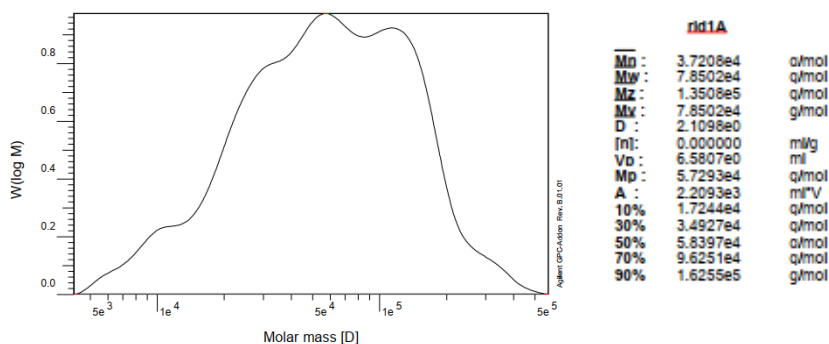
Kết quả dự đoán hàm mục tiêu ($Y_1, \%$) và ($Y_2, \%$) là 13,65% và 64,43 %, tương ứng từ các phép tính sử dụng phương trình mô hình suy ra từ các điều kiện tối ưu ở trên (Bảng 4). Kiểm chứng điều kiện tối ưu, thí nghiệm được thực hiện ở điều kiện tối ưu lặp lại 3 lần với cho kết quả ($Y_1, \%$) và ($Y_2, \%$) lần lượt là 13,63% và 64,41%. Vậy các giá trị thực nghiệm không có sự khác biệt với giá trị dự đoán của mô hình ($p > 0,05$).

Bảng 4. Thông số ở điều kiện tối ưu dự đoán và thực nghiệm thủy phân da cá ngừ vây vàng bằng enzyme pepsin

Hàm mục tiêu	Đơn vị	Yếu tố tác động	Giá trị của yếu tố tác động	Dự đoán từ mô hình	Thực nghiệm
Y ₁	%	X ₁ X ₂	39,5°C 2	13,65	13,63 ± 0,05
Y ₂	%	X ₃ X ₄	32NF U/g 4,5 h	64,43	64,41 ± 0,03

3.3. Khối lượng phân tử của các peptide trong dung dịch thủy phân

Sự phân bố trọng lượng phân tử của các peptide trong dịch thủy phân từ da cá ngừ vây vàng thu được từ dưới 500 kDa (Hình 5). Sản phẩm thủy phân gồm 6 đoạn, trong đó 10% peptide có phân tử khối nhỏ hơn 17,24 kDa, 20% (17,24 kDa đến 34,93 kDa), 20% (34,93 kDa đến 58,40 kDa), 20% (58,40 kDa đến 96,25 kDa), 20% (96,25 kDa đến 162,55 kDa) và 10% còn lại là các peptide có khối lượng phân tử từ (162,55 kDa đến 500 kDa). Khi thủy phân da cá bằng enzyme pepsin đều cho các peptide có khối lượng phân tử lớn chủ yếu dừng lại ở mức gelatin [8], [10]. Dữ liệu này quan trọng trong việc tách riêng các phân đoạn peptide phục vụ nghiên cứu hoạt tính sinh học và tính năng công nghệ của mỗi phân đoạn peptide cũng như định hướng ứng dụng của các phân đoạn này.



Hình 5. Khối lượng phân tử của peptide trong dịch thủy phân từ da cá ngừ vây vàng bằng enzyme pepsin

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được điều kiện tối ưu để thủy phân collagen từ da cá ngừ vây vàng sau khi đã loại bỏ tạp chất bằng enzyme pepsin với các thông số như: nồng độ enzyme là 32 NFU/g, nhiệt độ thủy phân 39,5 °C, pH 2 và thời gian thủy phân 4,5 giờ với độ thủy phân 13,65% và hiệu suất thu hồi nitrogen là 64,43%.

Sản phẩm thủy phân với 6 phân đoạn peptide collagen đã được xác định về tỷ lệ phần trăm và phạm vi khối lượng. Dữ liệu này quan trọng để tách chiết và tinh sạch các phân đoạn peptide collagen cũng như ứng dụng của từng phân đoạn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Joseph J.- Managing fishing capacity of the world tuna fleet, FAO Fisheries Circular No. **982**, FAO, Rome (2003) 67p.
2. Woo J.W., Yu S.J., Cho S.M., Lee Y.B., & Kim S.B. - Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin, Food Hydrocolloids **22** (5) (2008) 879-887.

3. Baziwane D. & He Q.- Gelatin: The paramount food additive, *Food Reviews International* **19** (4) (2003) 423-435.
4. Box G.E.P., & Wilson K.B.- On the experimental attainment of optimum conditions, *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* **13** (1) (1951) 1-38.
5. Binh N. C., Hong N. M. X., Kha N. H. N., & Tuyen K. C.- Optimization of treatment conditions for non-collagen removal from yellowfin tuna skin (*Thunnus albacares*), *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences* **19** (3) (2020) 548-562.
6. Goodwin J.F. - The colorimetric estimation of plasma amino nitrogen with DNFB, *Clinical Chemistry* **14** (11) (1968) 1080-1090.
7. Spellman D., O'Cuinn G., & FitzGerald R.J. - Bitterness in Bacillus proteinase hydrolysates of whey proteins, *Food Chemistry* **114** (2) (2009) 440-446.
8. Hema G.S., Joshy C.G., Shyni K., Chatterjee N.S., Ninan G., & Mathew S. - Optimization of process parameters for the production of collagen peptides from fish skin (*Epinephelus malabaricus*) using response surface methodology and its characterization, *Journal of Food Science and Technology* **54** (2) (2017) 488-496.
9. Rebeca B. D., Peña-Vera M. T., & Díaz-Castañeda M. - Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value, *Journal of Food Science* **56** (2) (1991) 309-314.
10. Di Y.U., Chang-feng C.H.I., Bin W., Guo-fang D. & Zhong-rui L.I.- Characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), *Chinese Journal of Natural Medicines* **12** (9) (2014) 712-720.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF CONDITIONS HYDROLYSIS COLLAGEN FROM YELLOWFIN TUNA SKIN (*Thunnus albacares*) BY BOX-BEHNKEN MODEL

Nguyen Cong Binh*, Dinh Huu Dong, Tran Thi Phuong Kieu,
Dao Thi Tuyet Mai, Tran Quoc Dam
Ho Chi Minh City University of Food Industry
*Email: binhnc@hufi.edu.vn

Hydrolyzed collagen from tuna skin is widely used in cosmetics, pharmaceuticals and food industries. To optimize the conditions for collagen extraction from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin by pepsin enzyme, experiments were designed according to Box-Behnken with the influencing factors being hydrolysis temperature (X_1 : 35 - 45°C), pH (X_2 : 1.5 - 2.5), pepsin concentration (X_3 : 25 - 35 UI/g), Hydrolysis time (X_4 : 3 - 5 hours) for a maximum degree of hydrolysis (DH: Y1 %) and nitrogen recovery efficiency (NR Y2 %). There are 27 experiments in which there were three experiments in the center and each experiment was repeated three times. According to the results, optimum hydrolysis conditions were as follows: $X_1 = 39.5^\circ\text{C}$ (Hydrolysis temperature), $X_2 = 2$ (pH), $X_3 = 32$ UI/g (pepsin concentration), $X_4 = 4.5$ hours (Hydrolysis time). The predicted DH and NR under optimal conditions were 13.65% and 64.43%, respectively. Hydrolyzed solution from yellowfin tuna skin was obtained with six fractions, of which 10% peptides have a molecular mass less than 17.24 kDa, 20% (17.24 kDa to 34.93 kDa), 20% (34.93 kDa to 58.40 kDa), 20% (58.40 kDa to 96.25 kDa), 20% (96.25 kDa to 162.55 kDa) and remaining 10% are molecular mass peptides from (162.55 kDa to 500 kDa).

Keywords: Collagen, nitrogen recovery efficiency, degree of hydrolysis, yellowfin tuna skin, enzymatic hydrolysis.