BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN CÔNG BỈNH

TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH COLLAGEN THỦY PHÂN TỪ DA CÁ NGỪ VÂY VÀNG (*THUNNUS ALBACARES*) VÀ ỨNG DỤNG TRONG THỰC PHẨM

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm
Mã số: 9.54.01.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH



NGUYỄN CÔNG BỈNH

TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH COLLAGEN THỦY PHÂN TỪ DA CÁ NGỪ VÂY VÀNG (*THUNNUS ALBACARES*) VÀ ỨNG DỤNG TRONG THỰC PHẨM

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm

Mã số: 9.54.01.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM

Cán bộ hướng dẫn: TS. NGUYỄN MINH XUÂN HỒNG

TS. NGUYỄN HOÀNG NAM KHA

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan mọi kết quả của đề tài: ***"Tách chiết và tinh sạch collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng (Thunnus albacares) và ứng dụng trong thực phẩm"*** là công trình nghiên cứu của cá nhân tôi. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực, không sao chép từ bất kỳ một nguồn nào và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác cho tới thời điểm này.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 05 tháng 03 năm 2022

Tác giả luận văn

Nguyễn Công Bỉnh

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện đề tài "**Tách chiết và tinh sạch collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*) và ứng dụng trong thực phẩm**", tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, tạo điều kiện của tập thể lãnh đạo, các nhà khoa học, cán bộ, giảng viên, chuyên viên Khoa Công nghệ Hóa học và Thực phẩm – Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM; tập thể Ban Ban Giám hiệu, Ban chủ nhiệm khoa thủy sản - Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM; tập thể Ban Giám hiệu, Phòng Sau Đại học, cán bộ các phòng, ban chức năng Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM. Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành về sự giúp đỡ đó.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Minh Xuân Hồng và TS. Nguyễn Hoàng Nam Kha đã trực tiếp hướng dẫn và chỉ bảo cho tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn cán bộ Trung tâm thí nghiệm thực hành Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM đã giúp đỡ tôi trong quá trình triển khai và thực hiện luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp của tôi đang công tác tại Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM và gia đình đã động viên, khích lệ, tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thành luận án này.

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Công Bỉnh

TÓM TẮT

Tên luận án: Tách chiết và tinh sạch collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*) và ứng dụng trong thực phẩm

Tác giả: NCS Nguyễn Công Bỉnh

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm. Mã số: 9.54.01.01

Trong những năm gần đây, da cá – một phụ phẩm của ngành công nghiệp chế biến cá phi lê – đã trở thành một nguồn nguyên liệu đầy tiềm năng để sản xuất collagen, đặc biệt là collagen thủy phân nhằm ứng dụng trong thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm nhờ có nhiều hoạt tính chức năng. Do đó, đề tài này nghiên cứu quy trình tách chiết và tinh sạch collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*) nhằm ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm. Quy trình bắt đầu từ công đoạn làm giàu collagen trong da cá, sau đó thủy phân collagen bằng enzyme và cuối cùng là tinh sạch và phân đoạn collagen thủy phân.

Việc làm giàu collagen trong da cá được thực hiện thông qua quá trình loại bỏ các thành phần không phải collagen, chủ yếu là lipid, chất màu và các protein khác. Trong nghiên cứu này, các điều kiện xử lý kiềm để loại bỏ phi collagen được tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Kết quả nghiên cứu đã xác định nồng độ dung dịch NaOH, tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá và thời gian xử lý lần lượt là 0,93 N; 5/1 (v/w) và 28 giờ. Trong điều kiện đó thì tỷ lệ collagen tăng từ 69,68% lên 85,58%, chất béo giảm từ 11,07% xuống còn 5,6% (theo cơ sở khô), và phần lớn chất màu trên da cá đã bị loại bỏ. Tỷ lệ hydroxyproline/protein trong collagen thu được cao nhất là 9,86%. Hệ số chuyển đổi giữa hydroxyproline và collagen của cá ngừ vây vàng (k) là 9,3.

Ba loại enzyme khác nhau (pepsin, flavourzyme và alcalase) đã được nghiên cứu để khảo sát khả năng thủy phân collagen của da cá ngừ vây vàng. Kết quả cho thấy enzyme alcalase có khả năng thủy phân collagen tốt nhất với độ thủy phân là 23,92% và hiệu suất thu hồi nitơ là 92,56%. Tiếp theo, phương pháp bề mặt đáp ứng cũng được sử dụng để tối ưu hóa các điều kiện thủy phân của enzyme alcalase với hàm mục tiêu là độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitơ. Kết quả cho thấy quá trình

thủy phân tối ưu ở 54,7 °C và pH 8 với nồng độ alcalase 0,034 AU/g trong 5,2 giờ. Độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitơ trong điều kiện tối ưu lần lượt là 24,51% và 96,35%. Dịch collagen sau khi thủy phân được đem đi phân đoạn bằng sắc ký lọc gel và khảo sát các hoạt tính chức năng của các phân đoạn này. Qua đó, đề tài đã tách được 3 phân đoạn collagen thủy phân F1, F2 và F3 với khối lượng phân tử lần lượt là < 416 Da, 416 Da – 1 kDa và 1 kDa – 5 kDa. Khả năng hòa tan của 3 phân đoạn F1, F2 và F3 đều lớn hơn 97%. Khả năng tạo bọt và tạo nhũ và chống đông của phân đoạn F3 là lớn nhất nhưng khả năng chống oxy hóa thì thấp hơn F1 và F2.

Để tinh sạch và phân đoạn collagen thủy phân với khối lượng lớn nhằm ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, màng siêu lọc UFP-1-C-6 (NMWC=1 kDa) đã được nghiên cứu thử nghiệm. Kết quả nghiên cứu cho thấy điều kiện lọc màng tốt nhất ở nhiệt độ 25 °C, pH 6,5 và áp suất 12 psi với thông lượng qua màng lớn nhất (3,4 l/m^2.h), hiệu suất thu hồi nitơ (80,81%), và độ phân riêng (27,45%). Sản phẩm sau khi siêu lọc được tách thành hai phân đoạn SP1 (<3 kDa) và SP2 (3-5 kDa) với tỉ lệ lần lượt là 10 % và 90 %. Cả hai phân đoạn collagen thủy phân đều có khả năng hòa tan tốt ở pH < 8,0, trong đó phân đoạn SP1 hòa tan tốt hơn SP2. Khi pH cao hơn 8,0, cả hai phân đoạn gần như hòa tan hoàn toàn. Ngoài ra, khả năng nhũ hóa, tạo bọt và chống đông của phân đoạn SP2 tốt hơn SP1. Tuy nhiên, phân đoạn SP1 có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn.

Hai phân đoạn SP1 và SP2 đã được ứng dụng thử nghiệm vào sản xuất thực phẩm. SP1 đã được bổ sung vào sản phẩm nước uống chanh dây và SP2 được bổ sung vào sản phẩm sữa chua với tỷ lệ lần lượt là 0,1% và 0,05% với chất lượng cảm quan được đánh giá là tốt. Như vậy, các phân đoạn peptide từ collagen thủy phân vừa có hoạt tính chức năng cao, vừa đáp ứng được nhu cầu thị hiếu của người tiêu dùng, chứng tỏ được tiềm năng ứng dụng trong ngành công nghệ thực phẩm.

Từ khóa: *collagen thủy phân, da cá, Thunnus albacares, tách chiết, thủy phân, phân đoạn*

ABSTRACT

PhD. Thesis: Extraction and purification of collagen hydrolysate from yellowfin tuna skin (*Thunnus albacares*) and applications in food

Author: Binh Cong Nguyen

Major: Food Technology CODE: 9.54.01.01

Fish skin, a by-products of fish fillet processing industry, has recently become a potential source for the production of collagen, especially hydrolysed collagen to apply in food, cosmetics and pharmaceuticals due to its extraordinary functional activities. Therefore, this thesis investigated the extraction and purification of hydrolyzed collagen from yellowfin tuna skin (*Thunnus albacares*) to apply in food industry. The process started from the collagen enrichment in fish skin, then collagen hydrolysis with enzymes and finally purification and fractionation of collagen hydrolysates.

The collagen enrichment in fish skin was performed through the removal of non-collagen components such as lipid, pigment, and other proteins. In this study, the alkaline treatment conditions for non-collagen removal were optimized by the response surface method. The results showed that the optimum sodium hydroxide concentration, ratio of solution to fish skin and treatment time were 0.93 N, 5/1 (v/w) and 28 hours, respectively. Under such conditions, the percentage of collagen increased from 69.68% to 85.58%, fat decreased from 11.07% to 5.6% (dry basis) and most of the colorants were removed. The ratio of hydroxyproline/protein in the obtained collagen was 9.86%. The conversion factor between hydroxyproline and collagen of yellowfin tuna (k) was 9.3.

Three different enzymes (pepsin, flavourzyme, and alcalase) have been investigated their hydrolysis ability of collagen from yellowfin tuna skin. The results showed that the alcalase enzyme had the highest hydrolysis ability with 23.92% degree of hydrolysis (DH) and 92.56% nitrogen recovery efficiency (NR). Next, the response surface method was also used to optimize the hydrolysis conditions of alcalase enzyme. The results showed that the optimum hydrolysis parameters were at

54.7 °C and pH 8 with 0.034 AU/g alcalase concentration for 5.2 h. The predicted DH and NR under optimal conditions were validated and confirmed as 24.51% and 96.35%, respectively. Hydrolyzed collagen solution was fractionated by gel filtration chromatography and examinated the functional activities of these fractions. Thereby, the research had separated 3 fractions of hydrolyzed collagen, F1, F2, and F3, with molecular weights of < 416 Da, 416 Da – 1 kDa, and 1 kDa-5 kDa, respectively. The solubility of 3 fractions F1, F2, and F3 were all greater than 97%. The foaming and emulsifying and anticoagulant properties of the F3 fraction were the highest, but its antioxidant capacity is lower than F1 and F2.

In order to purify and fractionate of hydrolyzed collagen in large volumes for application in food industry, the UFP-1-C-6 ultrafiltration membrane (NMWC = 1k Da) has been examined. The results showed that the best membrane filtration conditions were at 25°C, pH 6.5, and pressure 12 psi to obtain the highest throughput of the membrane (3.4 $l/m^2.h$), recovery nitrogen efficiency (80.81%), and degree of separation (27.45 %). The products after ultrafiltration were separated into two fractions, SP1 (< 3 kDa), and SP2 (3-5 kDa), with the volume of 10% and 90%, respectively. Both hydrolyzed collagen fractions had excellent solubility at pH below 8.0, where the SP1 fraction dissolved better than SP2. At pH higher than 8.0, both fractions were almost completely dissolved. In addition, the emulsifying, foaming, and antifreezing abilities of the SP2 fraction was better than the SP1. However, the SP1 fraction was more resistant to oxidation with higher antioxidant activity.

The SP1 and SP2 fractions have been applied to food processing. SP1 and SP2 were added to the passion fruit drink product and the yogurt product with 0.1% and 0.05% respectively. Both products had high sensory quality. Therefore, the obtained collagen peptides not only have high functional properties, but also meet the sensory requirements, proving their potential application in food technology.

Keywords: *hydrolyzed collagen, fish skin, Thunnus albacares, extraction, purification, fractionation*

MỤC LỤC

Trang phụ bìa i
Lời cam đoan ii
Lời cảm ơn iii
Tóm tắt iv
Mục lục viii
Danh mục cá ký hiệu, các chữ viết tắt xiii
Danh mục bảng xv
Danh mục hình xvii
MỞ ĐẦU 1
Chương 1 TỔNG QUAN 4
1.1. Tình hình khai thác và chế biến cá ngừ vây vàng 4
1.1.1. Tổng quan về cá ngừ vây vàng 4
1.1.2. Tình hình khai thác cá ngừ vây vàng 5
1.1.3. Tình hình chế biến và xuất khẩu cá ngừ vây vàng 7
1.2. Tổng quan về collagen và collagen thủy phân 8
1.2.1. Tổng quan về collagen 8
1.2.2. Tổng quan về collagen thủy phân 10
1.2.3. Tính chất của collagen thủy phân 11
1.2.3.1. Khả năng hòa tan của collagen thủy phân 11
1.2.3.2. Khả năng tạo nhũ của collagen thủy phân 11
1.2.3.3. Khả năng tạo bọt của collagen thủy phân 13
1.2.3.4. Khả năng chống oxy hóa của collagen thủy phân 13
1.2.3.5. Khả năng chống đông của collagen thủy phân 14
1.2.4. Ứng dụng của collagen thủy phân 14
1.2.4.1. Ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm 14
1.2.4.2. Ứng dụng trong mỹ phẩm 15
1.2.4.3. Trong y học và dược phẩm 16
1.3. Các phương pháp tách chiết và tinh sạch collagen thủy phân 17
1.3.1. Loại bỏ các thành phần phi collagen 17

1.3.2. Phương pháp loại bỏ phi collagen 18
1.3.3. Các yếu tố ảnh hưởng khi loại bỏ phi collagen trên da cá bằng NaOH 21
1.3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH 21
1.3.3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) 21
1.3.3.3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH 22
1.3.4. Thủy phân collagen 22
1.3.5. Tinh sạch collagen và phân đoạn thủy phân 26
1.3.5.1. Phương pháp sắc ký 26
1.3.5.2. Phương pháp điện di SDS-PAGE 27
1.3.5.3. Phương pháp kết tủa 27
1.3.5.4. Phương pháp lọc 29
1.3.6. Tiêu chuẩn chất lượng của collagen thủy phân 34
Chương 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 37
2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu 37
2.1.1. Thời gian 37
2.1.2. Địa điểm 37
2.2. Nguyên liệu, thiết bị và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu 37
2.3. Phương pháp bố trí thí nghiệm 40
2.3.1. Nghiên cứu quy trình xử lý phi collagen từ da cá ngừ vây vàng 41
2.3.1.1. Xác định thành phần hóa học của da cá 41
2.3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NaOH 41
2.3.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH 42
2.3.1.4. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/nguyên liệu 42
2.3.1.5. Thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa quá trình xử lý NaOH 42
2.3.2. Nghiên cứu quy trình thủy phân collagen da cá bằng enzyme 43
2.3.2.1. Thủy phân collagen của da cá ngừ vây vàng bằng enzyme pepsin 44
2.3.2.2. Thủy phân collagen của da cá ngừ vây vàng bằng enzyme flavourzyme 45
2.3.2.3. Thủy phân collagen của da cá ngừ vây vàng bằng enzyme alcalase 45
2.3.2.4. Thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện thủy phân da cá ngừ vây vàng bằng enzyme alcalase 46
2.3.3. Tinh sạch và phân đoạn collagen thủy phân 46

2.3.3.1. Xác định thành phần hóa học và phân bố khối lượng trong dịch sau ly tâm 47
2.3.3.2. Làm sạch sơ bộ 48
2.3.3.3. Phân đoạn collagen và khảo sát các hoạt tính của các phân đoạn 48
2.3.3.4. Xác định điều kiện lọc màng 48
2.3.4. Ứng dụng collagen thủy phân vào thực phẩm 49
2.3.4.1. Ứng dụng phân đoạn (SP1) vào sản xuất nước uống chanh dây collagen 49
2.3.4.2. Ứng dụng phân đoạn (SP2) vào sản xuất sữa chua collagen 52
2.4. Phương pháp phân tích 53
2.4.1. Phân tích các chỉ tiêu hóa lý 53
2.4.2. Phân tích vi sinh 54
2.4.3. Đánh giá chất lượng cảm quan sản phẩm 54
2.4.4. Xác định các chỉ tiêu trong quá trình thủy phân 54
2.4.5. Phân tích một số chỉ tiêu trong quá trình lọc màng 54
2.4.6. Phân tích một số tính chất của collagen thủy phân 55
2.5. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu thí nghiệm 56
Chương 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 57
3.1. Kết quả nghiên cứu xử lý phi collagen từ da cá ngừ vây vàng 57
3.1.1. Thành phần hóa học của da cá ngừ vây vàng 57
3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen trong da cá ngừ vây vàng 58
3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen trong da cá ngừ vây vàng 61
3.1.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá đến quá trình loại bỏ phi collagen 62
3.1.5. Tối ưu hóa điều kiện xử lý NaOH 65
3.1.5.1. Kiểm tra tính thích ứng của mô hình 65
3.1.5.2. Phân tích bề mặt đáp ứng 67
3.2. Thủy phân collagen trong da cá ngừ vây vàng bằng enzyme 74
3.2.1. Ảnh hưởng của loại enzyme và nồng độ enzyme đến độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR) 74

3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến DH và NR 76
3.2.3. Ảnh hưởng của pH đến DH và NR 78
3.2.4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến DH và NR 79
3.2.5. Tối ưu hóa điều kiện thủy phân của enzyme alcalase 81
3.2.5.1. Kiểm tra tính thích ứng của mô hình và phân tích dữ liệu 82
3.2.5.2. Điều kiện tối ưu 86
3.3. Tinh sạch, phân đoạn và khảo sát tính chất của các phân đoạn collagen thủy phân 90
3.3.1. Thành phần hóa học của dịch thủy phân, lọc sơ bộ và sau khi ly tâm của da cá ngừ vây vàng 90
3.3.2. Kết quả khảo sát phân bố khối lượng phân tử peptide collagen trong dịch thủy phân sau khi tinh sạch 91
3.3.3. Phân đoạn collagen thủy phân bằng sắc ký lọc gel 91
3.3.4. Tính chất của các phân đoạn collagen thủy phân 93
3.3.4.1. Khả năng hòa tan 93
3.3.4.2. Khả năng tạo nhũ 95
3.3.4.3. Khả năng tạo bọt 97
3.3.4.4. Khả năng chống oxy hóa 99
3.3.4.5. Khả năng chống đông 103
3.4. Thử nghiệm sử dụng màng lọc để phân đoạn collagen thủy phân và ứng dụng trong công nghệ thực phẩm 106
3.4.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá tình lọc màng 106
3.4.2. Ảnh hưởng của áp suất đến quá trình lọc màng 108
3.4.3. Ảnh hưởng của pH đến quá trình lọc màng 109
3.4.4. Ảnh hưởng của lưu lượng dòng nhập liệu đến quá trình lọc màng 110
3.4.5. Thành phần hóa học, hiệu suất thu hồi của các loại dịch thủy phân qua các công đoạn tinh sạch 111
3.4.6. Kết quả khảo sát tính chất của collagen thủy phân 112
3.4.6.1. Khả năng hòa tan 112
3.4.6.2. Khả năng tạo nhũ của collagen thủy phân 114
3.4.6.3. Khả năng tạo bọt của collagen thủy phân 115
3.4.6.4. Hoạt tính chống oxy hóa của từng phân đoạn 117

3.4.6.5. Khả năng chống đông của từng phân đoạn 122
3.4.7. So sánh tính chất của SP1, SP2 với ba phân đoạn F1, F2, F3 124
3.4.8. Kết quả kiểm tra các chỉ tiêu vi sinh và kim loại nặng trong trong sản phẩm collagen thủy phân 126
3.4.9. Ứng dụng collagen thủy vào sản xuất thực phẩm 126
3.4.9.1. Ứng dụng phân đoạn (SP1) vào sản xuất nước uống chanh dây collagen 127
3.4.9.2. Ứng dụng phân đoạn (SP2) vào sản xuất sữa chua collagen 130
KẾT LUẬN 133
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ 134
TÀI LIỆU THAM KHẢO 135
PHỤ LỤC 147

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

AOAC	: Hiệp hội các nhà hóa học phân tích chính thống (Association of Official Analytical Chemists)
ASEAN	: Hiệp hội các quốc gia Đông Nam Á (Association of Southeast Asian Nations)
AU	: Đơn vị Anson (Anson Units)
CFF	: Lọc dòng chảy chéo (Cross flow filtration)
CFU	: Đơn vị khuẩn lạc (Colony Forming Unit)
CH	: Collagen thủy phân (Collagen hydrolysate)
COD	: Nhu cầu oxy hóa học (Chemical Oxygen Demand)
Da	: Dalton
DH	: Độ thủy phân (Degree of hydrolysis)
DNFB	: 1–fluoro– 2,4 – dinitrobenzene
DPPH	: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAI	: Chỉ số hoạt động nhũ hóa (Emulsifying activity index)
EDTA	: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ESI	: Chỉ số ổn định nhũ hóa (Emulsifying stability index)
EU	: Liên minh Châu Âu (European Union)
FAO	: Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp (Food and Agriculture Organization)
FC	: Khả năng tạo bọt (Foaming capacity)
FS	: Khả năng ổn định bọt (Foaming stability)
Gly	: Glycine
GPC	: Sắc ký lọc gel (Gel Permeation Chromatography)
Halal	: Luật Hồi Giáo về thực phẩm
HPLC	: Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography)
HPO	: Cumene hydroperoxide
Hyl	: Hydroxylysine

Hyp	: Hydroxyproline
IC50	: Nồng độ ức chế 50% (Half maximal inhibitory concentration)
ISO	: Tổ chức tiêu chuẩn hóa quốc tế (International Organization for Standardization)
kDa	: kilo Dalton
Kosher	: Luật Do Thái liên quan đến thực phẩm
Max	: Giá trị lớn nhất (Maximum)
MF	: Bộ vi lọc (Microfiltration)
NF	: Lọc nano (Nanofiltration)
NMWC	: Khối lượng phân tử cắt (Nominal molecular weight cutoff)
NR	: Hiệu quả thu hồi nitrogen (Nitrogen recovery efficiency)
POV	: Chỉ số peroxit của dầu (Peroxide oil value)
ppm	: Nồng độ phần triệu (Part per million)
PSI	: Pound lực trên inch vuông (Poundper Square Inch)
PU	: Polyurethane
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis
TCVN	: Tiêu chuẩn Việt Nam
TFF	: Lọc tiếp tuyến (Tangential flow filtration)
TMP	: Áp suất xuyên màng (Transmembrane pressure)
TNHH	: Trách nhiệm hữu hạn
UF	: Siêu lọc (Ultrafiltration)
USA	: United States of America
USD	: United States dollar
VASEP	: Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam (Vietnam Association of Seafood Exporters and Producers)
v/w	: Thể tích/khối lượng (volume/weight)

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Thống kê kim ngạch xuất khẩu cá ngừ 7
Bảng 1.2. So sánh độ thủy phân collagen của các enzyme 24
Bảng 1.3. Một số ứng dụng của màng siêu lọc (UF) 29
Bảng 1.4. Một số tiêu chuẩn chất lượng của collagen thủy phân 35
Bảng 1.5. Tiêu chuẩn chất lượng của Norland hydrolyzed fish collagen 36
Bảng 2.1. Bảng giá trị mã hóa của biến độc lập 43
Bảng 2.2. Giá trị mã hóa của biến độc lập 46
Bảng 3.1. Bảng thành phần hóa học của da cá ngừ vây vàng 57
Bảng 3.2. Bảng giá trị thực và mã hóa của biến độc lập 65
Bảng 3.3. Kết quả thí nghiệm (Exp.) và kết quả dự đoán (Pred.) của Y1 và Y2 thu được từ thiết kế thí nghiệm theo Box-Behnken 66
Bảng 3.4. Hệ số của phương trình hồi quy của 2 hàm mục tiêu Y1 (%) và Y2 (%) 67
Bảng 3.5. Điều kiện tối ưu để loại bỏ phi collagen 72
Bảng 3.6. Thành phần amino acid của da cá ngừ vây vàng sau khi xử lý loại bỏ phi collagen 73
Bảng 3.7. Thành phần hóa học của da cá ngừ vây vàng trước và sau khi xử lý 74
Bảng 3.8. Điều kiện thủy phân thích hợp để thủy phân collagen từ da cá ngừ vây vàng 81
Bảng 3.9. Giá trị thực và mã hóa của biến độc lập 82
Bảng 3.10. Kết quả Y1 và Y2 được thực hiện từ thiết kế thí nghiệm theo Box-Behnken 83
Bảng 3.11. Phân tích (ANOVA) cho hàm mục tiêu Y1 (%) 84
Bảng 3.12. Phân tích (ANOVA) cho hàm mục tiêu Y2 (%) 84
Bảng 3.13. Xác định các hệ số của phương trình hồi cho hàm mục tiêu Y1 (DH, %) 85
Bảng 3.14. Xác định các hệ số của phương trình hồi cho hàm mục tiêu Y2 (NR, %) 85
Bảng 3.15. Điều kiện tối ưu để thủy phân da cá ngừ vây vàng bằng enzyme alcalase 89

Bảng 3.16. Bảng thành phần hóa học của dịch collagen sau thủy phân và làm sạch sơ bộ 90
Bảng 3.17. Tóm tắt tính chất của các phân đoạn collagen thủy phân 106
Bảng 3.18. Thành phần hóa học và hiệu suất thu hồi của các loại dịch thủy phân qua các công đoạn tinh sạch 111
Bảng 3.19. Tóm tắt tính chất của các phân đoạn collagen thủy phân SP1 và SP2 124
Bảng 3.20. Tóm tắt tính chất của các phân đoạn collagen thủy phân SP1 và SP2 125
Bảng 3.21. Kết quả kiểm tra kim loại nặng và vi sinh trong sản phẩm collagen thủy phân 126
Bảng 3.22. Kết quả xác định tỷ lệ nước pha loãng 127

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cá ngừ vây vàng....4
Hình 1.2. Xuất khẩu cá ngừ Việt Nam, 2015-2019 8
Hình 1.3. Cấu trúc collagen 9
Hình 1.4. Nguyên tắc lọc tiếp tuyến....31
Hình 1.5. Phạm vi tối ưu của áp suất xuyên màng....33
Hình 2.1. Sơ đồ thu nhận, vận chuyển da cá ngừ vây vàng 37
Hình 2.2. Sơ đồ xử lý và bảo quản da cá ngừ vây vàng....38
Hình 2.3. Sơ đồ nội dung nghiên cứu 40
Hình 2.4. Sơ đồ nghiên cứu quy trình xử lý phi collagen từ da cá ngừ vây vàng ...41
Hình 2.5. Sơ đồ nghiên cứu quy trình tách chiết collagen thủy phân 44
Hình 2.6. Sơ đồ nghiên cứu quy trình tinh sạch và phân đoạn collagen....47
Hình 2.7. Sơ đồ quy trình sản xuất sữa chưa collagen....52
Hình 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen....58
Hình 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến quá trình loại bỏ lipid 59
Hình 3.3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen 61
Hình 3.4. Ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH đến quá trình loại bỏ lipid 61
Hình 3.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) đến quá trình loại bỏ phi collagen 63
Hình 3.6. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) đến quá trình loại bỏ lipid 64
Hình 3.7. Bề mặt đáp ứng 3D và họ đường đồng mức 2D của (Y1) với ảnh hưởng của các biến độc lập X1, X2 và X3....68
Hình 3.8. Bề mặt đáp ứng 3D và họ đường đồng mức 2D của (Y2) với ảnh hưởng của các biến độc lập X1, X2 và X3....69
Hình 3.9. Dự đoán phần trăm của hydroxyproline/protein (Y1) và phần trăm còn lại của lipid (Y2) với các biến độc lập X1, X2 và X3....72
Hình 3.10. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR) 75
Hình 3.11. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR) 77

Hình 3.12. Ảnh hưởng của pH đến độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR) 79
Hình 3.13. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR) 80
Hình 3. 14. Dự đoán phần độ thủy phân (Y1) và hiệu suất thu hồi nitrogen (Y2) với các biến độc lập X1, X2, X3 và X4 86
Hình 3. 15. Bề mặt đáp ứng 3D và họ đường đồng mức 2D của (Y1) với ảnh hưởng của các biến độc lập X1, X2, X3 và X4..... 87
Hình 3. 16. Bề mặt đáp ứng 3D và họ đường đồng mức 2D của (Y2) với ảnh hưởng của các biến độc lập X1, X2, X3 và X4..... 88
Hình 3.17. Sắc ký đồ phân bố trọng lượng phân tử của peptide collagen trong dịch thủy phân da cá ngừ vây vàng sau khi ly tâm 91
Hình 3.18. Phân bố khối lượng phân tử của các peptide collagen trong dịch sau khi ly tâm..... 91
Hình 3.19. Kết quả kiểm tra khối lượng phân tử của 3 phân đoạn collagen thủy phân 93
Hình 3.20. Ảnh hưởng của pH đến độ hòa tan của các phân đoạn collagen 94
Hình 3.21. Khả năng tạo nhũ tương của các phân đoạn collagen thủy phân..... 96
Hình 3.22. Khả năng ổn định nhũ tương của các phân đoạn collagen thủy phân.... 97
Hình 3.23. Khả năng tạo bọt của các phân đoạn collagen thủy phân 98
Hình 3.24. Độ bền bọt của các phân đoạn collagen thủy phân..... 98
Hình 3.25. Khả năng khử gốc tự do DPPH của các phân đoạn collagen thủy phân 99
Hình 3.26. Năng lực khử của các phân đoạn collagen thủy phân..... 100
Hình 3.27. Ảnh hưởng nồng độ collagen thủy phân đến khả năng chống oxy hóa 102
Hình 3.28. Ảnh hưởng các phân đoạn collagen thủy phân đến khả năng chống oxy hóa ở nồng độ 50mg/mL 102
Hình 3.29. Ảnh hưởng nồng độ collagen thủy phân đến khả năng chống đông.... 104
Hình 3.30. Khả năng chống đông của các phân đoạn collagen thủy phân ở nồng độ 10% 105
Hình 3.31. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình lọc màng..... 107
Hình 3.32. Ảnh hưởng của áp suất đến quá trình lọc màng..... 108
Hình 3.33. Ảnh hưởng của pH đến quá trình lọc màng 109

Hình 3.34. Ảnh hưởng của lưu lượng dòng nhập liệu đến quá trình lọc màng 110
Hình 3.35. Phân bố khối lượng phân tử peptide collagen của SP1 112
Hình 3.36. Phân bố khối lượng phân tử peptide collagen của SP2 112
Hình 3.37. Ảnh hưởng của pH đến độ hòa tan của collagen thủy phân 113
Hình 3.38. Ảnh hưởng của pH đến khả năng tạo nhũ (EAI) của collagen thủy phân 114
Hình 3.39. Ảnh hưởng của pH đến khả năng ổn định nhũ tương (ESI) của colllagen thủy phân 115
Hình 3.40. Ảnh hưởng của pH đến khả năng tạo bọt của collagen thủy phân..... 116
Hình 3.41. Ảnh hưởng của pH đến khả năng bền bọt của collagen thủy phân..... 116
Hình 3.42. Khả năng khử gốc tự do DPPH của collagen..... 118
Hình 3.43. Ảnh hưởng nồng độ collagen collagen thủy phân đến năng lực khử... 119
Hình 3.44. Ảnh hưởng nồng độ collagen đến khả năng chống oxy hóa trong môi trường dầu-nước..... 120
Hình 3.45. Ảnh hưởng các phân đoạn colllagen đến khả năng chống oxy hóa trong môi trường dầu-nước 120
Hình 3.46. Ảnh hưởng của nồng độ collagen đến hoạt tính chống đông..... 122
Hình 3.47. Ảnh hưởng của các phân đoạn collagen thủy phân đến khả năng chống đông 122
Hình 3. 48. Biểu diễn điểm chung của sản phẩm với các tỷ lệ nước phối trộn 128
Hình 3. 49. Biểu diễn điểm chung của sản phẩm với các tỷ lệ axit citric phối trộn 128
Hình 3.50. Biểu diễn điểm chung của sản phẩm với các tỷ lệ sirô phối trộn 129
Hình 3. 51. Biểu diễn điểm chung của sản phẩm với các tỷ lệ collagen thủy phân phối trộn 130
Hình 3. 52. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến độ nhớt, pH và điểm cảm quan của sản phẩm sữa chua 131
Hình 3.53. Ảnh hưởng tỷ lệ bổ sung collagen thủy phân đến độ nhớt, pH và điểm cảm quan của sản phẩm sữa chua 132

MỞ ĐẦU

Giới thiệu

Collagen thủy phân là các peptide có phân tử lượng nhỏ hơn 20 kDa được thủy phân từ collagen hoặc gelatin bằng enzyme. Nó có tính chống oxy hóa, chống đông, khả năng kháng khuẩn, khả năng ngăn chặn tia cực tím, chất kích thích cho các hoocmon làm lành bệnh viêm khớp…., những hoạt tính sinh học mà collagen và gelatin thông thường không có được. Vì vậy collagen thủy phân thường được ứng dụng để sản xuất những sản phẩm cao cấp như thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và dược phẩm.

Trước đây, nguồn nguyên liệu để sản xuất collagen thủy phân thường được lấy từ da lợn, da trâu bò, gia cầm. Tuy nhiên, sự bùng nổ về các bệnh bò điên, lở mồm long móng và cúm gia cầm đã ảnh hưởng tiêu cực đến thái độ sử dụng collagen truyền thống của người tiêu dùng và các sản phẩm có nguồn gốc từ collagen. Từ đó, việc sử dụng các phụ phẩm từ ngành công nghiệp chế biến thủy sản làm nguồn nguyên liệu để chiết xuất collagen thủy phân đã thu hút sự chú ý của các nhà nghiên cứu trong những năm gần đây.

Ngành công nghiệp chế biến thủy sản ở Việt Nam đang phát triển mạnh mẽ. Do đó, lượng phụ phẩm thải ra từ ngành công nghiệp này rất lớn. Trong quy trình sản xuất cá phi lê, lượng phụ phẩm chiếm khoảng 50 – 70%, bao gồm da, xương, đầu, vây, vẩy và nội tạng, nhưng chủ yếu chỉ dùng để sản xuất thức ăn chăn nuôi và phân bón với giá trị kinh tế thấp. Trong khi đó, da cá là nguồn nguyên liệu để sản xuất collagen thủy phân rất tốt. Trong những năm gần đây nước ta đang khuyến khích và hỗ trợ vốn cho các ngư dân tham gia đánh bắt xa bờ với hơn 2000 tàu câu cá ngừ và ước tính sản lượng hàng năm khoảng 17.000 tấn trong đó chủ yếu là cá ngừ vây vàng (VASEP, 2016). Cá ngừ vây vàng của nước ta chủ yếu đưa vào các nhà máy chế biến thủy sản, để sản xuất sản phẩm cá phi lê đông lạnh, do đó một lượng lớn da cá ngừ vây vàng được bán dưới dạng phế liệu để làm thức ăn chăn nuôi với giá trị kinh tế thấp.

Đã có rất nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới về tách chiết và tinh chế collagen đặc biệt là collagen thủy phân bằng enzyme; tuy nhiên ở Việt Nam lĩnh vực này còn mới mẻ, ít công trình nghiên cứu, và chủ yếu chỉ tập trung vào sản xuất collagen hoặc gelatin để làm phụ gia thực phẩm. Việc nghiên cứu và ứng dụng các phương pháp tách chiết và tinh chế collagen thủy phân để sản xuất ra các peptide collagen với có hoạt tính sinh học cao là điều cần thiết để có thể tăng cường ứng dụng các sản phẩm từ collagen thủy phân, đặc biệt trong các lĩnh vực thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm.

Từ những lý do trên, đề tài "Nghiên cứu quy trình tách chiết và tinh sạch collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*) và ứng dụng trong thực phẩm" đã được thực hiện.

Mục tiêu

Đề tài được thực hiện nhằm mục đích nâng cao giá trị nguồn phụ phẩm da cá ngừ, tạo ra collagen thủy phân có hoạt tính sinh học và tính năng công nghệ nhằm ứng dụng trong thực phẩm.

Nội dung nghiên cứu

+ Nghiên cứu quy trình xử lý phi collagen từ da cá ngừ vây vàng.

+ Nghiên cứu quy trình thủy phân collagen da cá bằng enzyme.

+ Tinh sạch, phân đoạn và xác định hoạt tính của collagen thủy phân.

+ Thử nghiệm ứng dụng collagen thủy phân vào một số sản phẩm thực phẩm.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

- Ý nghĩa khoa học

Đề tài đã xác định các thông số tối ưu trong quá trình xử lý, thủy phân và tinh sạch collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng. Việc phân tách các phân đoạn collagen thủy phân và nghiên cứu hoạt tính sinh học của chúng giúp làm rõ hơn giá trị của collagen thủy phân, làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu sau này về việc ứng dụng collagen thủy phân trong thực tiễn đời sống.

- Ý nghĩa thực tiễn

Đề tài tìm thêm được nguồn nguyên liệu mới để sản xuất collagen thủy phân nhằm ứng dụng vào các lĩnh vực thực phẩm, dược phẩm và y học, đồng thời nâng cao giá trị sử dụng phụ phẩm của các nhà máy chế biến cá ngừ phi lê.

Đề tài phù hợp với chiến lược phát triển thủy sản Việt Nam đến 2030, tầm nhìn đến năm 2045 theo quyết định số 339/QĐ-TTg của Thủ Tướng Chính Phủ ngày 11 tháng 3 năm 2021. Mục tiêu là phát triển thủy sản thành ngành kinh tế quan trọng của quốc gia, sản xuất hợp lý, năng suất chất lượng và hiệu quả.

Tính mới của đề tài

- Đề tài đã tìm ra các thông số kỹ thuật tối ưu khi xử lý phi collagen trên da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares)* bằng dung dịch NaOH.

- Đề tài đã tìm ra các thông số kỹ thuật tối ưu để thủy phân collagen của da cá ngừ vây vàng bằng (*Thunnus albacares)* bằng enzyme alcalase.

- Đề tài đã tinh sạch và phân đoạn collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares)* và đánh giá các tính chất chức năng của các phân đoạn để từ đó đề xuất các hướng ứng dụng cụ thể.

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. Tình hình khai thác và chế biến cá ngừ vây vàng

1.1.1. Tổng quan về cá ngừ vây vàng

Cá ngừ vây vàng thuộc họ cá thu ngừ (*Scombridae*) có giá trị kinh tế quan trọng ở vùng biển nước ta (Hình 1.1).



Hình 1.1. Cá ngừ vây vàng

Nguồn: Bonnaterre, 1788

Phân loại khoa học theo Carl Linneaus của cá ngừ vây vàng:

Giới (*regnum*): Animalia
Ngành (*phylum*): Chordata
Lớp (*class*): Actinopterygii
Bộ (*ordo*): Perciformes
Họ (*familia*): Scombridae
Chi (*genus*): *Thunnus*
Loài (*species*): *T. albacares*

Cá ngừ vây vàng có thân hình thoi dài, hơi dẹp bên. Cá có hai vây lưng rất gần nhau, sau vây lưng thứ hai có 8 – 10 vây phụ, sau vây hậu môn có 7 – 10 vây phụ. Ở cá thể trưởng thành, vây thứ hai và vây hậu môn rất dài, chiếm khoảng 20% chiều dài thân. Vây ngực dài đạt tới quá khởi điểm vây lưng thứ hai. Thân phủ vảy rất nhỏ. Cuống đuôi thon, mỗi bên có một gờ cứng. Lưng màu xanh đậm ánh kim loại, bụng

màu vàng và ánh bạc, có khoảng 20 đường đứt đoạn chạy gần vuông góc với rìa bụng. Các vây có màu vàng tươi, vây phụ có viền đen hẹp.

Cá ngừ vây vàng phân bố nhiều ở vùng biển nhiệt đới và cận nhiệt đới Đại Tây Dương, Thái Bình Dương, Ấn Độ Dương, Đông Phi, Ấn Độ, Sri Lanka, Australia, Indonesia, Malaysia, Philipin, Nhật Bản và Trung Quốc. Ở Việt Nam, cá phân bố chủ yếu ở vùng biển xa bờ miền Trung và Đông Nam Bộ. Cá ngừ vây vàng được khai thác quanh năm với kích thước khai thác từ 490 – 2000 mm (Thái Thanh Dương, 2001).

1.1.2. Tình hình khai thác cá ngừ vây vàng

Mùa vụ khai thác cá ngừ ở vùng biển Việt Nam gồm hai vụ, vụ chính bắt đầu từ tháng 4 đến tháng 8, vụ phụ từ tháng 10 đến tháng 2 năm sau. Cá ngừ thường tập trung thành đàn và di cư, trong đàn thường bao gồm các loài khác nhau. Nghề khai thác chủ yếu là lưới vây, rê, câu và đăng. Nghề câu vàng mới được du nhập từ năm 1990 đã nhanh chóng trở thành một nghề khai thác cá ngừ quan trọng.

Theo báo cáo của tổng cục thủy sản năm 2015, tính đến tháng 12/2015 cả nước có 3040 tàu khai thác cá ngừ, trong đó nghề câu 2050 tàu, nghề lưới rê 296 tàu. Sản lượng khai thác cá ngừ 11 tháng năm 2015 là 91356 tấn, trong đó cá ngừ vây vàng và mắt to đạt 17206 tấn, ước cả năm đạt 17500 tấn và cá ngừ vằn đạt 74150 tấn, ước cả năm đạt 80000 tấn.

Báo cáo tại hội nghị Hiệp hội chế biến và xuất khẩu thủy sản Việt Nam (VASEP) năm 2016 cho biết tổng số tàu cá khai thác cá ngừ tại các tỉnh Bình Định, Phú Yên và Khánh Hòa là 2372 tàu, trong đó Bình Định: 1329 tàu, Phú Yên: 578 tàu; Khánh Hòa: 465 tàu. Tổng sản lượng cá ngừ khai thác của 3 tỉnh năm 2016 là: 92192 tấn; trong đó, Bình Định đạt 53860 tấn, Phú Yên đạt 10812 tấn và Khánh Hòa đạt 27520 tấn. Trong đó, cá ngừ mắt to và vây vàng là: 17542 tấn; cá ngừ vằn là 74650 tấn tăng 49,3% so với kế hoạch năm.

Trong năm 2015 và 2016, tàu khai thác cá ngừ, đặc biệt những tàu đóng mới, đã được trang bị hầm bảo quản bằng vật liệu thổi xốp PU (polyurethane), nhiều tàu lưới vây đã trang bị máy dò cá hiện đại nên năng suất khai thác cao hơn trước. Đặc biệt, nhiều tàu đã trang bị thiết bị làm ngất cá do một số đơn vị trong nước sản xuất khi thu hoạch nên chất lượng, giá cá đã được nâng cao hơn so với thời gian trước.

Theo báo cáo của bộ nông nghiệp và phát triển nông thôn, trong 3 tháng đầu năm 2017, sản lượng khai thác cá ngừ đại dương của 3 tỉnh trọng điểm ước đạt 5846 tấn. Hiện nay, giá cá ngừ đại dương được thu mua tại cảng dao động ở mức 93000 – 110000 đồng/kg. Tại Phú Yên sản lượng khai thác cá ngừ đại dương ước đạt 1500 tấn giảm 2,7% so với cùng kỳ 2016; Tại Bình Định đạt 3446 tấn, tăng 75% so với cùng kỳ (1970 tấn); tại Khánh Hòa sản lượng cá ngừ đại dương là 900 tấn, giảm 8% so với cùng kỳ (Đoàn Bộ và Nguyễn Hoàng Minh, 2013).

Trong những năm gần đây nước ta đang khuyến khích và hỗ trợ vốn cho các ngư dân tham gia đánh bắt xa bờ với hơn 2000 tàu câu cá ngừ. Cá ngừ vây vàng và cá ngừ mắt to có trữ lượng trung bình trên 45 nghìn tấn, với sản lượng khai thác hàng năm từ 17.000 đến 21.000 tấn. Sản lượng cá ngừ vây vàng được khai thác trong năm 2018 là 19,268 tấn. Do ảnh hưởng của đại dịch Covid 19 sản lượng khai thác trong năm 2019 và 2020 có giảm nhưng sản lượng khai thác vẫn ở mức cao lần lượt 17.500 tấn và 17.000 tấn. Cá ngừ vây vàng thường được khai thác trong 6 tháng từ tháng 12 đến tháng 6 năm sau (VASEP, 2020).

Nghề khai thác cá ngừ vây vàng ở Việt Nam là một mắt xích quan trọng trong chuỗi cung ứng cá ngừ nhằm phục vụ nhu cầu đang tăng lên của cả thế giới. Hiện nay nước ta đã có hiệp hội cá ngừ Việt Nam được thành lập ngày 27/10/2010 nhằm mục đích hợp tác, liên kết, hỗ trợ lẫn nhau trong việc phát triển các hoạt động nghề nghiệp, nâng cao hiệu quả hoạt động và bảo vệ quyền lợi hợp pháp của các thành viên liên quan đến việc bảo vệ, đánh bắt, nuôi trồng, kinh doanh, chế biến nguồn cá ngừ trong phạm vi Việt Nam.

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% (Joseph, 2003). Collagen cấu thành 27,1% da cá ngừ vây vàng ở Hàn Quốc (Woo và ctv, 2008). 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.

1.1.3. Tình hình chế biến và xuất khẩu cá ngừ vây vàng

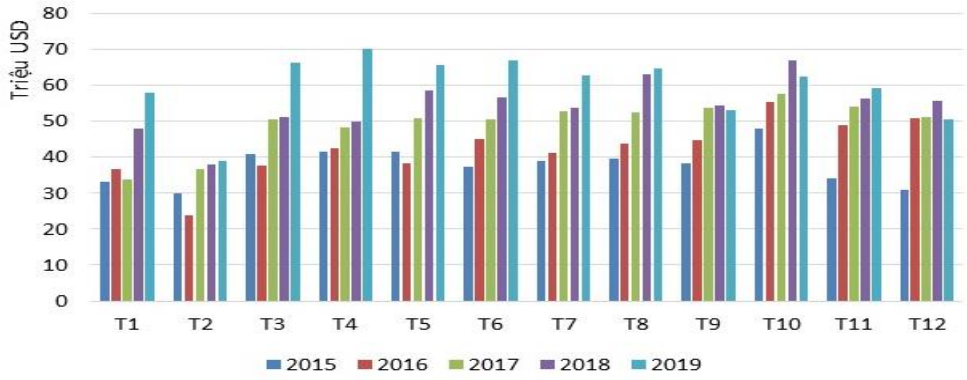
Các sản phẩm cá ngừ của Việt Nam đã xuất sang được 86 thị trường, trong đó có các thị trường lớn như Mỹ, Nhật Bản, ASEAN, EU…, trong đó Mỹ là thị trường xuất khẩu cá ngừ số một của Việt Nam.

Theo Hiệp hội chế biến và xuất khẩu thủy sản Việt Nam (VASEP, 2020), cá ngừ là một trong những sản phẩm hải sản xuất khẩu chủ lực của Việt Nam. Từ 2015 đến 2019, giá trị xuất khẩu cá ngừ tăng gấp hơn 1,6 lần, từ 455 triệu USD lên hơn 719 triệu USD, tăng 58%. Tỷ trọng của cá ngừ trong tổng xuất khẩu hải sản của Việt Nam luôn duy trì ở mức từ 21-22%. Các loài cá ngừ xuất khẩu chủ yếu của Việt Nam gồm cá ngừ vây vàng, cá ngừ mắt to và cá ngừ vằn.

Bảng 1.1. Thống kê kim ngạch xuất khẩu cá ngừ

Năm	2015	2016	2017	2018	2019
Kim ngạch xuất khẩu (triệu USD)	455	509	592	652	719

Nguồn: VASEP, 2020



Nguồn: VASEP, 2020

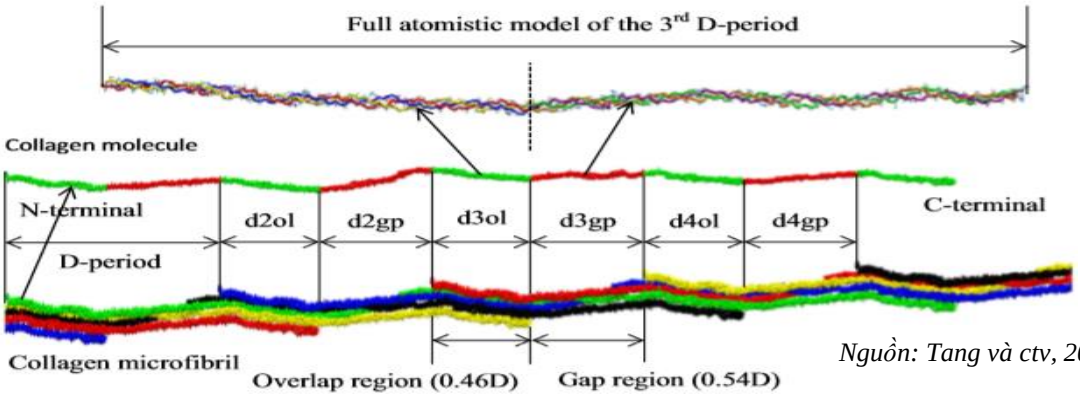
Hình 1.2. Xuất khẩu cá ngừ Việt Nam, 2015-2019

Hiện nay cá ngừ vây vàng của Việt Nam chủ yếu được sản xuất dạng phi lê đông lạnh hoặc đóng hộp. Lượng phế liệu từ chế biến cá ngừ phi lê đông lạnh chiếm khoảng 50 – 60% khối lượng nguyên liệu, trong đó da cá chiếm khoảng 14%. Da cá hiện chủ yếu được bán phế liệu cho các cơ sở sản xuất thức ăn chăn nuôi với giá trị sử dụng thấp. Do đó, việc nâng cao giá trị sử dụng cho da cá ngừ vây vàng là một việc làm cấp thiết nhằm tăng doanh thu cho các cơ sở chế biến cá ngừ, nâng cao vị thế cá ngừ trong chuỗi cung ứng thủy hải sản và góp phần đa dạng hóa các sản phẩm từ cá ngừ thông qua việc sản xuất collagen thủy phân, một hợp chất có hoạt tính sinh học cao.

1.2. Tổng quan về collagen và collagen thủy phân

1.2.1. Tổng quan về collagen

Collagen là một loại protein cấu trúc, chiếm khoảng 30% lượng protein trong cơ thể động vật. Nó được phân bố trong các bộ phận như da, cơ, gân, sụn, dây chằng xương và răng (Di Lullo và ctv, 2002). Có hơn 29 loại collagen đã được xác định trong các mô khác nhau; mỗi loại có trình tự amino acid và tính chất sinh lý khác nhau. Trong số 29 loại này, collagen loại I là dạng phổ biến nhất (Hulmes, 2008). Collagen là chất giàu hydroxyproline, gồm ba chuỗi polypeptide xoắn vào nhau có đường kính khoảng 1,5nm và chiều dài 300nm (Jenkins và Raines, 2002). Mô hình cấu trúc của collagen được trình bày trong Hình 1.3 (Tang và ctv, 2017).



Nguồn: Tang và ctv, 2017

Hình 1.3. Cấu trúc collagen

Theo Tang và ctv (2017), trong mô hình microfibril collagen, vùng khoảng cách và vùng chồng chéo phân phối xen kẽ dọc theo chiều dọc microfibril. Các vùng chồng chéo có năm phân tử collagen, trong khi các vùng khoảng cách chỉ có bốn phân tử collagen.

Cấu trúc của collagen có một mô hình lặp đi lặp lại Gly-X-Y, trong đó X và Y có thể là bất kỳ axit amin nào, nhưng chủ yếu là proline và hyroxyproline (Silvipriya và ctv, 2015). Sợi collagen chiếm chủ yếu trong sợi dây chằng, ảnh hưởng đến khả năng nén ở các khớp sụn và tính linh động của mạch máu và da. Nó được xem như là một chất keo dính các bộ phận trong cơ thể con người thành một khối hoàn chỉnh; nếu không có collagen, cơ thể người chỉ là các phần rời rạc. Điều này chứng tỏ tầm quan trọng của collagen với sự sống của con người (Buehler, 2006; Zylberberg và Laurin, 2011).

Nguồn nguyên liệu truyền thống để sản xuất collagen là từ da, xương, chân và sụn của động vật trên cạn như bò, lợn và các loại gia cầm. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, sự bùng nổ về các bệnh bò điên, lở mồm long móng và cúm gia cầm đã ảnh hưởng tiêu cực đến thái độ sử dụng collagen của người tiêu dùng và các sản phẩm có nguồn gốc từ collagen. Ngoài ra một số collagen thu nhận từ lợn và một số động vật khác không được giết mổ theo quy định của một số tôn giáo thì không được sử dụng trong một số sản phẩm của Kosher (luật Do Thái liên quan đến thực phẩm) hoặc Halal (luật Hồi Giáo về thực phẩm).

Trong số các nguồn nguyên liệu được dùng để thay thế nguồn collagen truyền thống thì các phụ phẩm trong ngành công nghệ chế biến thủy sản như vảy, da, bong bóng, và xương là nguồn nguyên liệu rất tốt để sản xuất collagen. Trong công nghiệp chế biến cá, lượng phụ phẩm được thải ra chiếm 50 – 70% khối lượng của nguyên liệu. Hầu hết các phụ phẩm này hiện đang được sử dụng vào các sản phẩm có giá trị thấp như thức ăn chăn nuôi hoặc phân bón. Việc sử dụng hiệu quả các sản phẩm phụ này có thể sản xuất ra các sản phẩm giá trị gia tăng, giảm ô nhiễm môi trường và thậm chí tạo ra cơ hội kinh doanh mới (Liu và ctv, 2015).

1.2.2. Tổng quan về collagen thủy phân

Collagen có thể được thủy phân bằng axit cho sản phẩm là ASC (acid-soluble collagen), hoặc bằng enzyme pepsin cho sản phẩm là PSC (Pepsin-soluble collagen); ASC và PSC được gọi chung là gelatin. Như vậy, gelatin là một polypeptide khối lượng phân tử 40.000 đến 90.000 Da có nguồn gốc từ collagen.

Gelatin được chiết xuất từ da cá chứa khoảng 19 – 20 loại axit amin và các axit amin như glycine, alanine, proline, và hydroxyproline chiếm một tỉ lệ rất lớn (Tamilmozhi và ctv, 2013; Liu và ctv, 2015; Sun và ctv, 2017). Tổng hàm lượng proline và hydroxyproline của gelatin dao động trong khoảng từ 15% – 20%, thấp hơn trong collagen thủy phân từ da lợn và da bò (21% – 23%) (Ikoma và ctv, 2003; Duan và ctv, 2009; Abedin và ctv, 2014).

Hiện nay collagen và gelatin được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm và các ngành công nghiệp khác với các vai trò khác nhau như chất nhũ hóa, chất tạo bọt, chất ổn định keo, chất tạo màng. Vì vậy collagen và gelatin được sử dụng chủ yếu như một chất phụ gia. Do gelatin có khả năng hòa tan tốt hơn collagen nên gelatin được sử dụng phổ biến hơn.

Khi collagen hoặc gelatin bị thủy phân bởi enzyme tạo thành các đoạn peptide có khối lượng phân tử nhỏ hơn 20 kDa thì được gọi là collagen thủy phân (collagen hydrolysate: CH) (Djagny và ctv, 2001; Zague, 2008; Boonmaleerat và ctv, 2017).

1.2.3. Tính chất của collagen thủy phân

Collagen thủy phân có các hoạt tính sinh học như khả năng chống oxy hóa, chống đông, kháng khuẩn, ngăn chặn tia cực tím và là chất kích thích cho các hormone làm lành bệnh viêm khớp. Ngoài ra collagen thủy phân có khả năng hòa tan tốt trong nước, kể cả nước lạnh, và khả năng tiêu hóa tốt hơn collagen và gelatin. Vì vậy collagen thủy phân được ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp, trong đó có thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm.

1.2.3.1. Khả năng hòa tan của collagen thủy phân

Sự cân bằng của lực kỵ nước và tính kỵ nước của peptide là một nguyên nhân quan trọng của việc tăng cường độ hòa tan. Các peptide nhỏ được thủy phân từ protein dạng sợi sẽ có nhiều gốc phân cực làm cho khả năng kết với nước tăng, từ đó độ hòa tăng (Kristinsson & Rasco, 2000; Gbogouri và ctv, 2004). Collagen trong da cá ngừ vây vàng chủ yếu thuộc type I, có cấu trúc hình sợi. Vì vậy việc thủy phân collagen từ da sẽ tạo thành các peptide có khối lượng phân tử nhỏ có độ hòa tan cao.

Nhờ vào khả năng hòa tan dễ dàng trong nước, collagen thủy phân thường được bổ sung vào nước ép trái cây giúp tăng cường dinh dưỡng và khả năng tiêu hóa cho người tiêu dùng. Các nhà khoa học cho rằng 90% collagen thủy phân có thể được tiêu hóa (Bilek và Bayram, 2015; Ichikawa và ctv, 2010). Từ máu, các peptide (có chứa hydroxyproline) được vận chuyển vào các mô đích, ví dụ da, xương và sụn, nơi mà các peptide đóng vai trò như là các khối cấu tạo cho các tế bào địa phương và giúp tăng cường sản xuất các sợi collagen mới (Mari và ctv, 2010; Shigemura và ctv, 2014).

1.2.3.2. Khả năng tạo nhũ của collagen thủy phân

Tính chất tạo nhũ của các hợp chất thủy phân bằng enzyme từ cá có liên quan trực tiếp đến đặc tính bề mặt, nghĩa là, với mức độ hợp chất thủy phân có hiệu quả làm giảm sức căn bề mặt giữa thành phần kỵ nước và ưa nước trong sản phẩm (dos Santos và ctv, 2011).

Các yếu tố góp phần vào các đặc tính này là độ hòa tan, phân tử kích thước và trình tự axit amin của peptide (Jemil và ctv, 2014; Nalinanon và ctv, 2011; Dos Santos

và ctv, 2011; Taheri và ctv, 2013; Tanuja và ctv, 2012). Các yếu tố khác ảnh hưởng đến hoạt động tạo nhũ là mức độ thủy phân (DH), axetyl hóa của peptide, loại enzyme được sử dụng và dung môi chiết xuất (Nalinanon và ctv, 2011; Dos Santos và ctv, 2011; Taheri và ctv, 2013).

Các nghiên cứu này đã cung cấp các thông tin chi tiết về độ hòa tan, phân tử trọng lượng và trình tự axit amin peptide như các yếu tố ảnh hưởng đến protein thủy phân từ cá có tính chất tạo nhũ. pH môi trường ảnh hưởng đến tính chất nhũ hóa bằng cách thay đổi tính kỵ nước bề mặt protein và lớp bảo vệ bao quanh các giọt lipid điều này cũng ảnh hưởng đến độ hòa tan và khả năng tạo nhũ hóa (Taheri và ctv, 2013). Một số các nghiên cứu cho thấy rằng phạm vi pH 6 – 10 tạo ra chỉ số hoạt động nhũ hóa (EAI: Emulsifying activity index), với EAI thấp nhất ở pH 4. Ở phạm vi pH 8 – 11, nhũ tương được ổn định tối ưu (Taheri và ctv, 2013). Theo Taheri và ctv (2013), polypeptide mở ra do điện tích âm ở pH có tính kiềm cao. Do thay đổi lực đẩy này cho phép định hướng tốt hơn tại giao diện dầu - nước. Điều này tạo điều kiện cho phép tiếp xúc hiệu quả hơn với các gốc peptide ưa nước và kỵ nước, thúc đẩy các tương tác đáng kể tại giao diện dầu-nước (Taheri và ctv, 2013). Nói chung, giảm kích thước protein làm giảm độ ổn định của nhũ tương do màng giao thoa yếu xung quanh các giọt nhũ tương. Tăng lượng peptide trọng lượng phân tử lớn hơn (hoặc kỵ nước hơn peptide) cũng góp phần vào sự ổn định của nhũ tương (Tanuja và ctv, 2012). Kết quả này cũng tương đồng với với kết quả từ các nghiên cứu của Chi và ctv (2014); và ctv, 2013; Taheri và ctv, 2013).

Trình tự của một axit amin và đặc tính amphiphilic ở bề mặt phân cách nước dầu được coi là những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tính chất nhũ tương hơn là chiều dài đoạn peptide (Taheri và ctv, 2013). Nghiên cứu của Taheri và ctv (2013) cho thấy rằng hydroxyl hóa axit amin, chẳng hạn như hydroxyproline (Hyp) và hydroxylysine (Hyl), góp phần ổn định nhũ tương của dịch thủy phân được tạo ra từ nội tạng cá hồi vân.

1.2.3.3. Khả năng tạo bọt của collagen thủy phân

Sự di chuyển, thâm nhập và sắp xếp lại các phân tử ở bề mặt khí và lỏng ảnh hưởng đến tính chất tạo bọt (Elavarasan và ctv, 2014). Một số nghiên cứu cho thấy khả năng tạo bọt của protein thủy phân từ phụ phẩm cá dao động từ 23 đến 240% và độ ổn định bọt của nó nằm trong khoảng từ 20 đến 140% (Chalamaiah và ctv, 2010; Chi và ctv, 2014; Elavarasan và ctv, 2014; Foh và ctv, 2011; Taheri và ctv, 2013; Tanuja và ctv, 2012). Protein trong pha phân tán làm giảm sức căng tại bề mặt khí và lỏng dẫn đến việc tạo ra bọt (Tanuja và ctv, 2012). Tính chất tạo bọt của protein thủy phân từ phụ phẩm cá cũng bị ảnh hưởng bởi pH, với khả năng tạo bọt thấp ở pH 4, nhưng ổn định ở khoảng pH là 6 – 10 (Taheri và ctv, 2013). Khối lượng phân tử của các peptide cũng ảnh hưởng đến tính chất tạo bọt của protein thủy phân từ phụ phẩm cá. Theo Nalinanon và ctv (2011), các peptide có trọng lượng phân tử thấp (~ 1 kDa) không thể duy trì định hướng bề mặt có trật tự của các phân tử. Một số nhà nghiên cứu báo cáo rằng khả năng tạo bọt giảm khi kích thước peptide giảm (Chi và ctv, 2014; Li và ctv, 2013).

Tuy nhiên khả năng tạo bọt còn phụ thuộc vào cấu trúc và khả năng tích điện của các peptide. Vì vậy cần phải khảo sát khả năng tạo bọt của các phân đoạn collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng để đề xuất hướng ứng dụng cho các phân đoạn collagen.

1.2.3.4. Khả năng chống oxy hóa của collagen thủy phân

Khả năng chống oxy hóa của các peptide phụ thuộc vào thành phần axit amin trong chuỗi peptide. Các axit amin kỵ nước (Val, Ile, Leu, Met, Phe, Trp và Cys) có khả năng thu nhận gốc hydroxyl cao hơn các axit amin ưa nước (Betts và Russell, 2007; Ren và ctv, 2008). Chẳng hạn như trong thành phần collagen của da cá chứa một lượng lớn các axit amin kỵ nước như glycine, alanine, proline và methionine, do đó các peptide từ collagen có khả năng chống oxy hóa tốt. Một nghiên cứu đã chỉ ra rằng trong collagen có chứa hàm lượng glycine lớn nên khả năng chống oxy hóa cao (Matilla và ctv, 2002)

Ngoài ra, các axit amin có tính axit có khả năng chống oxy hóa mạnh do sự hiện diện của các nhóm carboxyl trong phân tử (Sarmadi & Ismail, 2010; Udenigwe & Aluko, 2011). Các axit amin có tính axit như axit glutamic và arginine có thể ảnh hưởng đến khả năng chống oxy hóa của các peptide collagen trọng lượng phân tử thấp. Collagen thủy phân từ da cá hồi có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất ở phân đoạn có khối lượng phân tử nhỏ hơn 3kDa (Wu và ctv, 2018). Do đó, collagen thủy phân có thể được bổ sung vào thức ăn, đồ uống với vai trò là chất chống oxy hóa và đồng thời hỗ trợ cho sức khỏe, đặc biệt là xương và da (Guillerminet và ctv, 2010; Guillerminet và ctv, 2012; Daneault, 2014).

1.2.3.5. Khả năng chống đông của collagen thủy phân

Peptide được giải phóng từ collagen thường chứa các axit amin ưa nước, có thể liên kết nước để ngăn chặn tinh thể băng hình thành. Các peptide có số lượng axit amin nhiều có thể tạo thành cấu trúc xoắn alpha dễ dàng. Các peptide collagen type I có các axit amin như Ala và Thr thì dễ dàng tạo thành cấu trúc xoắn alpha. Như vậy, các peptide collagen type I có dạng xoắn alpha có thể gia tăng kết hợp với nước đá làm cho hoạt tính chống đông tăng (Bang và ctv, 2013).

Damodaran đã báo cáo rằng các tripetide -Gly-Pro-X- hoặc -Gly-X-X- lặp lại trong chuỗi peptide collagen có tác động lớn trong việc ức chế sự kết tinh của nước. Vì vậy khả năng chống đông của các peptide này rất cao (Damodaran, 2007). Collagen thủy phân có khả năng chống đóng băng sản phẩm tốt nhất ở phân đoạn từ 3 – 10 kDa (Wu và ctv, 2018).

Những nghiên cứu trên cho thấy việc khảo sát các hoạt tính chức năng của các peptide collagen trong da cá ngừ vây vàng là rất quan trọng để từ đó ứng dụng trong công nghệ chế biến các sản phẩm thực phẩm.

1.2.4. Ứng dụng của collagen thủy phân

1.2.4.1. Ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm

Tùy theo tính chất công nghệ của từng loại thực phẩm mà các loại collagen thủy phân khác nhau được sử dụng trong chế biến thực phẩm.

Collagen thủy phân có khối lượng phân tử lớn như gelatin được sử dụng đối với các sản phẩm thực phẩm nhằm làm tăng khả năng tạo gel, độ kết dính, tính ổn định, tạo màng, thay thế chất béo hoặc tạo bọt xốp như kẹo dẻo, kẹo marshmallow (Baziwane và He, 2003). Collagen thủy phân khi kết hợp với chitosan để tạo màng giúp khắc phục được khả năng cách ẩm của màng chitosan (Ocak, 2018). Trong các sản phẩm phomat, người ta thêm vào một hàm lượng collagen thủy phân nhằm ngăn chặn sự mất nước. Ngoài ra, trong sản phẩm bơ sữa, collagen thủy phân đóng vai trò quan trọng trong việc tạo độ mịn, độ sánh cho sản phẩm. Khi bổ sung khoảng 2,5% collagen thủy phân vào nước ép cam hoặc táo sẽ làm tăng làm lượng protein đồng thời làm tăng giá trị cảm quan cho sản phẩm (Bilek và Bayram, 2015).

Collagen thủy phân có khối lượng phân tử nhỏ thường có khả năng hòa tan tốt, đồng thời có một số hoạt tính sinh học như khả năng chống oxy hóa, chống đông (Razali và ctv., 2015; Wu và ctv, 2018), khả năng kháng khuẩn (Imjongjirak và ctv, 2017; và ctv, 2017), kích thích một số hormone làm lành các vết thương và viêm khớp (Boonmaleerat và ctv, 2017) nên thường được sử dụng trong sản xuất các loại thực phẩm chức năng.

1.2.4.2. Ứng dụng trong mỹ phẩm

Collagen thủy phân có các hoạt tính sinh học như khả năng chống oxy hóa, kháng khuẩn, giữ ẩm và ngăn tia cực tím ảnh hưởng đến da người (Bilek và Bayram, 2015), tạo ra một hệ thống bảo vệ, nâng đỡ, và hỗ trợ các đặc tính cơ học của da như sức căng, độ đàn hồi, độ ẩm. Collagen thủy phân giúp duy trì độ ẩm cho tế bào, đóng vai trò quan trọng giúp cải thiện cấu trúc da, kích thích quá trình tái tạo của làn da, phục hồi tế bào da bị tổn thương (Inoue và ctv, 2016). Chính vì vậy mà collagen được dùng làm nguyên liệu để sản xuất các sản phẩm như kem dưỡng da cao cấp, dầu gội, các sản phẩm dưỡng tóc cũng như các loại sữa tắm (Zague và ctv, 2018).

Collagen còn được sử dụng để hỗ trợ trong trường hợp da bị tổn thương hay trong giai đoạn tái tạo da sau khi điều trị nám, mụn trứng cá, sẹo, rạn da và tiêu da thừa sau khi giảm béo (Sionkowska và ctv, 2017).

1.2.4.3. Trong y học và dược phẩm

Collagen thủy phân là một vật liệu có khả năng phân hủy sinh học, có tính tương thích sinh học cũng như khả năng cầm máu nên là một loại vật liệu sinh học lý tưởng cho việc sản xuất các sản phẩm y học.

Màng collagen thủy phân được sử dụng làm bao bì cho thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm (Langmaier và ctv, 2008). Collagen thủy phân được sử dụng như một hệ thống màng phân hủy sinh học trong việc bào chế các loại thuốc bao gồm thuốc tránh thai, kháng sinh, insulin, hormone tăng trưởng…

Collagen thủy phân được sử dụng rộng rãi trong phẫu thuật thẩm mỹ, chữa lành vết thương cho các bệnh nhân bị phỏng, tái tạo xương và nhiều mục đích khác thuộc nha khoa, phẫu thuật, chỉnh hình. Collagen thủy phân được dùng trong việc xây dựng cấu trúc da nhân tạo để chữa trị cho các vết bỏng nghiêm trọng. Đôi khi chúng được sử dụng kết hợp với silicone, glycosaminoglycan, nguyên bào sợi, các tác nhân tăng trưởng và các hợp chất khác. Collagen thủy phân cũng được bán trên thị trường như một chất bổ sung để chữa bệnh loãng xương (Djagny và ctv, 2001)

Ngoài ra, collagen thủy phân còn là phần nền giúp tích tụ calcium trong xương. Nếu hàm lượng collagen giảm đáng kể, calcium không thể tích tụ làm cho xương giòn và dễ gãy, sụn dễ bị hao mòn tạo nên các cơn đau ở khớp gối và hông (Elam và ctv, 2015; Boonmaleerat và ctv, 2017). Do đó, collagen thủy phân đã được sử dụng trong chữa bệnh viêm khớp đầu gối (Bello và Oesser, 2006; McAlindon và ctv, 2011); canxi peptide collagen được dùng để điều trị bệnh loãng xương (Guo và ctv, 2015).

Trong phẫu thuật nội soi, collagen thủy phân được ứng dụng để bôi vào các ống nội soi, có tác dụng bôi trơn, vì thế các bác sĩ dễ dàng đưa các ống này vào cơ thể bệnh nhân mà không gây đau. Sau thời gian từ 40 – 60 phút, nó sẽ tan hủy trong cơ thể bệnh nhân mà không gây hại gì.

Trong nha khoa, collagen thủy phân được chế tạo thành các mảnh bọt biển (sponges), có khả năng hấp thụ một lượng chất lỏng gấp 50 lần khối lượng của chúng, vì thế chúng có khả năng cầm máu nhanh chóng. Collagen thủy phân cũng được sử

dụng trong việc tạo ra một lớp men răng nhân tạo có chứa các ion calcium, phosphate, fluoride áp lên bề mặt răng thật, để bảo vệ răng khỏi các tác nhân gây sâu răng.

1.3. Các phương pháp tách chiết và tinh sạch collagen thủy phân

1.3.1. Loại bỏ các thành phần phi collagen

Thành phần chủ yếu của da cá là nước, khoáng, lipid và protein. Vì vậy, muốn tạo ra chế phẩm giàu collagen có thể sử dụng axit, muối hoặc kiềm hoặc phối hợp, tùy theo nguồn gốc của nguyên liệu thô. Việc loại bỏ các chất không phải là collagen để quá trình chiết xuất collagen về sau đạt được năng suất cao hơn.

Sự phân bố khối lượng phân tử, cấu trúc, thành phần, tính chất vật lý và chức năng của collagen phụ thuộc nhiều vào quá trình trích ly. Trích ly collagen bắt đầu bằng việc loại bỏ nhiều liên kết cộng hóa trị trong liên phân tử, chủ yếu liên quan đến lượng lysine và hydroxy-lysine, liên kết este và các liên kết khác với các saccharide (Schmidt và ctv, 2016). Các bước trong chiết xuất collagen bao gồm tiền xử lý để loại bỏ các chất không phải collagen và phương pháp chiết xuất dựa trên khả năng hòa tan của collagen trong dung dịch muối và axit yếu (có hoặc không có enzyme).

Do tính chất liên kết chéo của collagen trong các mô liên kết của động vật, nên sẽ rất khó để phá vỡ liên kết này, ngay cả trong nước sôi. Do đó, cần phải tiến hành xử lý bằng phương pháp hóa học để phá vỡ các liên kết chéo này trước khi tinh sạch và thu hồi collagen. Người ta thường sử dụng axit và bazơ pha loãng để thủy phân một phần collagen và cắt đứt các liên kết chéo. Dưới tác dụng của NaOH, collagen bị cắt đứt các liên kết peptide làm phá vỡ liên kết trong collagen, ngoài ra NaOH khử các protein yếu, mucopolysacharide và một số sắc tố (Trần Thị Luyến, 2016) trong nguyên liệu dẫn đến hàm lượng protein giảm dần.

Lipid cũng là một thành phần chính cần phải loại bỏ. Loại bỏ lipid là một trong những bước quan trọng trong toàn bộ quy trình chiết xuất collagen bởi hàm lượng lipid tổng ban đầu và thành phần các hoạt chất trong lipid tổng sẽ ảnh hưởng trực tiếp tới hiệu suất quy trình (trong quá trình thủy phân). Trong nghiên cứu, chiết xuất lipid từ sinh vật biển có những đặc trưng riêng biệt so với các sinh vật trên cạn do trong cơ thể sinh vật biển chứa hàm lượng nước cao (trên 70%) và có nhiều muối khoáng.

Thành phần phi collagen trong phụ phẩm cá bao gồm lipid, khoáng, sắc tố và protein không phải là collagen. Tùy theo thành phần hóa học của từng loại nguyên liệu mà phương pháp pháp xử lý khác nhau. Dung dịch NaOH loãng, Na_2CO_3 hoặc kết hợp giữa NaOH và một số dung môi không phân cực như ethanol, ether, n-hexan thường được dùng để loại phi collagen. EDTA thường được dùng để loại bỏ chất khoáng. Việc loại bỏ này còn phụ thuộc vào sản phẩm thu nhận, chẳng hạn như collagen, gelatin hay collagen thủy phân.

Mặt khác, lipid từ sinh vật biển có nhiều axit béo không no, có nhiều liên kết đôi nên phương pháp đòi hỏi phải xử lý mẫu một cách thận trọng để giảm sự oxy hóa tới mức tối thiểu. Tuy không tan trong nước mà chỉ tan trong dung môi hữu cơ nhưng lipid tổng vẫn khó loại hết vì một số dung môi không hòa tan được các lipid phân cực (chủ yếu là phospholipid). Chính vì vậy, phương pháp loại bỏ lipid phải đáp ứng các điều kiện nhanh và hiệu quả. Những phương pháp được sử dụng thông dụng nhất là dùng cồn (butanol, etanol…) hoặc dùng kiềm, axit nhẹ (HCl loãng, axit acetic…) cũng có thể dùng nước để rửa trôi lipid thừa sau khi đã xử lý qua kiềm hoặc axit.

Hàm lượng khoáng và protein phụ khác trong da cá quá cao sẽ làm cản trở quá trình chiết xuất collagen, ảnh hưởng đến màu sắc của collagen; vì vậy, cần khử khoáng và protein để nâng cao hiệu suất trích ly và nâng cao chất lượng sản phẩm. Các phương pháp khử khoáng được sử dụng thường là dùng axit và kiềm.

1.3.2. Phương pháp loại bỏ phi collagen

Hiện nay các nghiêu cứu để tách chiết collagen hầu hết là xử lý phi collagen bằng dung dịch kiềm loãng, thông dụng nhất vẫn là NaOH.

NaOH, $Ca(OH)_2$ và Na_2CO_3 thường được sử dụng trong quá trình tiền xử lý của quá trình trích ly collagen, nhưng NaOH được sử dụng thông dụng nhất. Đặc biệt trên nguyên liệu là da, NaOH là tác nhân gây trương nở đáng kể, tạo điều kiện thuận lợi cho việc chiết xuất collagen, thể hiện qua tốc độ thấm vào các mô nhanh hơn (Liu và ctv, 2015). Mặt khác, dung dịch NaOH có khả năng khử các hợp chất nitơ phi-protein, trong khi collagen có tính lưỡng tính nên chịu được tác động của NaOH. Hầu hết các nghiên cứu hiện nay đều sử dụng dung dịch NaOH để loại bỏ lipid, khoáng

và các protein không phải là collagen cho nguyên liệu là da cá. Tuy nhiên, tùy thuộc vào thành phần hóa học và tính chất của các loại da cá khác nhau để có thể chọn nồng độ NaOH, thời gian ngâm và tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá ở các mức tỷ lệ khác nhau. Ngoài ra, đối với các loại nguyên liệu có thành phần lipid cao thì có thể kết hợp xử lý bằng NaOH với các dung môi như alcohol, n-hexan để loại bỏ chất béo (Liu và ctv, 2015; Pal và ctv, 2015; Wang và ctv, 2017).

Cụ thể, để loại bỏ thành phần phi collagen trên da cá ngừ mắt to, da cá được ngâm trong dung dịch NaOH 0,05 – 0,1N với tỷ lệ da cá/ dung dịch là 1:10 (w/v), khuấy liên tục trong 6 giờ và cứ 2 giờ thay dung dịch NaOH một lần, sau đó rửa bằng nước đến pH trung tính rồi tiếp tục ngâm trong dung dịch butyric 100 g/lít với tỷ lệ da cá/ dung dịch butyric là 1:10 (w/v) trong 18 giờ, cứ 6 giờ thay dung dịch butyric một lần (Benjakul và ctv, 2010). Đối với da của bốn loài cá olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), black rockfish (*Sebastes schlegeli*), sea bass (*Lateolabrax maculatus*), and red sea bream (*Pagrus major*) thì thành phần phi collagen được loại bỏ bằng cách ngâm vào dung dịch NaOH 0,1N trong 24 giờ, khuấy liên tục ở nhiệt độ 5 °C (Cho và ctv, 2014). Thành phần phi collagen trên da cá rô phi được loại bỏ bằng cách ngâm trong dung dịch NaOH 0,05N với tỷ lệ da cá/ dung dịch NaOH là 1:10 (w/v) trong 6 giờ (Thuanthong và ctv, 2016).

Đối với cá trắm cỏ, để loại bỏ protein không phải collagen và sắc tố thì vảy, da, bong bóng được ngâm trong 20 thể tích của NaOH 0,1M trong 36 giờ, thay dung dịch kiềm sau mỗi 12 giờ, sau đó được rửa sạch với nước cất lạnh. Vảy sẽ được khử canxi với 10 thể tích của EDTA 0,5M trong 72 giờ, thay dung dịch sau mỗi 24 giờ. Trong khi đó da và bong bóng sẽ được cho vào 20 thể tích butyl alcohol 10% (v/w) trong 24 giờ để loại bỏ chất béo, thay dung dịch mỗi 12 giờ, sau đó rửa sạch với nước cất lạnh (Liu và ctv, 2015). Theo Cho, Gu, and Kim, 2005 điều kiện tối tư để xử lý da cá ngừ vây vàng ở Hàn Quốc là NaOH 1,89%, thời gian xử lý 2,87 ngày, tỷ lệ dung dịch ngâm là 8:1 (v/w), nhiệt độ ngâm 10 °C, sau đó trích ly gelatin bằng nước ở nhiệt độ 58,15 °C. Tuy nhiên, theo Woo và ctv (2008) điều kiện tối ưu để xử lý da cá ngừ vây vàng cũng ở Hàn Quốc là NaOH 0,92 N, thời gian xử lý là 24 giờ, tỷ lệ

dung dịch ngâm là 5:1 (v/w) và nhiệt độ ngâm là 9 °C. Theo Liu, Wei và ctv (2015) thì nồng độ NaOH và nhiệt độ xử lý da cá nếu không phù hợp sẽ làm mất lượng collagen trên da cá một cách đáng kể.

Zhong Rui và ctv (2013) đã xử lý da cá thu bằng cách ngâm với NaOH 0,1 M ở tỷ lệ dung dịch kiềm/da là 10/1 (v/w) trong 2 ngày ở 4 °C, thay đổi dung dịch kiềm sau mỗi 6 giờ, khử mỡ với butylic 10% với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 (w/v) trong 2 ngày, dung môi được thay đổi sau mỗi 6 giờ, sau rửa sạch bằng nước lạnh.

Theo Phanat và ctv (2010), da cá mập được xử lý với NaOH 0,1 M để loại bỏ protein phi collagen với tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch kiềm là 1/10 (w/v). Sau đó, da được rửa bằng nước lạnh cho đến khi đạt độ pH trung tính để loại hết lipid thừa. Theo Min và ctv (2009), da của cá phổi (lungfish) được ngâm trong NaOH 0,1 M chứa 0,5% chất tẩy không ion trong 24 giờ ở 4 °C sau đó được rửa trung tính bằng nước cất. Chất béo dư được loại bỏ trong butylic 15% (v/v) với tỷ lệ mẫu/dung dịch là 1/20 (w/v) trong 24 giờ với sự thay đổi dung dịch mỗi 12 giờ. Da đã khử chất béo được rửa kỹ bằng nước cất. Để loại bỏ sắc tố hiệu quả hơn, da sau khi khử mỡ được tẩy trắng bằng dung dịch H_2O_2 3% trong 24 giờ.

Trong nghiên cứ của Jin-Wook và ctv (2008), da cá được xử lý với dung dịch kiềm (NaOH 0,5 – 1,3N), tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch là 1/5 (w/v) ở 9 °C, lắc ở 200 vòng/phút trong 12 – 36 giờ, trung hòa với HCl 6N và rửa sạch. Da cá hồng mắt to được Sitthipong Nalinanon và ctv (2007) xử lý tạp chất phi collagen bằng cách ngâm với dung dịch NaOH ở nồng độ 0,1M với tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch là 1/10 (w/v) ngâm liên tục trong 6 giờ và đổi dung dịch mỗi lần sau 2 giờ. Da được rửa đến trung tính, sau đó được loại lipid bằng rượu butyl 10% với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v) trong 18 giờ và dung môi được thay đổi sau 6 giờ.

Ahmed và Chun (2017) đã loại béo trong da cá ngừ bằng cách dùng CO_2 siêu tới hạn ở 40 °C và 250 bar trước khi chiết xuất collagen bằng pepsin. Ngoài ra, Trần Kiều Anh và ctv (2017) đã tách lipid trong phụ phẩm từ da cá hồi bằng 2 phương pháp tách bằng dung môi và bằng gia nhiệt. Kết quả cho thấy, phương pháp tách chiết bằng dung môi cho hiệu suất cao hơn 10% so với tách bằng nhiệt. Điều này có thể

giải thích do trong điều kiện nhiệt độ cao (95 °C) sẽ khiến các protein bị phá vỡ cấu trúc cuộn xoắn khiến các phân tử lipid bị mắc kẹt lại, giảm khả năng giải phóng ra ngoài.

Trên đây là một số phương pháp và điều kiện xử lý để loại bỏ phần phi collagen trên da cá. Hầu hết các nghiên cứu về tách chiết collagen, để loại bỏ phi collagen trên nguyên liệu đều sử dụng dung dịch NaOH. Mỗi loại nguyên liệu khác nhau thì điều kiện xử lý như nồng độ NaOH, tỷ lệ dung dịch NaOH/nguyên liệu (v/w) và thời gian ngâm khác nhau. Tuy nhiên, các tác giả không đưa ra tỷ lệ phần phi collagen đã loại bỏ mà chỉ chú ý đến các chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm thu được và hiệu quả thu hồi sản phẩm. Như vậy đối với mỗi loại nguyên liệu khác nhau thì cần nghiên cứu điều kiện tối ưu để loại bỏ phi collagen.

1.3.3. Các yếu tố ảnh hưởng khi loại bỏ phi collagen trên da cá bằng NaOH

1.3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH

Nồng độ NaOH ảnh hưởng rất lớn đến việc loại bỏ phi collagen. Khi nồng độ NaOH thấp thì việc loại bỏ phi collagen kém, còn khi xử lý NaOH nồng độ cao thì collagen sẽ bị phá hủy, làm ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi collagen (Liu và ctv, 2015). Vì vậy việc nghiên cứu nồng độ NaOH thích hợp để loại bỏ phi collagen nhiều nhất và hiệu suất thu hồi collagen cao nhất là cần thiết.

Phi collagen cần được loại bỏ chủ yếu là protein không phải là collagen và chất béo. Do đó hiệu suất thu hồi protein được tính bằng cách so sánh lượng protein thu được với lượng protein ban đầu trong nguyên liệu. Hàm lượng collagen được tính dựa trên hàm lượng hydroxyproline của nguyên liệu sau xử lý và sử dụng hệ số k để chuyển đổi hydroxyproline thành collagen. Hệ số chuyển đổi k được tính toán dựa trên lượng collagen cao nhất thu được sau khi xử lý NaOH. Khi đó, nguyên liệu được xử lý để đạt được tỷ lệ hydroxyproline/protein cao nhất, đồng thời hàm lượng lipid còn lại trong nguyên liệu sau khi xử lý bằng dung dịch NaOH là nhỏ nhất.

1.3.3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w)

Tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) có ảnh hưởng đến việc loại bỏ phi collagen trên da cá. Khi tăng tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá trong phạm vi nào đó thì loại bỏ phi

collagen tốt. Nếu tiếp tục tăng tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá thì hiệu quả loại bỏ phi collagen sẽ không tăng thậm chí làm cho hiệu suất thu hồi collagen giảm. Một số nghiên cứu đã sử dụng tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá trong khoảng 5:1 đến 8:1(Woo và ctv, 2008; Cho và ctv, 2005). Việc nghiên cứu và xác định tỷ lệ này là cần thiết để đạt hiệu quả trích ly collagen tốt nhất.

1.3.3.3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH

Khi tăng thời gian xử lý NaOH thì khả năng loại bỏ phi collagen tăng. Nhưng nếu tăng thời gian xử lý đến một giới hạn nào đó thì khả năng loại bỏ phi collagen không thay đổi. Điều này có thể giải thích rằng với một nồng độ NaOH và tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) cố định thì hàm lượng chất tan ra trong dung dịch sẽ đạt đến một nồng độ nhất định thì quá trình sẽ chậm lại cho đến khi kết thúc. Theo Woo và ctv (2008) thì thời gian xử lý phi collagen là 24 giờ nhưng nhiệt độ ngâm là 9 °C. Trong một nghiên cứu khác thời gian xử lý phi collagen trên da cá ngừ vây vàng là 2,87 ngày, tương đương với 68,88 giờ ở nhiệt độ là 10 °C và nồng độ NaOH 1,89% (Cho và ctv, 2005). Như vậy thời gian xử lý còn phụ thuộc vào nhiệt độ xử lý và nồng độ NaOH. Hầu hết các nghiên cứu tách chiết collagen đều thực hiện việc xử lý NaOH ở nhiệt độ không quá 10 °C để bảo toàn tính chất của collagen.

Như vậy, mặc dù đã có khá nhiều nghiên cứu liên quan đến việc loại bỏ phi collagen bằng phương pháp xử lý NaOH, tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào đưa ra tỷ lệ phi collagen đã được loại bỏ khi xử lý bằng NaOH.

1.3.4. Thủy phân collagen

Khi collagen hoặc gelatin bị thủy phân bởi enzyme tạo thành các peptide có khối lượng phân tử nhỏ hơn 20 kDa thì hỗn hợp thu được gọi là collagen thủy phân (collagen hydrolysate: CH) (Djagny và ctv, 2001; Zague, 2008; Boonmaleerat và ctv, 2017). Tùy thuộc vào loại enzyme mà sản phẩm có mức độ thủy phân khác nhau. Việc tách chiết các phân đoạn sẽ tạo ra các sản phẩm collagen thủy phân khác nhau.

Protease là enzyme thủy phân liên kết peptide của phân tử protein. Enzyme protease gồm hai loại: endoprotease và exoprotease. Các endoprotease như trypsin, chymotrypsin, chymosin thủy phân các liên kết peptide ở bên trong chuỗi

polypeptide. Các exoprotease cắt các liên kết ở hai đầu tận cùng của chuỗi polypeptide, các exoprotease cắt vào đầu có nhóm carboxyl tận cùng được gọi là carboxylpeptidase còn những enzyme tác dụng vào đầu có nhóm amin tận cùng gọi là aminopeptidases. Các endoprotease và exoprotease kết hợp với nhau tạo hiệu quả cao trong việc phân giải protein. Có thể nói rằng, chức năng chính của endoprotease là tạo ra một lượng lớn các chuỗi peptide có đầu C và đầu N tự do để tạo điều kiện cho các exoprotease hoạt động.

Tuy nhiên, tác dụng của các protease rất phức tạp, bản chất của các mạch nhánh của axit amin có ảnh hưởng mạnh đến hoạt động của các enzyme. Trên thực tế, các protease rất đặc hiệu và tỷ lệ những liên kết peptide trong một phân tử protein bị bẻ gãy bởi một protease là không cao. Ví dụ, trypsin chỉ thủy phân liên kết peptide giữa lysine và argininine; chymotrypsin chỉ thủy phân những liên kết peptide giữa tyrosine, phenylalanine, tryptophan. Thậm chí chymosin chỉ thủy phân liên kết peptide giữa Phe105-Met106 của kappa-casein (Rawlings và Barrett, 2013).

Hiện nay, trên thị trường có rất nhiều loại protease như pepsin, flavourzyme, alcalase, neutrase và protamex. Mỗi loại enzyme có tính đặc hiệu và thủy phân các liên kết peptide khác nhau. Do đó đối với cùng một cơ chất thì mỗi enzyme sẽ tác động khác nhau, tạo ra các sản phẩm có độ thủy phân khác nhau. Khi độ thủy phân càng cao thì các peptide thu được có khối lượng phân tử càng nhỏ và khả năng hòa tan tăng. Một số enzyme thường dùng để tách chiết collagen từ da cá ngừ vây vàng bao gồm pepsin, flavourzyme, alcalase. Độ thủy phân của một số enzyme protease được trình bày trong Bảng 1.2.

Bảng 1.2. So sánh độ thủy phân collagen của các enzyme

Enzyme	Độ thủy phân (DH) (%)	Nguồn nguyên liệu	Nguồn
Pepsin	18,39	Phụ phẩm cá ngừ sọc dưa (Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*)	(Qiu và ctv, 2019)
Papain	15,39		
Trypsin	19,64		
Neutrase	21,67		
Alcalase	25,35		
Flavourzyme	25	Protein cá rô phi	(Raghavan & Kristinsson, 2009)
Protamex	22,5	Đuôi cá ngừ vây vàng	(Nguyen và ctv, 2011)

Pepsin là một trong ba protease chính trong hệ thống tiêu hóa của con người và nhiều động vật khác, hai loại còn lại là chymotrypsin và trypsin. Trong quá trình tiêu hóa, các enzyme này, mỗi enzyme chuyên cắt đứt liên kết giữa các loại axit amin cụ thể để tạo thành các peptide nhỏ và axit amin, có thể dễ dàng hấp thụ bởi ruột non. Enzyme pepsin được sản xuất từ dạ dày của động vật hoặc từ vi sinh vật. Là một endopeptidase thuộc nhóm aspartic protease, pepsin cho hiệu quả cao trong việc phân cắt các liên kết peptide nội mạch giữa các axit amin kỵ nước và tốt nhất là các axit amin thơm như phenylalanine, tryptophan và tyrosine. Pepsin hoạt động tốt nhất ở nhiệt độ từ 37 – 42 °C và pH 1,5 – 2,0 (Rawlings và Barrett, 2013)

Flavourzyme là một phức hợp protease/peptidase của nấm được tạo ra bởi quá trình lên men chìm của một chủng *Aspergillus oryzae* đã được biến đổi gen và nó có chứa cả hoạt động của endoprotease và exopeptidase. Độ pH tối ưu cho phức hợp enzyme nằm trong khoảng 5,0 – 7,0. Nhiệt độ tối ưu cho enzyme là khoảng 50 °C.

Alcalase là protease của *Bacillus licheniformis* với hoạt tính endopeptidase. Alcalase là enzyme thương mại thuộc nhóm serine protease subtilisin A. Hoạt tính của Alcalase 2,5L là 2,5 AU/g, bị ức chế ở pH thấp hoặc nhiệt độ cao, điều kiện hoạt động tốt nhất của Alcalase là pH = 6,5 – 8,5; nhiệt độ 45 – 65 °C (Ng và Mohd Khan, 2012). Alcalase đã được chứng minh là một trong những enzyme tốt nhất được nhiều nhà nghiên cứu dùng để chế biến thủy phân protein cá (Bhaskar và ctv, 2008).

Enzyme này thủy phân protein tạo các axit amin kỵ nước vào giai đoạn cuối, dẫn đến sản phẩm thủy phân không có vị đắng, đồng thời sản phẩm có sự cân bằng về các axit amin thiết yếu (Kristinsson và Rasco, 2000). Alcalase còn được ưa chuộng và được sử dụng rộng rãi do đây là enzyme có nguồn gốc từ vi khuẩn, có khả năng xúc tác mạnh, ổn định với pH và nhiệt độ (Diniz và Martin, 1997). Các báo cáo trước đây cho thấy sản phẩm thủy phân bằng alcalase ít đắng so với papain. Alcalase cũng được là lựa chọn tốt nhất cho thủy phân protein dựa trên chi phí enzyme trên mỗi đơn vị hoạt động (Kristinsson và Rasco, 2000).

Trong những năm gần đây, một số nhà khoa học đã nghiên cứu việc sử dụng enzyme để thủy phân collagen từ da cá (Nikoo và ctv, 2015; Chen và ctv, 2017; Hema và ctv, 2017; Wu và ctv, 2018). Đối với da cá hồi, Wu và ctv (2018) đã sử dụng enzyme từ *Vibrio* sp. SQS2-3 với tỷ lệ E/S = 1:10 (v/w), pH 4, nhiệt độ thủy phân là 45 °C, thời gian thủy phân là 150 phút để độ thủy phân đạt cực đại; dịch thủy phân thu được tách thành 2 phân đoạn, UF1 > 3kDa và UF2 < 3kDa. Khi thủy phân da cá hồi bằng enzyme serine collagenolytic protease từ vi khuẩn *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 với hoạt độ 10434 U/mg, pH 8, nhiệt độ 40 °C, tỷ lệ E/S = 1/10 (v/w), thời gian thủy phân 1 giờ thì thu được trên 95% các peptide có khối lượng phân tử nhỏ hơn 3 kDa (Chen và ctv, 2017). Đối với da cá *Epinephelus malabaricus*, với 3 loại enzyme khác nhau là pepsin, papain và protease ở điều kiện tối ưu cho mỗi enzyme thì độ thủy phân cực đại đối với mỗi enzyme là khác nhau. Độ thủy phân của pepsin, papain và protease lần lượt là 10%, 20% và 28% (Hema và ctv, 2017). Độ thủy phân càng cao thì các phân đoạn peptide trong dịch thủy phân càng nhỏ và khả năng hòa tan của sản phẩm thu được càng tốt. Da cá *Acipenser schrenckii* đã được thủy phân bằng enzyme Alcalase (Sigma, USA) với tỷ lệ Alcalase/cơ chất 1:20 (w/w) ở 50 °C, pH 8 trong 3 giờ; trong khi đó flavourzyme (Sigma, USA) hoạt động tốt ở tỷ lệ flavourzyme /cơ chất 1:20 (w/w), ở 50 °C, pH 7 trong 3 giờ và peptide thu được có phân tử lượng hầu hết ở vùng từ 500 đến 2500 Da (Nikoo và ctv, 2015).

Như vậy quá trình thủy phân collagen hoặc gelatin từ da cá bằng các loại enzyme có độ thủy phân khác nhau sẽ cho các peptide có khối lượng phân tử khác

nhau. Với mục đích tạo ra các peptide collagen có khối lượng phân tử nhỏ có hoạt tính sinh học cao, các enzyme có độ thủy phân cao đã được chọn để khảo sát trong nghiên cứu này.

1.3.5. Tinh sạch collagen và phân đoạn thủy phân

Nguyên liệu collagen trước khi thủy phân đã được xử lý để loại bỏ phần phi collagen như lipid, khoáng, protein không phải là collagen và sắc tố. Tuy nhiên một số lipid và chất khoáng ở dạng liên kết vẫn còn tồn tại và trở thành tạp chất trong dịch thủy phân và cần phải được tiếp tục loại bỏ. Ngoài ra, dịch thủy phân chứa rất nhiều peptide có khối lượng phân tử khác nhau. Những peptide có phân tử lượng nằm trong một khoảng nhất định được gọi là một phân đoạn peptide; mỗi phân đoạn có những tính chất khác nhau nên cần phải tinh sạch và phân tách các phân đoạn đó để từ đó đề ra những hướng ứng dụng cụ thể (Chi và ctv, 2014).

Tinh sạch và phân đoạn peptide nói chung dựa trên sự khác biệt về các đặc trưng của peptide như tính tan, độ tích điện, hình dạng, kích thước,… Peptide thường được tinh sạch và phân đoạn bằng các phương pháp như sắc ký, kết tủa, siêu lọc….

1.3.5.1. Phương pháp sắc ký

a. Phương pháp sắc ký ngược pha (RPC)

Phương pháp này dùng để phân tách peptide dựa trên tính kỵ nước của chúng. Kỹ thuật này có tính chọn lọc cao. Một số peptide bị biến tính bởi dung môi và sẽ mất chức năng khi sử dụng RPC. Do đó phương pháp này không được khuyến nghị cho tất cả các ứng dụng, đặc biệt là khi phân tách peptide mà cần giữ hoạt tính của nó.

b. Phương pháp sắc ký trao đổi ion

Phương pháp này phân tách peptide dựa trên điện tích. Cột có thể được thiết kế để trao đổi anion hoặc cation. Các cột trao đổi anion chứa một pha tĩnh với điện tích dương để hấp thụ các protein mang điện tích âm. Các cột trao đổi cation thì ngược lại. Việc thu hồi peptide đích được thực hiện bằng cách thay đổi lực ion trong cột. Phương pháp này không thể phân đoạn được peptide theo khối lượng phân tử.

c. Phương pháp sắc ký lọc gel

Phương pháp này dùng để tách peptide có khối lượng phân tử lớn ra khỏi các peptide có khối lượng phân tử nhỏ do các phân tử lớn di chuyển qua polymer liên kết ngang trong cột sắc ký nhanh hơn. Các peptide lớn không vừa với các lỗ của polymer trong khi các peptide nhỏ hơn thì mất nhiều thời gian để đi qua cột sắc ký. Sắc ký lọc gel là công cụ hữu ích để cô đặc mẫu protein và peptide cũng như làm sạch và phân đoạn peptide.

Ngoài ra có thể sử dụng sắc ký lọc gel để phân tách các phân đoạn collagen thủy phân để nghiên cứu tính chất của các phân đoạn peptide. Dịch thủy phân collagen từ da cá thu Tây Ban Nha đã được phân tách qua sắc ký lọc gel trên cột Sephadex G-100 và thu được 7 phân đoạn với khối lượng phân tử trung bình là 47,82 kDa; 28,77 kDa; 26,70 kDa; 21,03 kDa; 19,82 kDa; 14,39 kDa; 5,04 kDa (Chi và ctv, 2014). Tuy nhiên, các phương pháp sắc ký chủ yếu sử dụng để tinh sạch và phân đoạn các peptide với số lượng nhỏ sau khi sử dụng các phương pháp tinh sạch khác như kết tủa, lọc và ly tâm.

1.3.5.2. Phương pháp điện di SDS-PAGE

Phương pháp điện di trên gel polyacrylamide, được thực hiện với sự có mặt của SDS (sodium dodecyl sulfate) làm cho tất cả các peptide tích điện âm. Vì tích điện của các peptide khá đồng nhất nên phương pháp này phân tách các peptide dựa trên kích thước. SDS-PAGE thường được sử dụng để kiểm tra độ tinh khiết của protein và peptide sau khi phân tách và làm sạch.

1.3.5.3. Phương pháp kết tủa

Tác nhân để kết tủa protein và peptide thường sử dụng muối vô cơ, dung môi hữu cơ hoặc thay đổi pH.

Khi tăng nồng độ muối vô cơ, độ hòa tan protein thường giảm, dẫn đến kết tủa. Quá trình này được gọi là loại bỏ muối (Green & Hughes, 1955). Muối làm giảm độ hòa tan của protein cũng có xu hướng tăng cường sự ổn định của cấu trúc tự nhiên. Cơ chế khử muối khỏi lớp nước liên kết chặt chẽ với bề mặt của protein (lớp hydrat hóa). Lớp hydrat hóa, thường là 0,3 đến 0,4 g nước cho mỗi gram protein (Rupley,

Gratton, & Careri, 1983). Nó đóng một vai trò quan trọng trong việc duy trì độ hòa tan và cấu trúc tự nhiên của protein và peptide. Có ba tương tác protein-nước chính: hydrat hóa ion các nhóm chức chưa tham gia liên kết của chuỗi protein (ví dụ: Asp, Lys), liên kết hydro giữa các nhóm OH và nước (ví dụ: Ser, Thr, Tyr) và các nhóm kỵ nước (Val, Ile, Leu, Phe). Để khử muối phân tử protein phải dehydrat hóa làm thay đổi cấu trúc và các nhóm kỵ nước bề mặt tăng lên còn các nhóm chức ưa nước ở bề mặt giảm. Khi thêm muối vào dung dịch, sức căng bề mặt của nước tăng lên, dẫn đến tăng tương tác kỵ nước giữa protein và nước. Protein phản ứng với tình huống này bằng cách giảm diện tích bề mặt của nó trong nỗ lực giảm thiểu tiếp xúc với dung môi, được biểu hiện bằng cách gấp lại (cấu trúc gấp gọn hơn so với khi mở ra) và sau đó tự liên kết dẫn đến kết tủa. Những muối vô cơ có độ hòa tan tốt và làm tăng sức căng bề mặt của nước càng cao thì làm cho protein kết tủa càng nhiều (Wingfield, 2016).

Khi thêm dung môi hữu cơ vào dung dịch protein hoặc peptide sẽ làm thay đổi hằng số điện môi của nước và làm giảm tính hòa tan của protein hoặc peptide. Mặt khác khi cho các dung môi hữu cơ có tính ưa nước như cồn, etylenglycol làm cho protein bị mất nước và giảm độ hòa tan. Như vậy khi cho dung môi hữu cơ vào dung dịch protein hoặc peptide sẽ làm cho nó bị kết tủa (Green & Hughes, 1955)

Khi thêm axit hoặc kiềm vào dung dịch protein có thể làm cho protein tích điện dương hoặc tích điện âm hoặc trung hòa về điện. Khi protein hoặc peptide trung hòa về điện thì khả năng hòa tan trong nước giảm làm cho protein hoặc peptide bị kết tủa (Green & Hughes, 1955).

Để tinh sạch collagen thủy phân từ da cá, thông thường dịch thủy phân được lọc để loại bỏ phần chất béo rồi kết tủa bằng dung dịch NaCl (0,8 M – 2,6 M). Kết tủa được tách bằng cách ly tâm tốc độ cao (9,000 – 20,000 vòng/phút) trong 30 – 60 phút rồi hòa tan trong axit acetic 0,5 M, thẩm tích bằng túi cellophane, sau đó sấy đông khô (Benjakul và ctv, 2010; Adibzadeh và ctv, 2014).

Phương pháp tinh sạch protein và peptide bằng phương pháp kết tủa rất hiệu quả đối với protein hoặc peptide có khối lượng phân tử lớn. Phương pháp này đơn

giản, dễ thực hiện sản xuất với số lượng lớn. Tuy nhiên, đối với các peptide trong collagen thủy phân có khối lượng phân tử dưới 20 kDa thì phương pháp kết tủa để tách các peptide này gặp khó khăn.

1.3.5.4. Phương pháp lọc

Tùy thuộc vào mức độ thủy phân mà các peptide collagen thu được có khối lượng phân tử khác nhau, do đó việc kết tủa rất phức tạp, đòi hỏi các kỹ thuật hiện đại và tiên tiến hơn như sử dụng màng siêu lọc.

Sử dụng màng siêu lọc là một kỹ thuật tiên tiến được áp dụng trong nhiều lĩnh vực, trong đó có tinh sạch và phân đoạn các peptide. Một số ứng dụng của lọc màng siêu lọc được mô tả trong Bảng 1.3.

Bảng 1.3. Một số ứng dụng của màng siêu lọc (UF)

STT	Lĩnh vực áp dụng	Nội dung
1	Thu nhận tế bào	Tách các tế bào từ môi trường lên men. Thu nhận tế bào ở dòng hồi lưu (retentate).
2	Phân loại tế bào	Tách các thành phần trong tế bào thông qua dòng thẩm thấu (permeate).
3	Phân đoạn sản phẩm	Tách các thành phần trên cơ sở kích thước phân tử.
4	Cô đặc sản phẩm	Cô đặc dung dịch sản phẩm bằng cách loại dung môi và các phân tử nhỏ. Dòng thu sản phẩm là dòng hồi lưu (retentate).

Nguồn: GE Health care

Dựa vào kích thước lỗ lọc mà màng được phân chia thành 2 loại vi lọc (Microfiltration filters: MF) và siêu lọc (Ultrafiltration filters: UF).

Đối với màng MF, kích thước lỗ lọc phổ biến trong phạm vi 0,1µm đến 1µm. Những màng này được sử dụng để tách các tế bào nuôi cấy khỏi môi trường tăng trưởng (nước dùng), cũng như để loại bỏ vật liệu hạt kích thước lớn trong quá trình sản xuất dược phẩm sinh học.

Đối với màng UF kích thước lỗ lọc phổ biến trong phạm vi 1 nm đến 100 nm. Màng này thường được đặc trưng về trọng lượng phân tử cắt (NMWC), là trọng lượng

phân tử của protein hình cầu lớn nhất có thể đi qua màng. Giá trị NMWC nằm trong khoảng từ 1 đến 100 kD (kiloDalton). Những bộ lọc này được sử dụng để cô đặc và phân đoạn protein, tăng nồng độ virus, khử muối và trao đổi bộ đệm.

Hiện nay, do nhu cầu rất lớn về nguồn collagen thủy phân từ collagen loại I chất lượng cao sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm, dinh dưỡng, mỹ phẩm và dược phẩm nên rất cần các kỹ thuật tách chiết collagen nhanh, hiệu quả và chất lượng.

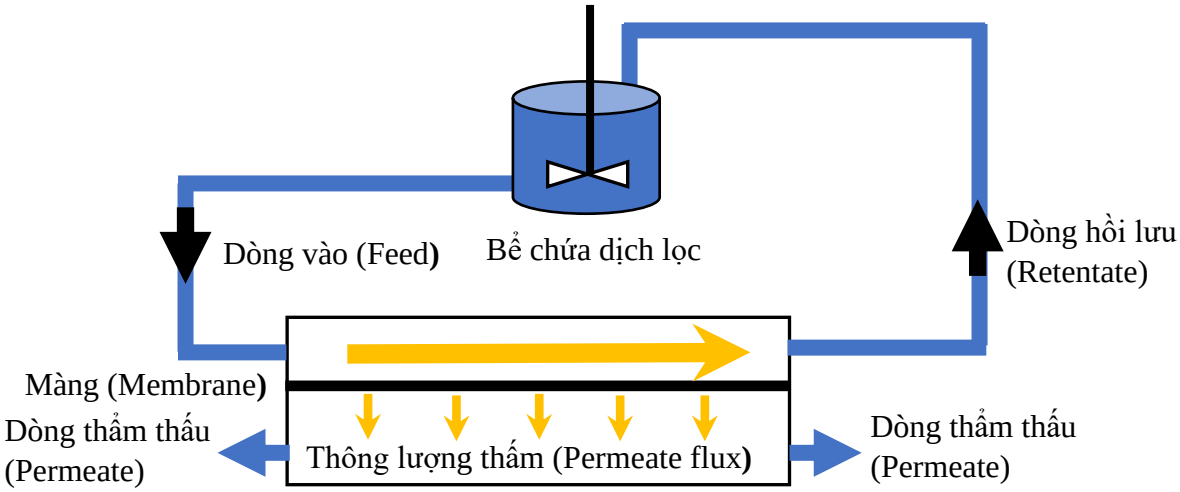
Một nghiên cứu tách chiết nhanh collagen thủy phân từ vảy cá trống đỏ (*Sciaenops ocellatus*) đã sử dụng màng siêu lọc (ultrafiltration) là hydrophilic polyethersulfone (UP150, Xiamen, Trung Quốc) có kích thước lỗ rỗng 0,1 µm. Dịch collagen hòa tan trong pepsin được bơm vào màng mỏng FlowMem-0015 (28 x 28 x 32 cm, Xiamen, Trung Quốc) với diện tích lọc hữu dụng 0,015 m^2 trong sắc ký lỏng YC-2 (Beijing Boyikang Laboratory Instruments, Trung Quốc) có thể lọc được 45 lít dịch lọc trong 3 giờ và thu được 3 lít sản phẩm thuộc dòng trên màng (retentate) với khối lượng phân tử trung bình lớn hơn 300 kDa. Với điều kiện lọc ở 4 °C và áp suất 300 kPa, pH 2, nồng độ collagen 4,32% so với trọng lượng chất khô (Chen và ctv, 2016).

Để tách chiết các phân đoạn peptide trong dịch thủy phân bằng màng siêu lọc ultrafilation có NMWC khác nhau cần chú ý điều kiện pH, nhiệt độ, nồng độ protein, áp suất,… các điều kiện này thường được ghi trên catalog của các loại màng lọc để đạt được hiệu quả lọc và tránh tắt nghẽn màng lọc (Fallis, 2013). Vì vậy để tinh sạch và phân đoạn collagen thủy phân cần xác định trọng lượng phân tử của các phân đoạn collagen thủy phân có trong dịch thủy phân và mục đích cần thu nhận phân đoạn collagen nào trong hỗn hợp này để chọn màng siêu lọc ultrafiltration có giá trị NMWC tương ứng.

Về phương pháp lọc, màng siêu lọc thường được sử dụng kết hợp với phương pháp ly tâm lạnh để dẩy nhanh tốc độ lọc mà vẫn giữ được hoạt tính sinh học của collagen thủy phân. Tuy nhiên, phương pháp chỉ phù hợp với quy mô nhỏ. Trong công nghiệp, Công nghệ lọc tiếp tuyến qua màng thường được sử dụng phổ biến.

a. Giới thiệu về công nghệ lọc màng

Lọc dòng chảy ngang qua (Cross flow filtration - CFF, còn được gọi là lọc dòng tiếp tuyến tangential flow filtration - TFF) là một kỹ thuật lọc trong đó dung dịch ban đầu đi qua tiếp tuyến dọc theo bề mặt của bộ lọc. Chênh lệch áp suất trên bộ lọc làm cho các cấu tử nhỏ hơn lỗ lọc thông qua bộ lọc. Các cấu tử lớn hơn lỗ lọc được giữ lại và đi dọc theo bề mặt màng, chảy trở lại bể chứa (Hình 1.4)



Nguồn: GE Health care

Hình 1.4. Nguyên tắc lọc tiếp tuyến

Dung dịch được hướng đến bề mặt màng được gọi là dòng vào. Dung dịch đi dọc theo bề mặt màng và trở lại bể chứa là dòng hồi lưu (Retentate). Dung dịch này thường được bơm trở lại bể chứa và tuần hoàn. Dung dịch đi qua màng được gọi là dòng thẩm thấu (permeate). Một tính năng quan trọng của CFF là dòng chất lỏng chảy dọc theo bề mặt màng giúp quét sạch sự tích tụ vật liệu trên bề mặt bộ lọc và giảm sự tắc nghẽn của bộ lọc. Ngoài ra, dòng hồi lưu có thể dễ dàng được tuần hoàn, cho phép xử lý triệt để cấu tử thì cần phải lọc.

Trong các ứng dụng của CFF, kích thước lỗ thông thường trong khoảng 0,1 đến 1 µm. Các màng này được sử dụng để tách các tế bào nuôi cấy khỏi môi trường phát triển (dịch lên men) như để loại bỏ vật liệu hạt trong nhiều quá trình dược phẩm sinh học.

b. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lọc màng

- **Ảnh hưởng của nồng độ cấu tử hòa tan trong dịch lọc ban đầu**

Nồng độ của cấu tử hòa tan trong dịch lọc ban đầu có ảnh hưởng đến thông lượng qua màng và độ phân riêng trong quá trình lọc màng. Theo Shishegaran và ctv, (2020), khi tăng nồng độ của dòng nhập liệu làm gia tăng sự hình thành micelle làm cản trở quá trình thẩm thấu của các cấu tử do đó làm giảm thông lượng và độ phân riêng của màng. Đồng thời, khi nồng độ các cấu tử hòa tan tăng làm tăng độ nhớt của dịch lọc, từ đó cũng làm giảm thông lượng qua màng.

- **Ảnh hưởng của nhiệt độ lọc**

Nhiệt độ ảnh hưởng đến độ nhớt và sự hình thành micelle của dịch lọc. Khi nhiệt độ tăng thì độ nhớt giảm và thông lượng qua màng tăng. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng cao thì sự hình thành micelle tăng làm tăng độ phân riêng của màng (Shishegaran và ctv, 2020) đồng thời làm protein bị biến tính làm mất các hoạt tính sinh học của nó. Vì vậy cần nghiên cứu nhiệt độ lọc phù hợp với khả năng chịu nhiệt của màng và đảm bảo tính chất của collagen thủy phân, thông thường nhiệt độ lọc màng được chọn từ 5 °C đến 35 °C.

- **Ảnh hưởng của áp suất**

Trong hầu hết các ứng dụng, chế độ vận hành lọc tiếp tuyến đã được áp dụng để việc đưa vật liệu mong muốn vào thẩm thấu không bị tắt nghẽn bởi sự tích tụ liên tục của vật liệu ở bề mặt màng. Áp suất lọc tạo dòng chảy tiếp tuyến cung cấp một động lực nhằm hạn chế sự tích tụ của các cấu tử không thẩm thấu được ở bề mặt màng và do đó thông lượng thấm được duy trì ở mức ổn định. Đối với phương pháp lọc truyền thống, dòng chảy qua màng là trực giao. Các hạt không qua được màng lọc sẽ tích tụ tạo thành một lớp lắng (thường được gọi là lớp cặn) trên bề mặt màng. Độ dày của lớp cặn này tăng theo thời gian và dẫn đến thông lượng giảm, giả sử hoạt động ở áp suất không đổi. Do đó, thông lượng sẽ tiệm cận về không. Ngược lại, ở chế độ lọc tiếp tuyến, dòng cấp liệu song song với bề mặt màng và các cấu tử không thẩm thấu qua màng được loại bỏ liên tục. Vì vậy độ dày cặn này bị giới hạn bởi sự cân bằng

giữa vật liệu đến và vật liệu bị loại bỏ (retentate). Do đó, thông lượng qua màng có xu hướng tới một giá trị khác không hữu hạn (Field & Lipnizki, 2017).

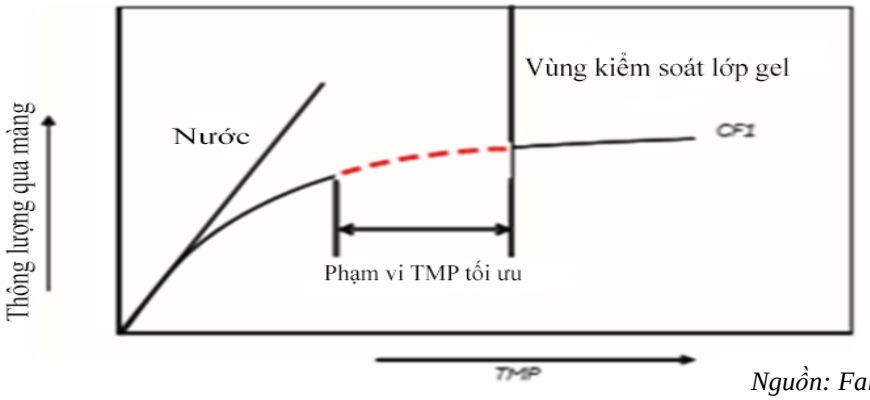
Trong quá trình lọc tiếp tuyến qua màng điều khiển áp lực, lực truyền động dĩ nhiên là áp suất, hay nói chính xác hơn là chênh lệch áp suất giữa phía thượng nguồn và hạ lưu của màng; có nghĩa là, để nói giữa dòng cấp liệu và thẩm thấu. Sự chênh lệch áp suất này được gọi là áp suất xuyên màng (TMP: transmembrane pressure). Áp suất xuyên màng được tính theo công thức sau:

$$\mathrm{TMP} = \frac{(\mathrm{P_F} - \mathrm{P_P})_{\mathrm{in}} + (\mathrm{P_F} - \mathrm{P_P})_{\mathrm{out}}}{2}$$

Trong đó: P_F là áp suất dòng nhập liệu

P_p là áp suất của dòng sản phẩm (permeate)

Trong lọc tiếp tuyến thông số lưu lượng dòng cấp liệu tối ưu chính là chức năng của TMP. Nếu TMP thấp thì thông lượng qua màng thấp, khi tăng TMP thì thông lượng qua màng tăng nhưng đến một giới hạn nào đó sẽ hình thành một lớp gel trên bề mặt màng dẫn đến thông lượng qua màng giảm phạm vi của TMP tối ưu và hiệu quả ở vùng trước khi tạo gel trên bề mặt màng (Hình 1.5) (Fallis, 2013).



Nguồn: Fallis, 2013

Hình 1.5. Phạm vi tối ưu của áp suất xuyên màng

Vì vậy cần nghiên cứu để tìm giá trị TMP tốt nhất cho quá trình lọc màng để có thông lượng qua màng và độ phân riêng cao nhất. Khi lọc màng UF 10 kDa với các peptide của albumin nồng độ 12% thì TMP trong phạm vi từ 30 – 50 psi. Còn khi dùng màng UF 30 kDa hoặc 50 kDa để lọc immunoglobulins với nồng độ 7 – 8% thì TMP trong phạm vi từ 20 – 40 psi (Pabby và ctv, 2015). Mỗi loại màng thì TMP được

nhà sản xuất khuyến cáo. Đối với màng lọc UFP-1-C-6 của GE (Mỹ) với chất liệu là polysulfone thì áp suất dòng vào tối đa là 20 psi và TMP tối đa cũng là 20 psi. Áp suất vận hành chỉ đến 15 psi.

- **Ảnh hưởng của pH**

pH là một trong những thông số ảnh hưởng đến khả năng tích điện, cấu trúc và hình dạng của các peptide. Do đó khi lọc màng nó ảnh hưởng đến thông lượng qua màng và độ phân riêng của màng. Khi ở pH đẳng điện thì peptide bị kết tủa và khả năng thẩm thấu qua màng giảm làm giảm thông lượng qua màng. Còn pH lớn hơn hay nhỏ hơi pH đẳng điện thì các peptide sẽ tích điện và thay đổi khả năng thẩm thấu qua màng làm ảnh hưởng đến thông lượng qua màng (Fane và ctv, 1983; Burns & Zydney, 1999). Do dung dịch collagen thủy phân có nhiều phân đoạn peptide khác nhau nên việc xác định pH đẳng điện là gặp nhiều khó khăn. Vì vậy cần khảo sát pH của dịch thủy phân để tăng hiệu quả thu hồi sản phẩm.

- **Ảnh hưởng của lưu lượng dòng nhập liệu**

Trong lọc tiếp tuyến thông số lưu lượng dòng cấp liệu liên quan mật thiết với TMP. Nếu lưu lượng dòng nhập liệu tăng thì TMP tăng và thông lượng qua màng tăng. Khi TMP được cố định và tăng lưu lượng dòng nhập liệu làm tăng vận tốc chuyển động của dịch lọc trên bề mặt màng, làm tăng thông lượng qua màng nhưng chỉ đến một giới hạn nhất định. Đó là do khi tăng tốc độ dòng nhập liệu quá lớn sẽ làm cho các phân tử chất tan trượt tiếp tuyến theo bề mặt màng mà khả năng thấm qua màng bị giảm làm giảm thông lượng qua màng (Fallis, 2013).

1.3.6. Tiêu chuẩn chất lượng của collagen thủy phân

Một số tiêu chuẩn chất lượng của collagen thủy phân từ cá của một vài hãng sản xuất đã được chứng nhận bởi Kosher và Halal để ứng dụng trong thực phẩm, mỹ phẩm, đồ uống và dược phẩm được trình bày trong Bảng 1.4 và Bảng 1.5. Điều này cho thấy sản phẩm collagen thủy phân đáp ứng được nhu cầu sử dụng cho hầu hết các đối tượng người tiêu dùng.

Bảng 1.4. Một số tiêu chuẩn chất lượng của collagen thủy phân

STT	Chỉ tiêu	Yêu cầu
1	Trạng thái	Dạng bột màu trắng đến hơi vàng
2	Mùi	Không mùi
3	Độ hòa tan	> 99,9%
4	Hàm lượng protein	> 90%
5	pH	5,0 – 6,5
6	Độ ẩm	< 8%
7	Hàm lượng tro	2,0% Max
8	Hàm lượng asen	1 ppm Max
9	Phân tử lượng trung bình	500 to 3000 Da
10	Tổng số coliforms	< 1000 CFU/gram
11	*Salmonella*	Âm tính/25 gram
12	*Escherichia coli*	Âm tính/10 gram

Nguồn: Nutra Food Ingredients, 2018

Collagen thủy phân từ cá thường có hàm lượng protein cao (> 90%), hòa tan rất tốt trong nước không mùi, không vị. Nó có thể được ứng dụng trong thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm và đáp ứng được các yêu cầu Mỹ và tiêu chuẩn của dược phẩm Châu Âu, Nhật Bản (Bảng 1.5).

Bảng 1.5. Tiêu chuẩn chất lượng của Norland hydrolyzed fish collagen

STT	Chỉ tiêu	Yêu cầu
1	Trạng thái	Dạng bột màu trắng đến hơi vàng
2	Mùi	Không mùi
3	Màu khi hòa tan	Màu sáng (light Amber)
4	pH dung dịch 10%	5,0 – 6,5
5	Hàm lượng protein	> 91%
6	Độ ẩm	< 8%
7	Độ nhớt của dung dịch 10% ở 30$^{\circ C}$	< 50 mps
8	Hàm lượng tro	2,0% max
9	Kim loại nặng	< 10 ppm
10	Hàm lượng asen	< 0,8 ppm
11	Crom	< 10 ppm
12	Chì	< 1,5 ppm
13	SO_2	< 50 ppm
14	H_2O_2	0%
15	TPC	< 1000 CFU/gram
16	*Enterobacteria*	< 10 CFU/gram
17	*Salmonella*	Âm tính/25 gram
18	*Escherichia coli*	Âm tính/10 gram
19	*Pseudomonas aeruginosa*	Âm tính/10 gram
20	*Staphilococcus aureus*	Âm tính/1gram
21	Nấm men và nấm mốc	100/gram Max

Nguồn: Norland Products Inc., 2018

Chương 2
VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

2.1.1. Thời gian

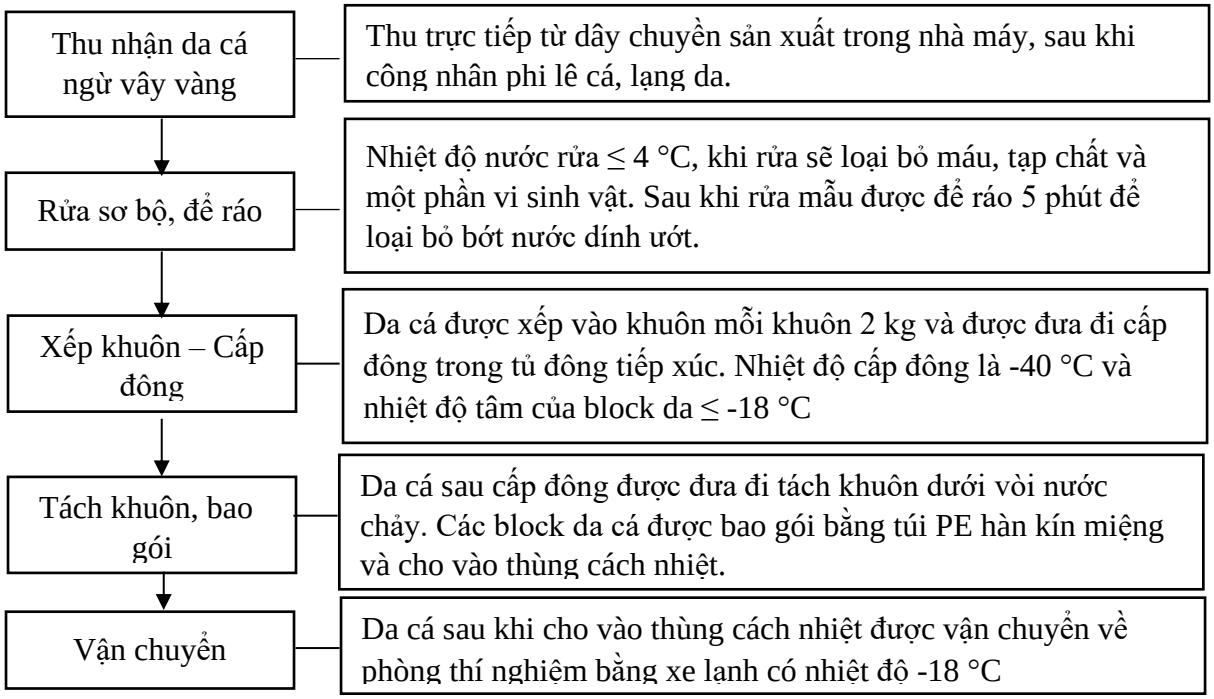
Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 6/2017 đến 12/2020

2.1.2. Địa điểm

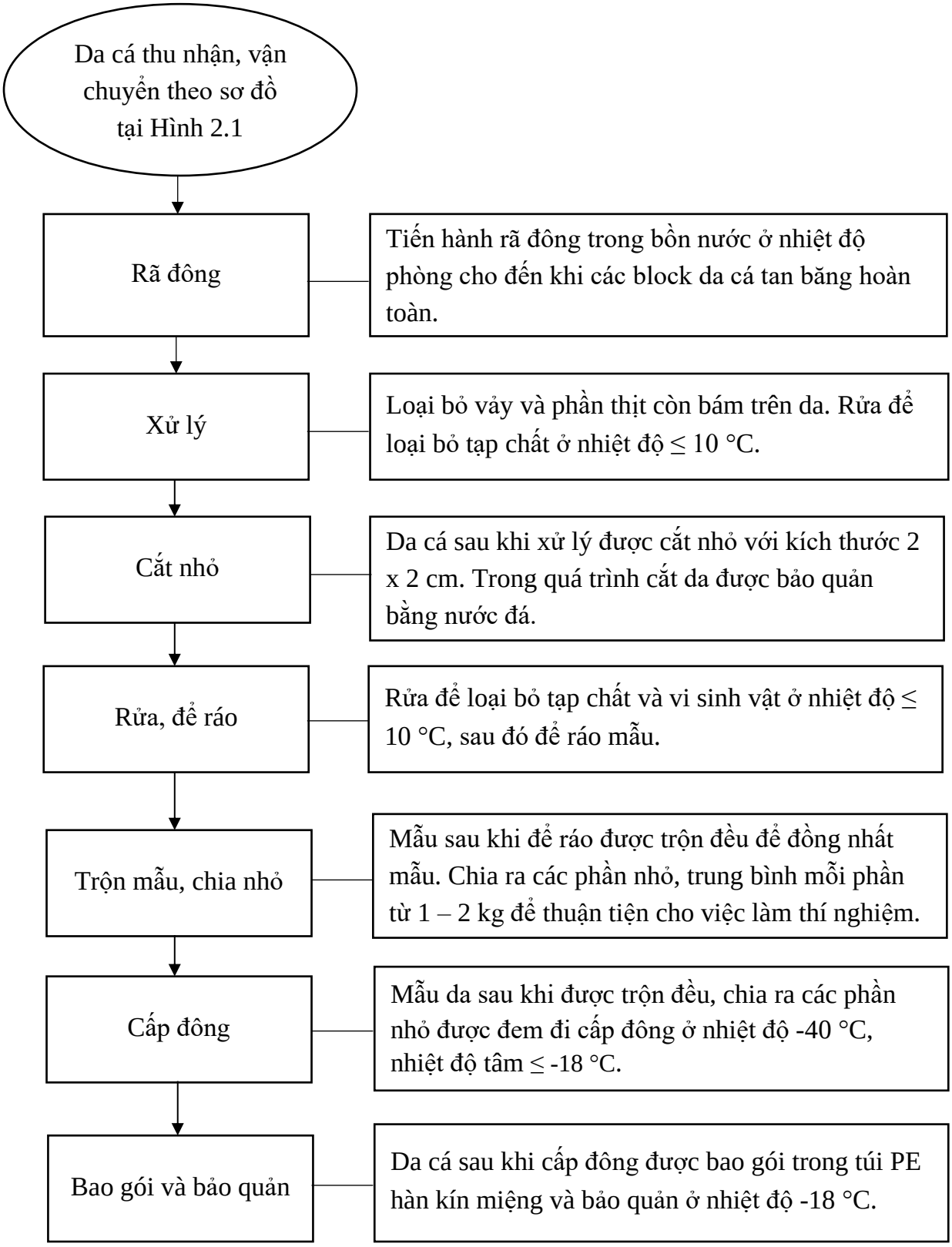
Thí nghiệm được thực hiện tại Trung tâm thí nghiệm Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành Phố Hồ Chí Minh và Trung tâm dịch vụ Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành Phố Hồ Chí Minh.

2.2. Nguyên liệu, thiết bị và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

Da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*) được lấy từ phụ phẩm của quy trình sản xuất cá ngừ phi lê đông lạnh tại công ty TNHH J.K.FISH Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa. Da cá được xử lý và vận chuyển đến phòng thí nghiệm theo sơ đồ Hình 2.1. Tại phòng thí nghiệm, da cá được xử lý theo sơ đồ Hình 2.2 để chuẩn bị và bảo quản mẫu trước khi làm thí nghiệm.



Hình 2.1. Sơ đồ thu nhận, vận chuyển da cá ngừ vây vàng



Hình 2.2. Sơ đồ xử lý và bảo quản da cá ngừ vây vàng

Nguyên liệu chanh dây: Chanh dây (*Passirflora edulis*) được đặt mua ở Huyện Đức Trọng Tỉnh Lâm Đồng. Chanh dây phải đạt độ chín kỹ thuật, vỏ có màu tím, tươi, nguyên ven, không có tạp chất và côn trùng, không có mùi vị lạ. Đường kính quả từ 67 mm – 78 mm và khối lượng quả từ 90 g – 120 g

Đường saccrose: Sử dụng đường tinh luyện Biên Hòa

Sữa tươi không đường và sữa bột gầy (skim milk) của Vinamilk

Enzyme alcalase 2.5L PF (Novozymes, Đan Mạch) có hoạt độ 2.5 AU-A/g, nhiệt độ thích hợp từ 50 – 60 °C, pH 7 – 8.

Enzyme flavourzyme 500MG (Novozymes, Đan Mạch) có hoạt độ 500 LAPU/g, nhiệt độ thích hợp 40 – 55 °C, pH 5 – 8.

Enzyme pepsin RM712 (Himedia, Ấn Độ) có hoạt độ 10.000 NF U/mg, nhiệt độ thích hợp 3 – 40 °C, pH 1,5 – 2,0.

Men giống vi khuẩn lactic của Vinamilk chứa hai loại vi khuẩn lactic *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subssp. *Bulgaricus* với tỉ lệ 2 : 1

Thiết bị sử dụng cho nghiên cứu:

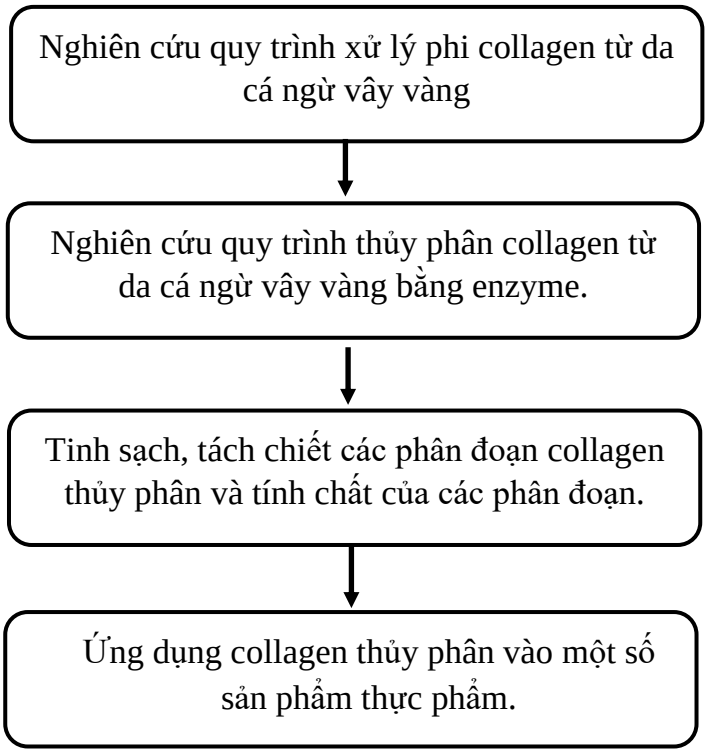
Đề tài đã sử dụng các thiết bị sau: Máy cất đạm tự động (2300KJEL-TEC, Thụy Điển); lò nung (Lenton, Anh); bộ chiết chất béo Soxhlet SER148/6(Velp, Italia); sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (Agilent 1200, Mỹ); hệ thống HPLC (Agilent 1100, Mỹ); bể cách thủy điều nhiệt (Memmert, Đức); bể ổn nhiệt lạnh Alpha RA24 (LAUDA, Đức); thiết bị đồng hóa (PT 1300D, Thụy Sĩ); cân phân tích 4 số (STARTORIUS, Đức); tủ cấp đông (Mitsubishi, Nhật); máy quang phổ UV-vis (LAMOMED 2550, Mỹ); nhớt kế rotor (SHEN, Anh); máy ly tâm lạnh (MERMLE, Đức); Tủ sấy (Memmert, Đức); máy đồng hóa; hệ thống lọc màng QuixStand Benchtop System (GE, Mỹ); màng lọc UFP-1-C-6 (GE, Mỹ) với chất liệu là polysulfone, chiều dài màng lọc 63,5 cm và đường kính trong hộp lọc 3,2 cm, kích thước lỗ lọc 1000 NMWC, điện tích màng lọc 0,48 m^2.

Hóa chất sử dụng cho nghiên cứu:

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều thuộc tiêu chuẩn phân tích, bao gồm: axit chlohydric, 1–fluoro– 2,4 – dinitrobenzene (DNFB), axit boric (H_3BO_3) (Merck, Đức); axit amin chuẩn, hydroxyproline chuẩn, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), axit ascorbic, sắt (II) sunfat (FeSO4), 1,10-phenanthroline, H_2O_2, cumene hydroperoxide (HPO), ammonium thiocyanate, iron(II) chloride tetrahydrate, axit perchloric, axit trichloroacetic, amonium molybdate (Sigma-Aldrich, Mỹ). Ngoài ra còn một số hóa chất thông dụng khác.

2.3. Phương pháp bố trí thí nghiệm

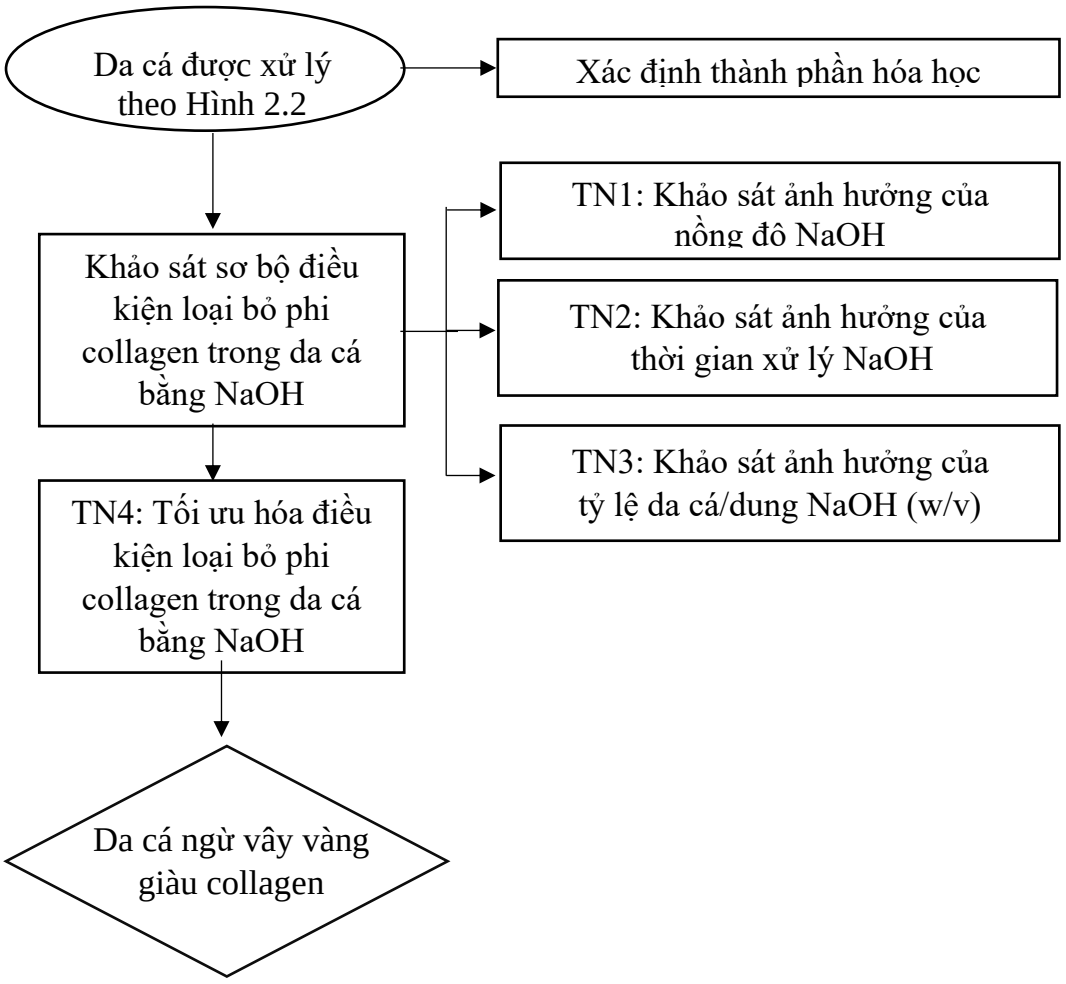
Sơ đồ tổng quát nội dung nghiên cứu của đề tài được trình bày trong Hình 2.3.



Hình 2.3. Sơ đồ nội dung nghiên cứu

2.3.1. Nghiên cứu quy trình xử lý phi collagen từ da cá ngừ vây vàng

Các thông số kỹ thuật của quy trình xử lý phi collagen từ da cá ngừ vây vàng được khảo sát theo sơ đồ trong Hình 2.4.



Hình 2.4. Sơ đồ nghiên cứu quy trình xử lý phi collagen từ da cá ngừ vây vàng

2.3.1.1. Xác định thành phần hóa học của da cá

Da cá ngừ vây vàng được xác định các thành phần hóa học như độ ẩm, lipid, tro tổng số, hàm lượng protein.

2.3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NaOH

Dựa vào tổng quan tài liệu nồng độ NaOH được chọn để xử lý phi collagen trên da cá ngừ vây vàng trong phạm vi từ 0,1 N – 1,4 N. Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên một yếu tố, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Thí nghiệm được thực hiện ở các nồng độ NaOH lần lượt là 0,1 N; 0,2 N; 0,4 N; 0,6 N; 0,8 N; 1,0 N;

1,2 N và 1,4 N. Các yếu tố cố định là: thời gian ngâm NaOH là 24 giờ; tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá 10/1 (v/w) và nhiệt độ ngâm là 4 ^oC. Khối lượng da cá trong mỗi mẫu thí nghiệm là 5 g. Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: Tỷ lệ Hyp/protein (%) lớn nhất và hàm lượng lipid (%) tính theo chất khô là nhỏ nhất. Vì khi tỷ lệ Hyp/protein (%) cao nhất có nghĩa là protein không phải là collagen bị loại bỏ cao nhất.

2.3.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH

Dựa vào tổng quan tài liệu thời gian để xử lý phi collagen trên da cá ngừ vây vàng bằng NaOH được chọn trong phạm vi từ 19 giờ – 33 giờ. Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên một yếu tố, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Thí nghiệm được thực hiện ở các thời gian ngâm NaOH lần lượt là 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 và 33 giờ. Các yếu tố cố định là: tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá 10/1 (v/w), nhiệt độ ngâm là 4 ^oC và nồng độ NaOH (được xác định ở mục 2.2.1.2). Khối lượng da cá trong mỗi mẫu thí nghiệm là 5 g. Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: Tỷ lệ hyp/protein (%) lớn nhất và hàm lượng lipid (%) tính theo chất khô là nhỏ nhất.

2.3.1.4. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/nguyên liệu

Dựa vào tổng quan tài liệu tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) để xử lý phi collagen trên da cá ngừ vây vàng được chọn trong phạm vi từ 2/1 – 10/1. Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên một yếu tố, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Thí nghiệm được thực hiện với tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) lần lượt là: 2/1; 3/1; 4/1; 5/1; 6/1; 7/1; 8/1; 9/1 và 10/1. Các yếu tố cố định là: nồng độ NaOH (được xác định ở mục 2.2.1.2), thời gian ngâm NaOH (được xác định ở mục 2.2.1.3) và nhiệt độ ngâm là 4 ^oC. Khối lượng da cá trong mỗi mẫu thí nghiệm là 5 g. Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: Tỷ lệ hyp/protein (%) lớn nhất và hàm lượng lipid (%) tính theo chất khô là nhỏ nhất.

2.3.1.5. Thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa quá trình xử lý NaOH

Thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện xử lý phi collagen trên da cá ngừ vây vàng bằng NaOH được thiết kế thí nghiệm theo phương pháp bề mặt đáp ứng (response surface methodology) (Box- Belnken,1960) với 3 lần thí nghiệm lặp lại tại điểm tâm và sử dụng phần mềm JMP để bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu. Các biến độc lập là:

nồng độ NaOH (X_1, N); thời gian xử lý (X_2, h); tỷ lệ dung dịch NaOH/ da cá (X_3, v/w) và yếu tố cố định là nhiệt độ xử lý 4 °C. Với biến phụ thuộc là tỷ lệ Hydroxyproline/protein (Y_1, %); hàm lượng chất béo còn lại so với chất khô (Y_2, %). Phạm vi và giá trị tại tâm của các biến độc lập được bố trí theo (Bảng 2.1).

Bảng 2.1. Bảng giá trị mã hóa của biến độc lập

Biến độc lập	Ký hiệu	Phạm vi giá trị các biến		
		-1	**0**	**1**
Nồng độ NaOH (N)	X_1	-1	0	1
Thời gian xử lý (h)	X_2	-1	0	1
Tỉ lệ thể tích NaOH/ da cá (v/w)	X_3	-1	0	1

Tỷ lệ Hydroxyproline (Hyp)/protein (Y_1) và hàm lượng chất béo còn lại so với chất khô (Y_2, %) là hàm mục tiêu hay biến phụ thụ thuộc được biểu diễn theo phương trình hồi quy sau:

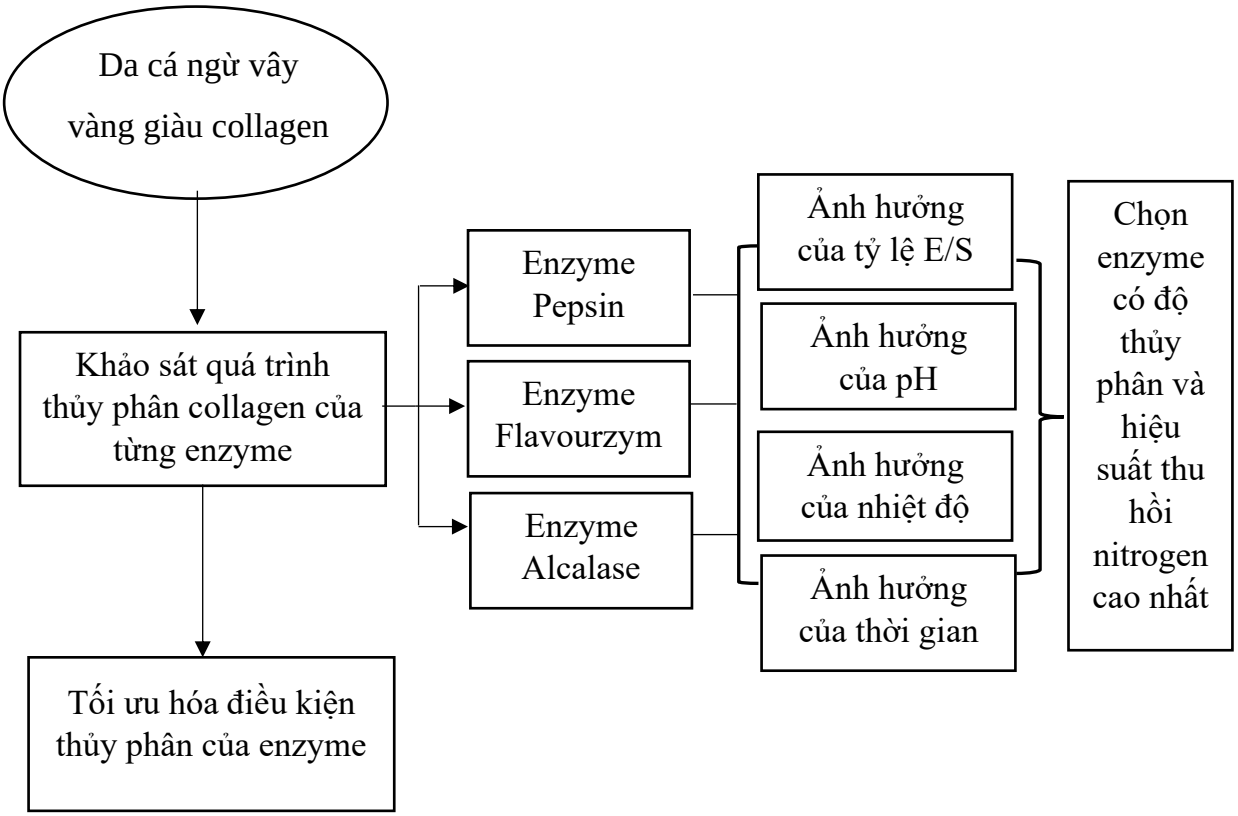
$$Y_i = \alpha_0 + \sum_{i=1}^{3} \alpha_i X_i + \sum_{i=1}^{3} \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} \alpha_{ij} X_i X_j$$

Trong đó: Y_i: là hàm mục tiêu; α_0 là hằng số; α_i, α_{ii}, α_{ij} là hệ số bậc 1, bâc 2 và tương tác các biến độc lập trong phương trình hồi quy; X_i, X_j là biến độc lập.

2.3.2. Nghiên cứu quy trình thủy phân collagen da cá bằng enzyme

Trong nghiên cứu này, 3 loại enzyme đã được lựa chọn để khảo sát khả năng thủy phân collagen từ da cá ngừ. Da cá ngừ vây vàng giàu collagen được chuẩn bị theo các thông số kỹ thuật tìm được trong phần 2.2.1 được xay nhỏ bằng máy xay trục vít, kích thước lỗ xay 0,5 cm, sau đó chia thành từng túi nhỏ và trữ đông trước khi sử dụng.

Mẫu sau khi rã đông được tiến hành thí nghiệm theo Hình 2.5 để xác định điều kiện thủy phân theo từng enzyme với hàm mục tiêu là độ thủy phân (Degree of hydrolysis: DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (Nitrogen recovery: NR).



Hình 2.5. Sơ đồ nghiên cứu quy trình tách chiết collagen thủy phân

2.3.2.1. Thủy phân collagen của da cá ngừ vây vàng bằng enzyme pepsin

Dựa vào tổng quan tài liệu và các điều kiện của enzyme pepsin để chọn các giới hạn biên cửa các yếu tố ảnh hưởng. Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên một yếu tố, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi mẫu thí nghiệm là 5 g. Thí nghiệm được thực hiện ở nồng độ enzyme pepsin 20 – 40NFU/g protein, nhiệt độ thủy phân 30 – 50 °C, pH 1,5 – 3,0 và thời gian thủy phân 1 – 5 giờ. Khối lượng pepsin được tính dựa vào hoạt độ và hàm lượng protein trong mẫu. Hỗn hợp thủy phân bao gồm: mẫu da cá, enzyme pepsin, tỷ lệ nước/da cá: 1:1 (v/w). pH phản ứng được điều chỉnh bằng HCl nồng độ 1N và 0,1 N. Nhiệt độ thủy phân được được điều chỉnh bằng bể ổn nhiệt (Memmert, Đức). Khi kết thúc quá trình thủy phân, để bất hoạt enzyme, hỗn hợp thủy phân được gia nhiệt ở 95 °C trong 15 phút. Sau đó, dịch thủy phân được đem ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 20 phút để loại bỏ phần cặn bên dưới. Phần dịch trong bên trên gọi là dịch collagen thủy phân được thu hồi và bảo quản ở nhiệt độ 0 – 4 °C để phân tích các chỉ tiêu tiếp theo.

2.3.2.2. Thủy phân collagen của da cá ngừ vây vàng bằng enzyme flavourzyme

Dựa vào tổng quan tài liệu và các điều kiện của enzyme flavourzyme để chọn các giới hạn biên cửa các yếu tố ảnh hưởng .Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên một yếu tố, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi mẫu thí nghiệm là 5 g. Thí nghiệm được thực hiện ở nồng độ enzyme flavourzyme 10 – 50 LAPU/g protein, nhiệt độ thủy phân 30 – 60 °C, pH 5,0 – 8,0 và thời gian thủy phân 2 – 8 giờ. Hỗn hợp thủy phân bao gồm: mẫu da cá, enzyme flavourzyme, tỷ lệ dung dịch đệm phosphate/da cá: 1:1 (v/w). pH phản ứng được điều chỉnh bằng HCl và NaOH nồng độ mỗi chất lần lượt là 1 N và 0,1 N. Nhiệt độ thủy phân được được điều chỉnh bằng bể ổn nhiệt (Memmert, Đức). Khi kết thúc quá trình thủy phân, để bất hoạt enzyme hỗn hợp thủy phân được gia nhiệt ở 95 °C trong 15 phút. Sau đó, dịch thủy phân được đem ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 20 phút để loại bỏ phần cặn bên dưới. Phần dịch trong bên trên gọi là dịch collagen thủy phân được thu hồi và bảo quản ở nhiệt độ 0 – 4 ^{o}C để phân tích các chỉ tiêu tiếp theo.

2.3.2.3. Thủy phân collagen của da cá ngừ vây vàng bằng enzyme alcalase

Dựa vào tổng quan tài liệu và các điều kiện của enzyme alcalase để chọn các giới hạn biên cửa các yếu tố ảnh hưởng .Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên một yếu tố, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi mẫu thí nghiệm là 5 g. Thí nghiệm được thực hiện ở nồng độ enzyme alcalase 2.5L PF 0,01 – 0,05 AU/g protein, nhiệt độ thủy phân 45 – 65 °C, pH 6,0 – 9,0 và thời gian thủy phân 3 – 7giờ. Hỗn hợp thủy phân bao gồm: mẫu da cá, enzyme alcalase 2.5L PF, tỷ lệ dung dịch đệm phosphate/da cá: 1:1 (v/w). pH phản ứng được điều chỉnh bằng HCl và NaOH nồng độ mỗi chất lần lượt là 1 N và 0,1 N. Nhiệt độ thủy phân được được điều chỉnh bằng bể ổn nhiệt (Memmert, Đức). Khi kết thúc quá trình thủy phân, để bất hoạt enzyme, hỗn hợp thủy phân được gia nhiệt ở 95 °C trong 15 phút. Sau đó, dịch thủy phân được đem ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 20 phút để loại bỏ phần cặn bên dưới. Phần dịch trong bên trên gọi là dịch collagen thủy phân được thu hồi và bảo quản ở nhiệt độ 0 – 4 ^{o}C để phân tích các chỉ tiêu tiếp theo.

2.3.2.4. Thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện thủy phân da cá ngừ vây vàng bằng enzyme alcalase

Trước hết, dựa vào việc khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố riêng lẻ ở mục *2.2.2.3* đến độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR) để xác định phạm vi của các biến độc lập như: Nhiệt độ thủy phân, pH, nồng độ enzyme alcalase và thời gian thủy phân. Sau đó, các tham số thủy phân được tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng Response surface method (RSM). Thiết kế Box-Behnken được sử dụng để tối ưu hóa điều kiện thủy phân collagen của da cá ngừ vây vàng. Để xác định ảnh hưởng của các biến độc lập lên hàm mục tiêu, thiết kế Box-Behnken với 4 biến độc lập và được thể hiện ở 3 mức. Phạm vi và mức độ của biến độc lập được trình bày trong Bảng 2.2. Thí nghiệm được thiết kế với 4 yếu tố và 3 lần lặp lại ở điểm tâm. Sử dụng phần mềm JMP phiên bản 14.2 để phân tích bề mặt đáp ứng. Phần trăm độ thủy phân DH (Y_1, %) và hiệu suất thu hồi nitrogen NR (Y_2, %) được chọn là hàm mục tiêu. Các phương trình hồi quy được xác định theo công thức sau:

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

Trong đó: Y_i: hàm mục tiêu; α_o là hằng số; α_i, α_{ii}, α_{ij} hệ số bậc nhất, bậc hai và tương tác giữa các biến. X_i, X_j biến độc lập.

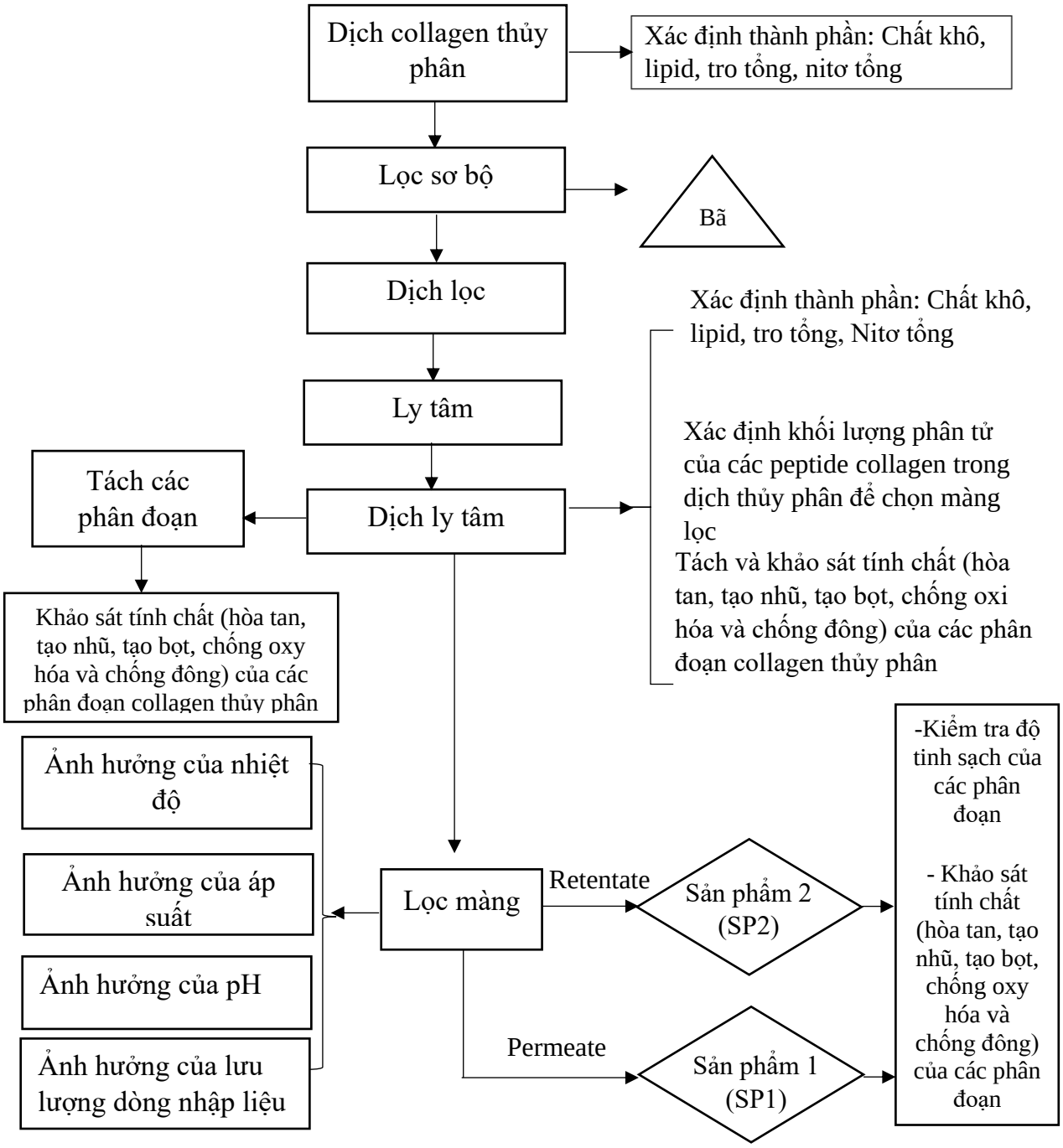
Bảng 2.2. Giá trị mã hóa của biến độc lập

Biến độc lập	Ký hiệu	Phạm vi của biến		
		-1	**0**	**1**
Nhiệt độ thủy phân (°C)	X_1	-1	0	1
pH	X_2	-1	0	1
Nồng độ của enzyme alcalase (AU/g)	X_3	-1	0	1
Thời gian thủy phân (giờ)	X_4	-1	0	1

Mỗi thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần

2.3.3. Tinh sạch và phân đoạn collagen thủy phân

Sơ đồ quy trình nghiên cứu tinh sạch và phân đoạn collagen được trình bày trong Hình 2.6.



Hình 2.6. Sơ đồ nghiên cứu quy trình tinh sạch và phân đoạn collagen

2.3.3.1. Xác định thành phần hóa học và phân bố khối lượng trong dịch sau ly tâm

Dịch collagen thủy phân sau khi ly tâm được xác định các thành phần hóa học như hàm lượng chất khô, lipid, tro tổng, nitơ tổng số và phân bố khối lượng phân tử của các peptide để làm cơ sở chọn màng lọc.

2.3.3.2. Làm sạch sơ bộ

Dịch collagen thủy phân được lọc qua giấy lọc Whatman (đường kính Φ 180mm, lỗ lọc có kích thước 4-7 µm) bằng thiết bị lọc chân không. Dịch lọc thu được đem ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút, trong 30 phút với nhiệt độ dịch đem ly tâm là 4 °C. Loại bỏ phần chất rắn bên dưới lấy phần dịch bên trên để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

2.3.3.3. Phân đoạn collagen và khảo sát các hoạt tính của các phân đoạn

Sắc ký lọc gel (GPC) được dùng để tách các phân đoạn collagen ra khỏi phần dịch collagen thủy phân bằng cách hứng sản phẩm đầu ra của sắc ký theo thời gian lưu của các phân đoạn khi sắc ký. Các phân đoạn được kiểm tra các tính chất như khả năng hòa tan, khả năng tạo nhũ, khả năng tạo bọt, khả năng chống oxy hóa và chống đông.

2.3.3.4. Xác định điều kiện lọc màng

Thí nghiệm lọc màng được thực hiện trên thiết bị QuixStand Benchtop System (GE, Mỹ) với màng UFP-1-C-6 (GE, Mỹ) với chất liệu màng là polysulfone, chiều dài màng lọc 63,5 cm và đường kính trong hộp lọc 3,2 cm, kích thước lỗ lọc 1000 NMWC, điện tích màng lọc 0,48 m^2. Quá trình lọc được thực hiện gián đoạn mỗi mẻ lọc là 3000 ml. Dịch collagen thủy phân trước khi đưa vào thí nghiệm lọc màng được làm sạch sơ bộ (mục 2.2.3.2) và xác định sự phân bố khối lượng phân tử của các peptide trong dịch collagen thủy phân bằng sắc ký lọc gel (mục 2.2.3.1). Trước khi lọc màng lọc được rửa bằng cồn 50 °Vol và rửa lại bằng nước cất cho đến khi hết cồn. Ổn định nhiệt cho nguyên liệu lọc bằng bể ổn nhiệt (Memmert, Đức) trước khi bơm vào màng lọc.

a. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên một yếu tố, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Thể tích mẫu trong mỗi thí nghiệm là 3000 ml. Thí nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ dịch lọc là: 5 °C; 10 °C; 15 °C; 20 °C; 25 °C; 30 °C và 35 °C. Các yếu tố cố định là: thời gian lọc là 30 phút (tính từ khi ổn định màng); pH 7,0, lưu lượng dòng

nhập liệu là 1,5 lít/phút, áp suất dòng vào là 10 psi, TMP 9 psi. Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: Thông lượng qua màng, độ phân riêng và hiệu suất thu hồi nitrogen.

b. Khảo sát ảnh hưởng của áp suất đầu vào

Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên một yếu tố, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Thể tích mẫu trong mỗi thí nghiệm là 3000 ml. Thí nghiệm được thực hiện ở áp suất là: 6 psi; 8 psi; 10 psi; 12 psi và 14 psi. Các yếu tố cố định là: thời gian lọc là 30 phút (tính từ khi ổn định màng); pH 7,0, lưu lượng dòng nhập liệu là 1,5 lít/phút, đầu vào và đầu ra cột lọc luôn chênh lệch nhau 2 psi và nhiệt độ (đã xác định ở mục a). Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: Thông lượng qua màng, độ phân riêng và hiệu suất thu hồi nitrogen

c. Khảo sát ảnh hưởng của pH

Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên một yếu tố, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Thể tích mẫu trong mỗi thí nghiệm là 3000 ml. Thí nghiệm được thực hiện ở pH là: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0. Các yếu tố cố định là: thời gian lọc là 30 phút (tính từ khi ổn định màng), lưu lượng dòng nhập liệu là 1,5 lít/phút và nhiệt độ, áp suất (đã xác định ở mục a, mục b). Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: Thông lượng qua màng, độ phân riêng và hiệu suất thu hồi nitrogen.

d. Khảo sát ảnh hưởng của lưu lượng dòng nhập liệu

Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên một yếu tố, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Thể tích mẫu trong mỗi thí nghiệm là 3000 ml. Thí nghiệm được thực hiện ở lưu lượng dòng nhập liệu là: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 và 2,5 lít/phút. Các yếu tố cố định là: thời gian lọc là 30 phút (tính từ khi ổn định màng), nhiệt độ, áp suất và pH (đã xác định ở mục a, mục b và mục c). Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: Thông lượng qua màng, độ phân riêng và hiệu suất thu hồi nitrogen.

2.3.4. Ứng dụng collagen thủy phân vào thực phẩm

2.3.4.1. Ứng dụng phân đoạn (SP1) vào sản xuất nước uống chanh dây collagen

Thí nghiệm 1: Xác định tỷ lệ phối trộn nước

Mục tiêu: Xác định tỷ lệ nước phối trộn với dịch quả chanh dây sao cho sản phẩm có giá trị cảm quan cao nhất.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên 1 yếu tố với 3 lần lặp lại. Mỗi mẫu thí nghiệm là 2 kg chanh dây để sản xuất 2 lít nước uống chanh dây.

Yếu tố thí nghiệm: Tỷ lệ nước phối trộn: 30%; 35%; 40%; 45%; 50% và 55% so với dịch quả chanh dây.

Các yếu tố cố định:

+ Tỷ lệ collagen thủy phân 0,1% so với dịch quả chanh dây

+ Tỷ lệ axit citric 0,1% so với dịch chanh dây

+ Dung dịch siro 30% so với dịch quả chanh dây

+ Nhiệt độ thanh trùng 90 ºC, thời gian 20 phút

Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: Điểm cảm quan của sản phẩm

Thí nghiệm 2: Xác định tỷ lệ phối trộn axit citric

Mục tiêu: Xác định tỷ lệ axit citric để cho sản phẩm có giá trị cảm quan cao nhất.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên 1 yếu tố với 3 lần lặp lại. Mỗi mẫu thí nghiệm là 2 kg chanh dây để sản xuất 2 lít nước uống chanh dây.

Yếu tố thí nghiệm: Tỷ lệ axit citric phối trộn: 0.1%; 0.15%; 0.2%; 0.25%; và 0.3% so với dịch quả chanh dây

Các yếu tố cố định:

+ Tỷ lệ nước (Theo TN 1)

+ Tỷ lệ collagen thủy phân 0,1% so với dịch quả chanh dây

+ Dung dịch siro 30% so với dịch quả chanh dây

+ Nhiệt độ thanh trùng 90 °C, thời gian 20 phút

Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: Điểm cảm quan của sản phẩm.

Thí nghiệm 3: Xác định tỷ lệ phối trộn dung dịch siro

Mục tiêu: Xác định tỷ lệ phối trộn collagen thủy phân để cho sản phẩm có giá trị cảm quan cao nhất.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên 1 yếu tố với 3 lần lặp lại. Mỗi mẫu thí nghiệm là 2 kg chanh dây để sản xuất 2 lít nước uống chanh dây.

Yếu tố thí nghiệm: Tỷ lệ siro phối trộn: 15%; 20%; 25%; 30% và 35% so với dịch quả chanh dây.

Các yếu tố cố định:

+ Tỷ lệ nước (Theo TN 1)
+ Tỷ lệ axit citric (theo TN2)
+ Tỷ lệ collagen thủy 0,1% so với dịch quả chanh dây
+ Nhiệt độ thanh trùng 90 °C, thời gian 20 phút

Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: Điểm cảm quan của sản phẩm.

Thí nghiệm 4: Xác định tỷ lệ phối trộn collagen thủy phân

Mục tiêu: Xác định tỷ lệ phối trộn collagen thủy phân để cho sản phẩm có giá trị cảm quan cao nhất.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên 1 yếu tố với 3 lần lặp lại. Mỗi mẫu thí nghiệm là 2 kg chanh dây để sản xuất 2 lít nước uống chanh dây.

Yếu tố thí nghiệm: Tỷ lệ collagen thủy phân phối trộn: 0%; 0,05%; 0,075%; 0,10%; 0,125% và 0,15%

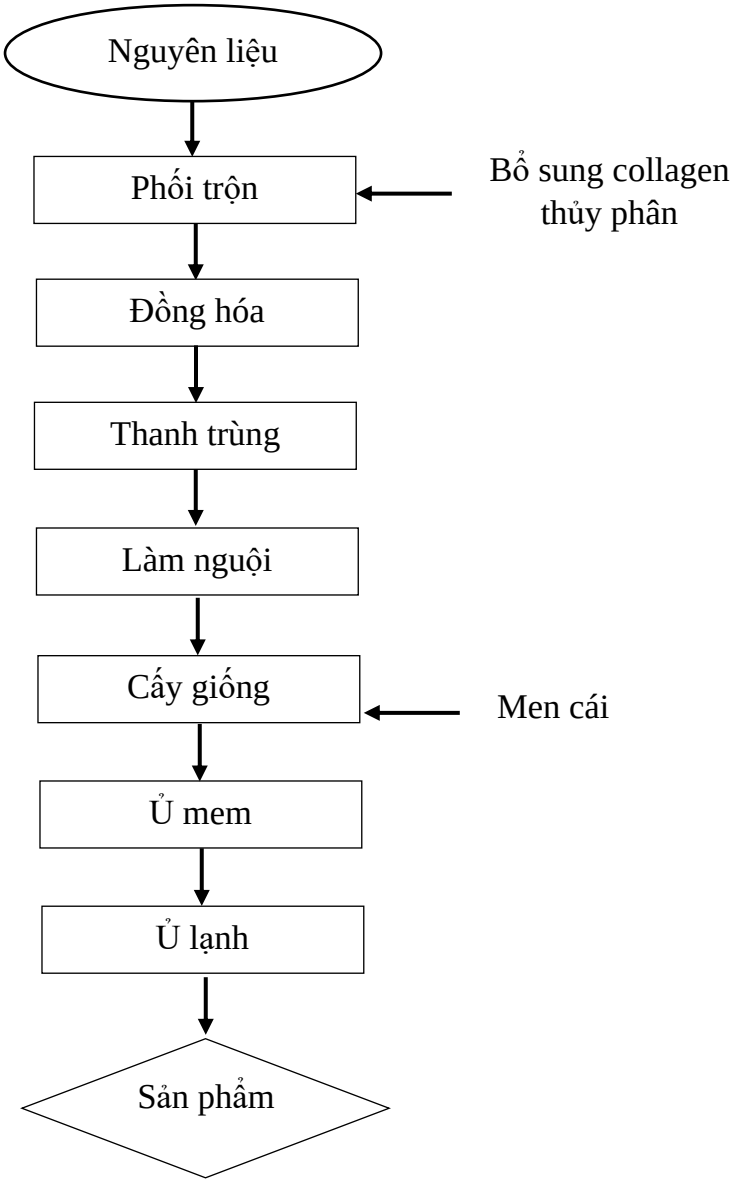
- Các yếu tố cố định:

+ Tỷ lệ nước (Theo TN 1)
+ Tỷ lệ axit citric (theo TN2)
+ Tỷ lệ siro (theo TN3)
+ Nhiệt độ thanh trùng 90 °C, thời gian 20 phút

Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: Điểm cảm quan của sản phẩm.

2.3.4.2. Ứng dụng phân đoạn (SP2) vào sản xuất sữa chua collagen

Quy trình chế biến sữa chua thí nghiệm



Hình 2.7. Sơ đồ quy trình sản xuất sữa chưa collagen

Thí nghiệm 1: Xác định thời gian lên men

Mục tiêu: Xác định thời gian lên men thích hợp để cho sản phẩm có pH, độ nhớt thích hợp và có giá trị cảm quan cao nhất.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên 1 yếu tố với 3 lần lặp lại. Mỗi mẫu thí nghiệm là 1,5 lít sữa tươi không đường của Vinamilk

Yếu tố thí nghiệm: Thời gian lên men: 240 phút; 260 phút; 280 phút; 300 phút; 320 phút; 340 phút và 360 phút.

Các yếu tố cố định:

+ Sữa tươi không đường Vinamilk bổ sung sữa bột gầy (skim milk) để đạt hàm lượng chất khô là 15%.

+ Men giống vi khuẩn lactic: chứa hai loại vi khuẩn lactic *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subssp. *Bulgaricus* với tỉ lệ 2 : 1

+ Tỷ lệ collagen thủy phân bổ sung là 0,1%

+ Đồng hóa bằng máy đồng hóa áp lực 200 bar, thanh trùng ở 95 °C trong 5 phút, nhiệt độ lên men là 45 °C.

Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: pH, độ nhớt và điểm cảm quan của sản phẩm.

Thí nghiệm 2: Xác định tỷ lệ phối trộn collagen thủy phân

Mục tiêu: Xác định tỷ lệ phối trộn collagen thủy phân để cho sản phẩm có pH, độ nhớt thích hợp và giá trị cảm quan cao nhất.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên 1 yếu tố với 3 lần lặp lại. Mỗi mẫu thí nghiệm là 1,5 lít sửa tươi không đường của Vinamilk

Yếu tố thí nghiệm: Tỷ lệ collagen thủy phân phối trộn: 0%; 0,05%; 0,075%; 0,10%; 0,125% và 0,15%

Các yếu tố cố định:

+Sữa tươi không đường Vinamilk bổ sung sữa bột gầy (skim milk) để đạt hàm lượng chất khô là 15%.

+ Thời gian lên men (theo thí nghiệm 1)

+ Men giống vi khuẩn lactic: chứa hai loại vi khuẩn lactic *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subssp. *Bulgaricus* với tỉ lệ 2 : 1

+ Đồng hóa bằng máy đồng hóa áp lục 200 bar, thanh trùng ở 95°C trong 5 phút, nhiệt độ lên men là 45°C.

Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: pH, độ nhớt và điểm cảm quan của sản phẩm.

2.4. Phương pháp phân tích

2.4.1. Phân tích các chỉ tiêu hóa lý

- Hàm lượng protein, hàm lượng lipid, hàm lượng ẩm, tro được xác định lần lượt theo AOAC 2011.04: 2011, AOAC 960.39: 2012, AOAC 950.46: 2000, AOAC 920.153:2007

- Phân tích các kim loại nặng Pb, Hg, As theo AOAC 977.15: 2011, AOAC 971.21: 2010, AOAC 952.13:2010

- Phân tích axit amin bằng HPLC theo phương pháp của Stocchi và ctv, 1992

- Phân tích hàm lượng collagen HPLC theo phương pháp của (Stocchi và ctv, 1992; Boran & Regenstein, 2009)

2.4.2. Phân tích vi sinh

- Phân tích tổng vi sinh vật hiếu khí (TPC) theo tiêu chuẩn AOAC 990.12: 1994

- Phân tích *Salmonella* theo tiêu chuẩn ISO 6579:2002

- Phân tích *Escherichia coli* theo tiêu chuẩn ISO 7251 – 2005

2.4.3. Đánh giá chất lượng cảm quan sản phẩm

- Đánh giá cảm quan nước giải khát theo TCVN 3215-79

- Đánh giá cảm quan sữa chua theo TCVN 3215-79

- Cách huấn luyện hội đồng cảm quan theo TCVN 12389: 2018

2.4.4. Xác định các chỉ tiêu trong quá trình thủy phân

-Xác định hiệu suất thu hồi nitrogen

Hiệu suất thu hồi nitrogen (NR, %) = $\frac{N_1}{N_2}$x100

N_1: Nitrogen chứa trong collagen thủy phân (g); N_2: Nitrogen trong da cá đã xử lý NaOH.

- Xác định độ thủy phân (DH, %)

Độ thủy phân collagen được xác định theo phương pháp của Nielsen và ctv, 2001.

-Xác định sự phân bố trọng lượng phân tử peptide của collagen thủy phân

Xác định sự phân bố trọng lượng phân tử (MW) của các peptide collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng được đo bằng sắc ký lọc gel (GPC) theo phương pháp của Spellman và ctv, 2009**.**

-Tách các phân đoạn collagen thủy phân

Dựa vào sắc ký đồ GPC của dịch collagen thủy phân. Xác định thời gian lưu của các phân đoạn peptide để tách các phân đoạn ra khỏi dịch thủy phân bằng sắc ký lọc gel (GPC).

2.4.5. Phân tích một số chỉ tiêu trong quá trình lọc màng

- Độ phân riêng

Độ phân riêng được xác định theo phương pháp của Shishegaran và ctv, 2020.

-Thông lượng qua màng

Thông lượng qua màng được xác định theo phương pháp của Shishegaran và ctv, 2020.

- Hiệu suất thu hồi

Hiệu suất thu hồi được xác định theo phương pháp của Gifuni và ctv, 2020

2.4.6. Phân tích một số tính chất của collagen thủy phân

-Xác định độ hòa tan

Độ hòa tan của các phân đoạn collagen thủy phân được xác định dựa trên phương pháp được mô tả bởi Tsumura và ctv (2005) với một số điều chỉnh.

- Xác định khả năng tạo nhũ của collagen thủy phân

Tính chất tạo nhũ gồm hoạt tính tạo nhũ (EAI:Emulsifying activity index) và độ bền nhũ (ESI: Emulsifying stability index) được xác định dựa trên phương pháp của Pearce và Kinsella (Pearce & Kinsella, 1978; Zamorano-Apodaca và ctv, 2020).

-Xác định khả năng tạo bọt của của collagen thủy phân

Khả năng tạo bọt (FC: Foaming capacity và độ bền bọt (FS: Foaming stability) được xác định dựa trên phương pháp của Shahidi và ctv.(Shahidi và ctv, 1995; Zamorano-Apodaca và ctv, 2020)

- Xác định khả năng chống oxy hóa

+ Khả năng khử gốc tự do DPPH được xác định theo phương pháp của (Hui-Yin, 2002).

+ Năng lực khử được xác định theo phương pháp pháp của Wang và ctv, 2012).

+ Xác định khả năng chống oxy hóa trên môi trường dầu-nước theo phương pháp của Zhao và ctv, 2012

- Xác định khả năng chống đông của collagen thủy phân

Khả năng chống đông của collagen thủy phân theo phương pháp của Wu và ctv, 2018.

2.5. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu thí nghiệm

Số liệu thí nghiệm được phân tích bằng phần mềm JMP phiên bản 14.2. Sự thích ứng của mô hình dựa trên các thông số Lack of fit, hệ số xác định (R^2) và giá trị kiểm tra Fisher (F-value) thu được từ phân tích phương sai (ANOVA). Việc kiểm tra ý nghĩa thống kê với độ tin cậy là 95%. Các sơ đồ không gian ba chiều (3D) và hai chiều (2D) của hàm mục tiêu bằng cách thay đổi hai biến độc lập trong phạm vi thí nghiệm và giữ một biến tại điểm tâm. Vẽ đồ thị bằng Microsoft Excel 2016.

Các giá trị trung bình khác nhau của các phản ứng đo lường và dự đoán được phân tích bằng phân tích phương sai (ANOVA) bằng phần mềm SPSS phiên bản 25.0.

Chương 3

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu xử lý phi collagen từ da cá ngừ vây vàng

3.1.1. Thành phần hóa học của da cá ngừ vây vàng

Thành phần chủ yếu của da cá ngừ vây vàng là độ ẩm, tro, collagen, lipid và protein được trình bày trong Bảng 3.1. Trong đó ẩm độ chiếm tỷ lệ cao nhất với 63,59%, protein chiếm 32,02% cao hơn hàm lượng protein trong da cá tra và da cá mập (Quỳnh & Đào, 2015).

Bảng 3.1. Bảng thành phần hóa học của da cá ngừ vây vàng

Độ ẩm (%)	Protein (%)	Collagen (%)	Lipid (%)	Tro (%)
63,59 ± 0,78	32,02 ± 0,12	25,37 ± 0,07	4,03 ± 0,05	0,36 ± 0,02
Theo chất khô	87,94 ± 0,12	69,68 ± 0,07	11,07 ± 0,05	0,99 ± 0,02

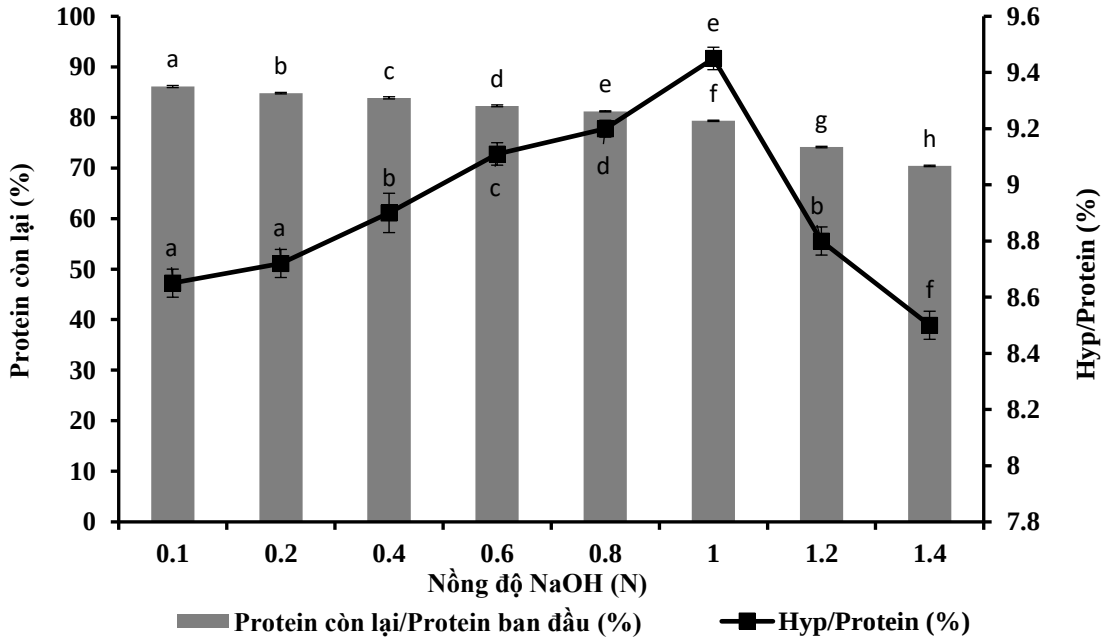
Hàm lượng tro trong da cá ngừ vây vàng rất thấp (0,36% ± 0,02%) vì trong lúc xử lý mẫu đã loại hết phần vẩy cá. Hàm lượng lipid thấp (4,03% ± 0,05%) vì cá ngừ vây vàng di chuyển nhiều. So sánh hàm lượng protein tổng và hàm lượng collagen, điều này cho thấy hàm lượng collagen chiếm 69,6% trên tổng chất khô và có đến 7% lượng protein không phải là collagen. Như vậy, phần phi collagen cần loại bỏ trên da cá ngừ vây vàng là lipid và các protein không phải là collagen. Theo nghiên cứu của Cho và ctv (2005), da cá ngừ vây vàng được đánh bắt ở Busan, Hàn Quốc có thành phần gần đúng là độ ẩm 56,1%, lipid 6,8%, tro 1% và chất đạm 33,6%, cho thấy không có sự khác biệt quá lớn về độ ẩm và chất đạm. Tuy nhiên, hàm lượng lipid có sự khác biệt. Nguyên nhân là do cá ngừ vây vàng sống ở vùng biển Việt Nam, ấm hơn so với vùng biển của Hàn Quốc, nên có thể cá hoạt động nhiều và ít tích mỡ hơn, dẫn đến lượng lipid trong da cá ngừ vây vàng đánh bắt ở vùng biển Việt Nam thấp hơn. Ngoài ra, hàm lượng tro tổng của da cá trong nghiên cứu của Cho và ctv (2005) cao hơn, sự khác biệt này là do không loại bỏ phần vẩy khi xử lý nguyên liệu.

Ngoài ra, môi trường sống, thức ăn, phương thức đánh bắt, phương thức xử lí nguyên liệu, công nghệ hay thao tác của con người cũng khiến các nguyên liệu có sự khác nhau về thành phần hóa học.

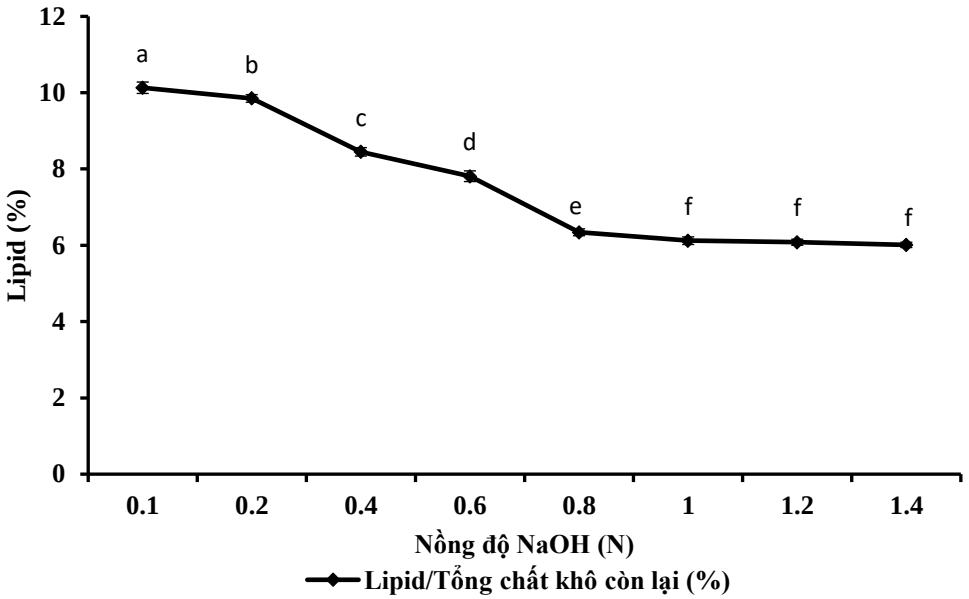
3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen trong da cá ngừ vây vàng

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.

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. Do vậy nồng độ dung dịch kiềm phù hợp sẽ giúp loại bỏ phi collagen trong da cá một cách tốt nhất. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch kiềm đến quá trình loại phi collagen được trình bày trong Hình 3.1 và Hình 3.2.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen



Hình 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến quá trình loại bỏ lipid

Tỷ lệ hyp/protein và hàm lượng lipid còn lại là hai hàm mục tiêu chính trong quá trình làm sạch collagen. Tỷ lệ hyp/protein càng cao và hàm lượng lipid còn lại thấp thì nói lên hiệu quả loại bỏ phi collagen càng tốt. Còn hàm lượng protein còn lại nói lên hiệu quả thu hồi collagen.

Từ Hình 3.1 và Hình 3.2 cho thấy khi nồng độ NaOH thay đổi từ 0,1 N đến 1,0 N thì tỷ lệ hyp/protein càng tăng và hàm lượng lipid càng giảm. Tỷ lệ hyp/protein tăng từ 8,65% đến 9,45%; trong khi đó, hàm lượng lipid giảm từ 10,13% xuống còn 6,12%. Khi tiếp tục tăng nồng độ NaOH từ 1,0 N đến 1,4 N thì tỷ lệ hyp/protein giảm xuống 8,5% và hàm lượng lipid có xu hướng là không giảm. Trong khi đó, tỷ lệ protein còn lại tiếp tục giảm đều ở các nồng độ cho thấy phần protein mất đi chính là protein phi collagen. Tỷ lệ hyp/protein đạt mức cao nhất và hàm lượng lipid đạt mức thấp nhất ở nồng độ NaOH là 1,0 N. Kết quả xử lý số liệu thống kê cho thấy nếu tăng nồng độ NaOH từ 1,0 N đến 1,4 N thì hàm lượng lipid/chất khô còn lại không có sự khác biệt về mặt thống kê ($p<0,05$).

Điều này có thể được giải thích như sau: collagen có cấu trúc là một protein nên có đầy đủ tính chất của protein. Trên mạch collagen có gốc carboxyl và amin. Trong môi trường kiềm, gốc carboxyl kết hợp với Na^+ tạo thành muối. Nước dễ dàng kết hợp với các nhóm chức mang điện trong cấu trúc protein khi có mặt của ion Na^+ khiến

collagen trong môi trường kiềm có độ hút nước cao hơn trong nước nguyên chất. Do collagen có cấu trúc bền chắc và trong đó ba chuỗi polypeptide song song trong một cuộn xoắn hình xoắn ốc kiểu polyproline II (PPII) ở phía bên trái bằng một chuỗi xoắn còn lại để tạo thành một chuỗi xoắn ba bên phải. Các vòng xoắn PPII chặt chẽ nên collagen khó bị cắt đứt mạch liên kết như các protein khác (Shoulders & Raines, 2009). Dung dịch NaOH có khả năng khử các hợp chất nitơ phi protein vì collagen có tính lưỡng tính.

Dưới tác dụng NaOH, collagen bị cắt đứt các liên kết peptide làm phá vỡ liên kết trong collagen, ngoài ra NaOH khử đi các protein yếu, mucopolysacharide và một số sắc tố trong nguyên liệu dẫn đến hàm lượng protein giảm dần và cho tỷ lệ hyp/protein tăng dần. Khi ngâm da cá trong dung dịch NaOH, thì có sự trương nở do sự tương tác giữa các mạch polypeptide làm cho các phân tử có những vùng kỵ nước và vùng phân cực mang điện tích sẽ tạo nên khả năng háo nước làm trương nở collagen. Nước phân cực tác dụng lên liên kết hydro trong liên kết phối trí của collagen làm giảm tính vững chắc của sợi collagen (Avila Rodríguez và ctv, 2018).

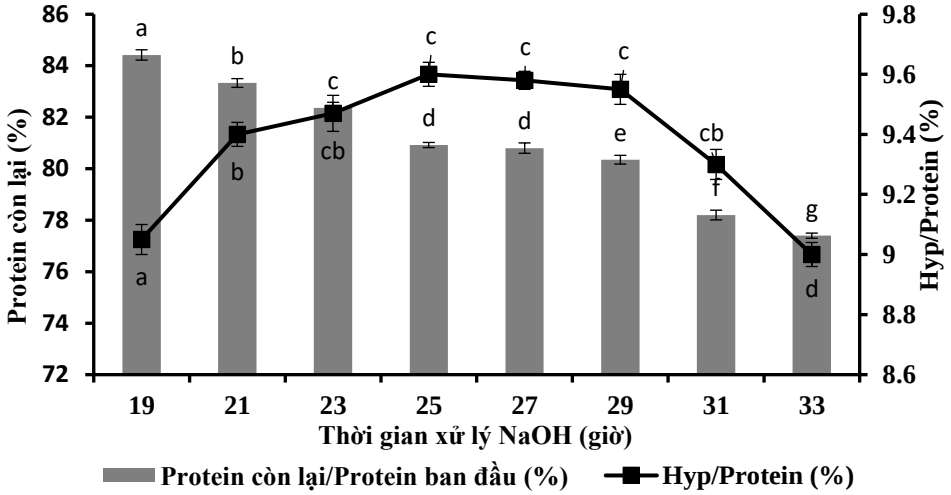
Điều này chứng tỏ, khi ngâm nguyên liệu trong dung dịch kiềm NaOH ở nồng độ càng cao thì cấu trúc protein bị phá hủy, cắt mạch rất lớn dẫn tới hiệu suất khử protein càng cao. Tuy nhiên, khi sử dụng nồng độ kiềm lớn thì xuất hiện các dấu hiệu tác động không có lợi cho mạch collagen của da cá, cụ thể là collagen ở trạng thái không bền nên dễ bị thủy phân thành những mạch ngắn, dung dịch xử lý có độ nhớt. Cho nên, khi ngâm da cá với nồng độ kiềm ở mức 1,2 N và 1,4 N thì tỷ lệ hyp/protein tổng lại giảm xuống. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Đỗ Quỳnh và Nguyễn Lê Anh Đào (2015) trích ly gelatine từ da cá tra và kết quả nghiên cứu của Phanat cùng ctv (2005) khi trích ly collagen từ da và xương cá hồng. Theo Liu và ctv (2015), thì nồng độ NaOH và nhiệt độ xử lý da cá nếu không phù hợp sẽ làm mất lượng collagen trên da cá một cách đáng kể.

Chính vì vậy, khi sử dụng NaOH xử lý da cá làm cho các protein phi collagen bị thủy phân và sau khi chúng bị loại bỏ sẽ thu được chế phẩm da cá giàu collagen. Từ kết quả trên, nhóm tác giả chọn dung dịch NaOH ở mức nồng độ là 1,0 N được

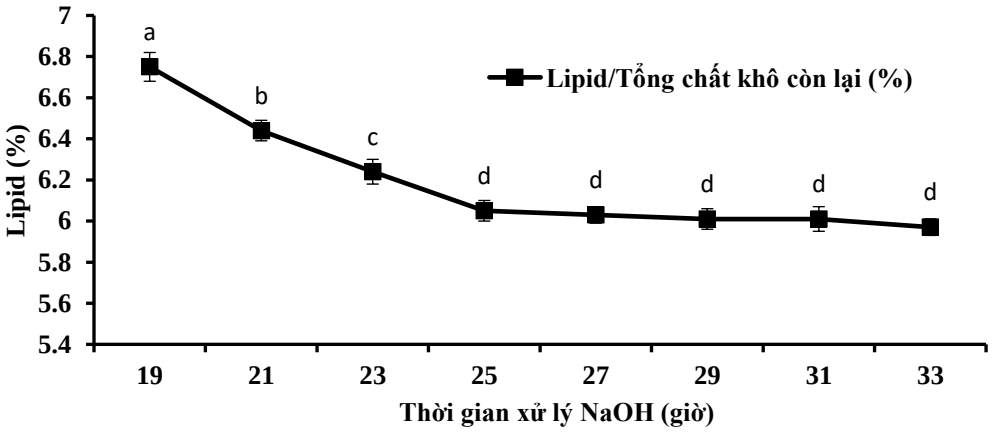
chọn vì cho tỷ lệ hyp/protein là cao nhất và hàm lượng lipid là thấp nhất, chứng tỏ độ tinh sạch phi collagen cho da cá là tốt nhất.

3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen trong da cá ngừ vây vàng

Nếu thời gian ngâm trong NaOH quá ngắn thì không đủ để lượng phi collagen bị loại bỏ đồng nghĩa với việc sản phẩm thu được còn nhiều tạp chất. Do vậy phải thực hiện khảo sát thời gian ngâm cần thiết để sản phẩm có lượng tạp chất là thấp nhất. Kết quả khảo sát thời gian ngâm NaOH được thể hiện ở Hình 3.3 và Hình 3.4.



Hình 3.3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen



Hình 3.4. Ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH đến quá trình loại bỏ lipid

Hình 3.3 và Hình 3.4 cho thấy thời gian xử lý càng dài thì hiệu suất khử tạp chất càng lớn. Tuy nhiên, nếu ngâm thời gian quá dài thì lượng collagen trong da cá

lại giảm đáng kể. Cụ thể, thời gian xử lý NaOH từ 19 giờ đến 25 giờ thì tỷ lệ hyp/protein có xu hướng tăng lên đến 9,6%, hàm lượng lipid giảm đến 6,05%. Tuy nhiên khoảng thời gian từ 25 giờ đến 29 giờ thì tỷ lệ hyp/protein và protein còn lại không có sự khác biệt ($p<0,05$) điều này cho thấy hàm lượng protein không phải là collagen đã bị loại bỏ đến mức cao nhất. Khi tiếp tục tăng thời gian ngâm trong dung dịch kiềm lên đến 33 giờ thì tỷ lệ hyp/protein lại giảm xuống còn 9% và hàm lượng lipid theo xu hướng giảm xuống còn 5,97%. Kết quả xử lý số liệu cho thấy sự thay đổi thời gian xử lý NaOH từ 29 giờ đến 33 giờ là không có ý nghĩa ($p<0,05$). Lý do của việc tăng hay giảm hàm lượng collagen là do thời gian ngâm càng lâu thì dung dịch kiềm sẽ cắt luôn mạch của collagen dẫn đến tổn thất collagen trong quá trình rửa nên hàm lượng hydroxyproline giảm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu trên da cá bơn ô liu (olive flounder), black rockfish, sea bass, red sea bream với thời gian ngâm là 24 giờ (Cho và ctv, 2014). Theo Cho và ctv (2005), điều kiện tối ưu để xử lý da cá ngừ vây vàng ở Hàn Quốc với thời gian xử lý 2,87 ngày. Tuy nhiên, theo Woo và ctv (2008), điều kiện tối ưu để xử lý da cá ngừ vây vàng cũng ở Hàn Quốc với thời gian xử lý là 24 giờ.

Từ Hình 3.3. và 3.4 cho thấy nếu xử lý bằng dung dịch NaOH ở mức thời gian là 25 giờ sẽ cho tỷ lệ hyp/protein cao nhất và tỷ lệ lipid thấp nhất. Vì vậy, thời gian xử lý bằng NaOH ở mức 25 giờ sẽ loại phi collagen trong da cá là tốt nhất.

3.1.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá đến quá trình loại bỏ phi collagen

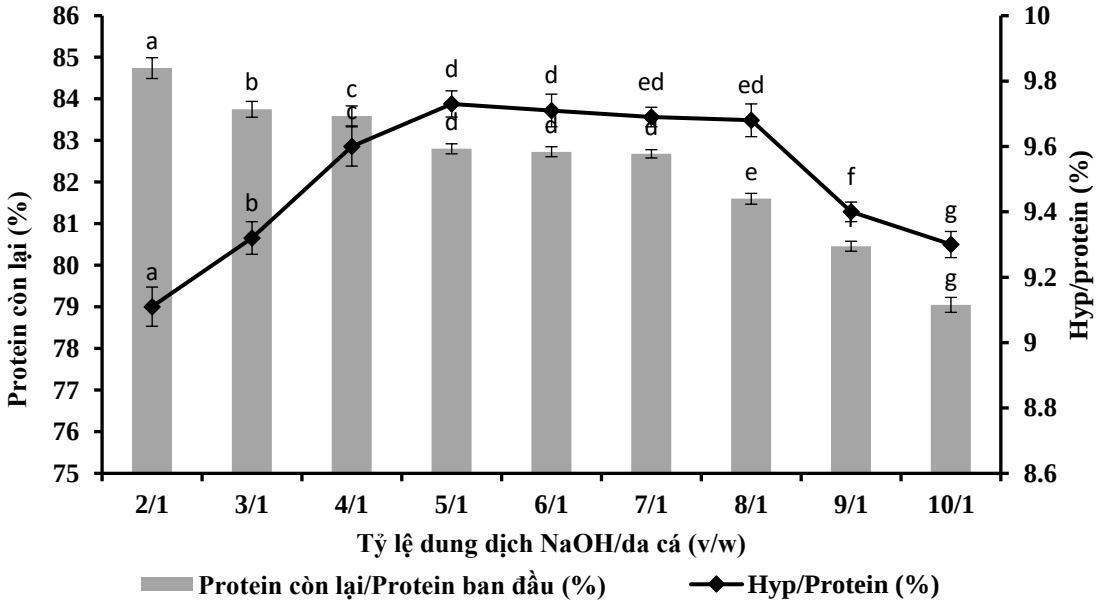
Tỷ lệ nguyên liệu so với dung dịch kiềm cũng là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình loại phi collagen trong da cá. Nếu sử dụng lượng lớn dung dịch kiềm thì xuất hiện các dấu hiệu tác động không có lợi cho mạch collagen của da cá, cụ thể là collagen ở trạng thái không bền nên dễ bị thủy phân thành những mạch ngắn, dung dịch xử lý có độ nhớt.

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 không tăng nữa. Ngoài

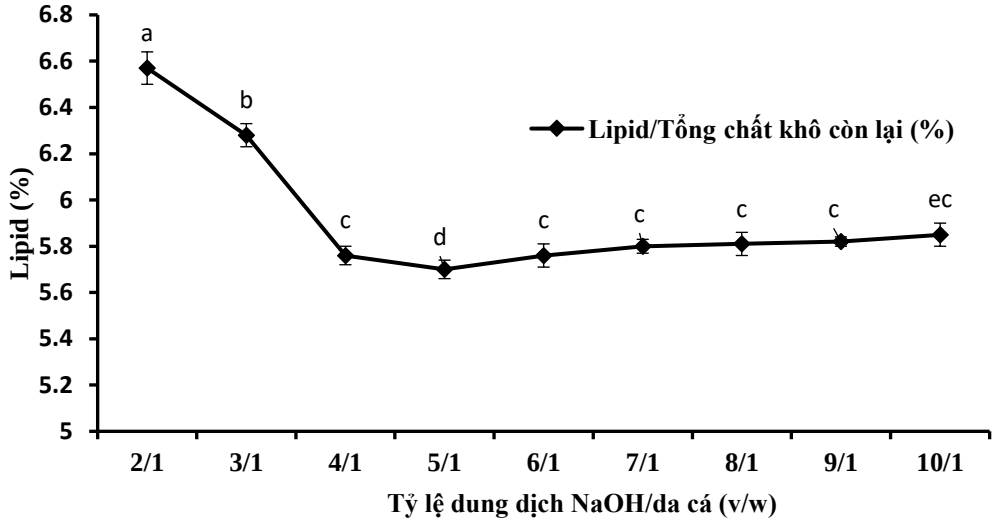
ra, nếu dùng lượng kiềm quá lớn để ngâm sẽ làm tăng chi phí và lãng phí hóa chất. Vì thế cần tìm ra tỷ lệ phù hợp đủ để khử các tạp chất và cho tỷ lệ collagen cao nhất. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Hình 3.5 và Hình 3.6 cho thấy tỷ lệ hyp/protein tăng từ 9,11% đến 9,73% khi tăng tỷ lệ NaOH/da cá từ 2/1 đến 5/1.

Hàm lượng lipid giảm đáng kể từ 6,57% đến 5,7%. Khi tăng tỷ lệ NaOH/da cá từ mức 6/1 đến 10/1 thì tỷ lệ hyp/protein giảm dần từ 9,61% xuống còn 9,3%. Tuy nhiên hàm lượng lipid lại tăng nhẹ từ 5,76% đến 5,85% không đáng kể. Khi tiến hành so sánh các cặp tỷ lệ với nhau thì có sự khác biệt có ý nghĩa ($p<0,05$).

Tỷ lệ dung dịch N aOH/da cá được khảo sát cho hiệu quả tối đa ở mức tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá là 5/1. Việc tăng hay giảm tỷ lệ hyp/protein và lipid trong khảo sát được giải thích như sau: Từ quan điểm kinh tế và hiệu quả cần xác định tỷ lệ dung dịch kiềm với da cá sao cho ở mức tối ưu cần thiết để loại bỏ các tạp chất phi collagen



Hình 3.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) đến quá trình loại bỏ phi collagen



Hình 3.6. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) đến quá trình loại bỏ lipid

Ở tỷ lệ dung dịch kiềm thấp thì thời gian loại bỏ các tạp chất lâu hơn do không đủ lượng kiềm làm trương nở da cá cũng như thủy phân các tạp chất và lipid có trong da nên tạp chất còn lại ở mức cao và cần nhiều thời gian hơn để làm sạch. Tỷ lệ dung dịch kiềm so với da cá càng cao thì tốc độ thủy phân sẽ được đẩy nhanh và quá trình loại bỏ tạp chất sẽ có hiệu quả hơn tiết kiệm thời gian cũng như hóa chất. Tuy nhiên trong nghiên cứu này cho thấy tỷ lệ dung dịch kiềm trong khoảng 5/1 đến 8/1 cho thấy không có sự khác biệt về việc loại bỏ phi collagen ($p < 0,05$). Với tỷ lệ trên dung dịch kiềm so với da cá lớn hơn 8/1 sẽ có thủy phân cả collagen làm giảm hiệu quả mong muốn.

Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Woo và ctv (2008), da ngừ vây vàng Hàn Quốc được xử lý với dung dịch NaOH có nồng độ 0,5N đến 1,3 N,với tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch NaOH là 1/5 (w/v) ở 9 ^{o}C; phù hợp với kết quả nghiên cứu của Cho và ctv (2005), khi xác định điều kiện tối ưu để xử lý da cá ngừ vây vàng ở Hàn Quốc là NaOH 1,89%, thời gian xử lý 2,87 ngày, tỷ lệ dung dịch ngâm là 8/1 (v/w), nhiệt độ ngâm 10 ^{o}C. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Woo và ctv (2008), điều kiện tối ưu để xử lý da cá ngừ vây vàng cũng ở Hàn Quốc là NaOH 0,92N, thời gian xử lý là 24 giờ, tỷ lệ dung dịch ngâm là 5/1(v/w) và nhiệt độ ngâm là 9 ^{o}C. Từ những nhận định nêu trên, tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá là 5/1 được chọn để loại bỏ phi collagen da cá.

3.1.5. Tối ưu hóa điều kiện xử lý NaOH

Từ kết quả thí nghiệm đơn yếu tố đã xác định được điều biên của các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình loại bỏ phi collagen để thực hiện thí nghiệm tối ưu hóa như sau:

Nồng độ NaOH (X_1): 0,8 N – 1,2 N; thời gian xử lý NaOH (X_2): 20 – 30 giờ; tỷ lệ thể tích NaOH/da cá (v/w) (X_3): 4:1 – 10:1 (Bảng 3.2)

Hai hàm mục tiêu là hydroxyproline/protein (hyp/protein) Y_1 (%) và hàm lượng lipid/chất khô Y_2 (%).

Bảng 3.2. Bảng giá trị thực và mã hóa của biến độc lập

Biến độc lập	Ký hiệu	Phạm vi giá trị các biến		
		-1	**0**	**1**
Nồng độ NaOH (N)	X_1	0,8	1	1,2
Thời gian xử lý (h)	X_2	20	25	30
Tỉ lệ thể tích NaOH/ da cá (v/w)	X_3	4:1	7:1	10:1

Thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện xử lý phi collagen trên da cá ngừ vây vàng bằng NaOH được thiết kế thí nghiệm theo phương pháp bề mặt đáp ứng (response surface methodology) (Box- Belnken,1960) với 3 lần thí nghiệm lặp lại tại điểm tâm và sử dụng phần mềm JMP để bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

3.1.5.1. Kiểm tra tính thích ứng của mô hình

Kết quả về tỷ lệ phần trăm của hydroxyproline/protein (Y_1,%) và tỷ lệ lipid còn lại so với chất khô (Y_2,%) thu được từ thí nghiệm tối ưu hóa được trình bày trong Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Kết quả thí nghiệm (Exp.) và kết quả dự đoán (Pred.) của Y1 và Y2 thu được từ thiết kế thí nghiệm theo Box-Behnken

STT	Giá trị biến thực			Hydroxyproline/protein (Y_1, %)		Lipid/chất khô (Y_2, %)	
	X_1	X_2	X_3	Exp.	Pred.	Exp.	Pred.
1	0,8	30	7	9,46±0,03	9,49	6,25±0,02	6,17
2	1,0	25	7	9,78±0,02	9,75	5,67±0,01	5,69
3	1,0	20	4	9,14±0,04	9,18	6,34±0,03	6,30
4	1,0	20	10	9,46±0,01	9,45	6,15±0,02	6,11
5	0,8	20	7	9,25±0,01	9,25	6,39±0,01	6,39
6	0,8	25	10	9,14±0,02	9,16	6,44±0,02	6,48
7	1,0	30	4	9,78±0,01	9,79	5,65±0,04	5,69
8	1,2	25	10	8,82±0,03	8,86	6,95±0,02	6,90
9	1,0	25	7	9,78±0,02	9,75	5,64±0,01	5,69
10	1,2	30	7	8,92±0,01	8,92	6,76±0,01	6,76
11	1,0	25	7	9,68±0,03	9,75	5,76±0,05	5,69
12	1,2	25	4	8,82±0,02	8,81	6,88±0,02	6,84
13	0,8	25	4	9,57±0,02	9,53	6,06±0,03	6,11
14	1,2	20	7	8,82±0,05	8,79	6,87±0,05	6,95
15	1,0	30	10	9,25±0,05	9,21	6,26±0,04	6,31

X_1: Nồng độ NaOH (N); X_2: Thời gian xử lý (h); X_3: Tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w)

Phân tích ANOVA (Bảng 3.4) cho thấy số liệu thí nghiệm phù hợp với mô hình đa thức bậc hai với hệ số xác định bội (R^2) cho các hàm mục tiêu Y_1 và Y_2 ở mức cao ($R^2 = 0,99$). Các giá trị dự đoán được kết hợp tốt với các giá trị thực nghiệm thu được từ thiết kế RSM (Bảng 3.3). Mặt khác, kết quả thống kê cũng chỉ ra rằng hai mô hình hồi quy bậc hai có ý nghĩa ($P < 0,001$) và Lack of fit ($P > 0,05$) trong mỗi mô hình. Vì vậy điều đó chứng minh rằng các mô hình bậc hai là đủ điều kiện để giải thích ảnh hưởng của các biến độc lập đối với hàm mục tiêu Y_1 và Y_2.

Các hệ số của mô hình đa thức bậc hai được xác định bằng cách sử dụng t ratio và P-value (mức ý nghĩa) và được liệt kê trong Bảng 3.4. Giá trị t-ratio và P-value (≤ 0.05) cho thấy tác động đáng kể hơn đến các biến phụ thuộc (Amin & Anggoro, 2004). Có thể thấy rằng hầu hết các biến độc lập có ảnh hưởng đáng kể đến Y_1 và Y_2, ngoại trừ tương tác của X_1 và X_2 (đối với Y_1 và Y_2) và tương tác của X_1 và X_3 vào Y_2.

Bảng 3.4. Hệ số của phương trình hồi quy của 2 hàm mục tiêu Y1 (%) và Y2 (%)

Hệ số của phương trình hồi quy	Phần trăm của hydroxyproline/protein (Y_1, %)		Phần trăm của lipid/chất khô còn lại (Y_2, %)	
	Hệ số của phương trình hồi quy	t value	Hệ số của phương trình hồi quy	t value
α_o	9,747		5,690	
Linear				
α_1	-0,255***	-12,84	0,290***	9,67
α_2	0,093**	4,66	-0,104*	-3,46
α_3	-0,080*	-4,03	0,109*	3,63
Quadratic				
α_{11}	-0,477***	-16,33	0,680***	15,40
α_{22}	-0,157**	-5,38	0,198**	4,47
α_{33}	-0,182**	-6,23	0,213**	4,81
Interaction				
α_{12}	-0,028	-0,98	0,008	0,18
α_{13}	0,108*	3,83	-0,078	-1,83
α_{23}	-0,213***	-7,57	0,200**	4,72
R^2	0,99		0,99	
P-value of lack of fit	0,56		0,31	

*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; α_o là hằng số, α_i, α_{ii} and α_{ij} là hệ số bậc nhất, bậc hai và tương tác của biến độc lập của phương trình hồi quy tương ứng.

3.1.5.2. Phân tích bề mặt đáp ứng

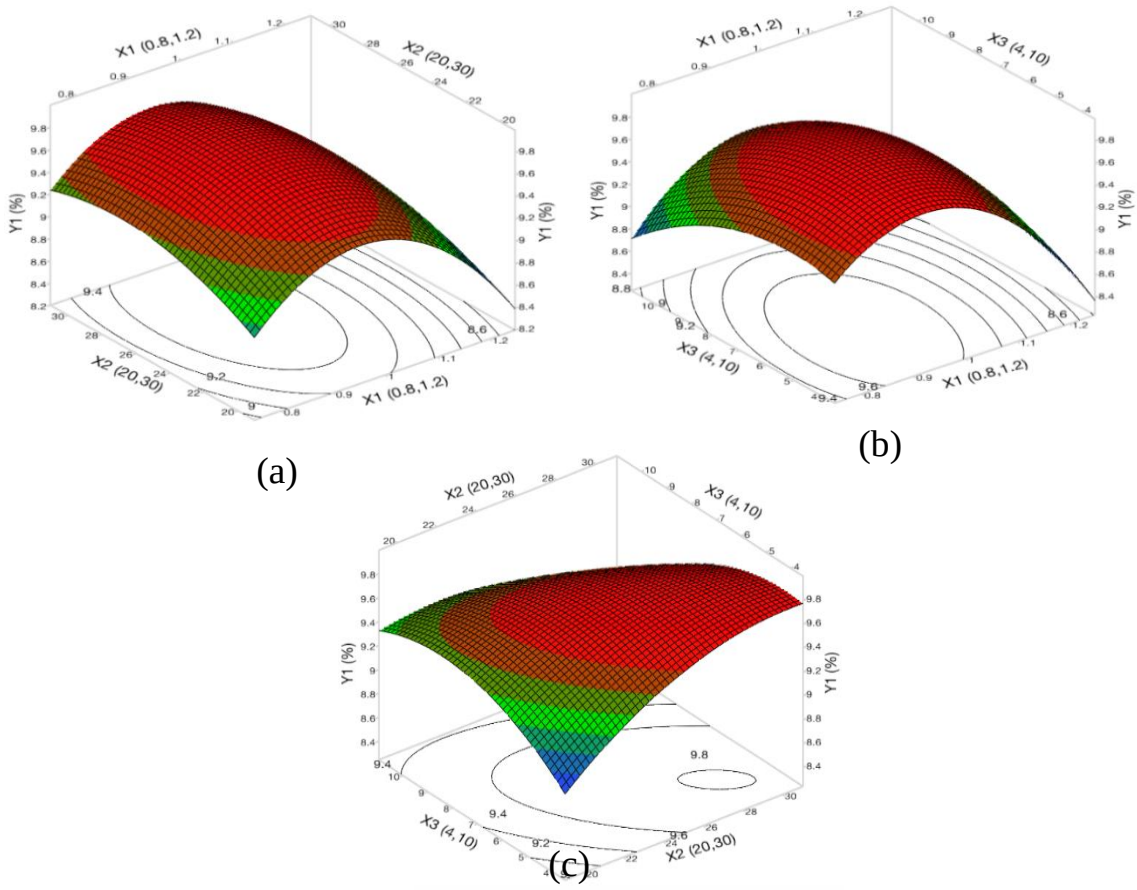
Giá trị tối ưu của hai hàm mục tiêu Y_1 và Y_2 có thể được xác định bằng cách sử dụng bề mặt 3D và họ đường đồng mức. Bề mặt đáp ứng thể hiện mối quan hệ giữa biến độc lập và hàm mục tiêu. Trong khi họ đường đồng mức cho thấy hình dạng của bề mặt đáp ứng. Vì vậy nó rất hữu dụng để đánh giá sự thích ứng của mô hình. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH (X_1), gian xử lý (X_2) và tỷ lệ của dung dịch NaOH/da cá (v/w) (X_3) lên tỷ lệ phần trăm của hydroxyproline/protein (Y_1) và phần trăm lipid còn lại so với chất khô (Y_2) được thể hiện trong Bảng 3.4 bởi các hệ số của mô hình bậc 2. Bề mặt đáp ứng và họ đường đồng mức dựa trên phương trình hồi quy được thể hiện ở Hình 3.7 và Hình 3.8.

Nói tóm lại, tất cả hệ số của phương trình hồi quy của mô hình được thể hiện sự tác động vào Y_1 và Y_2, ngoại trừ tương tác của X_1X_2 và X_1X_3 (chỉ cho Y_2). Do đó

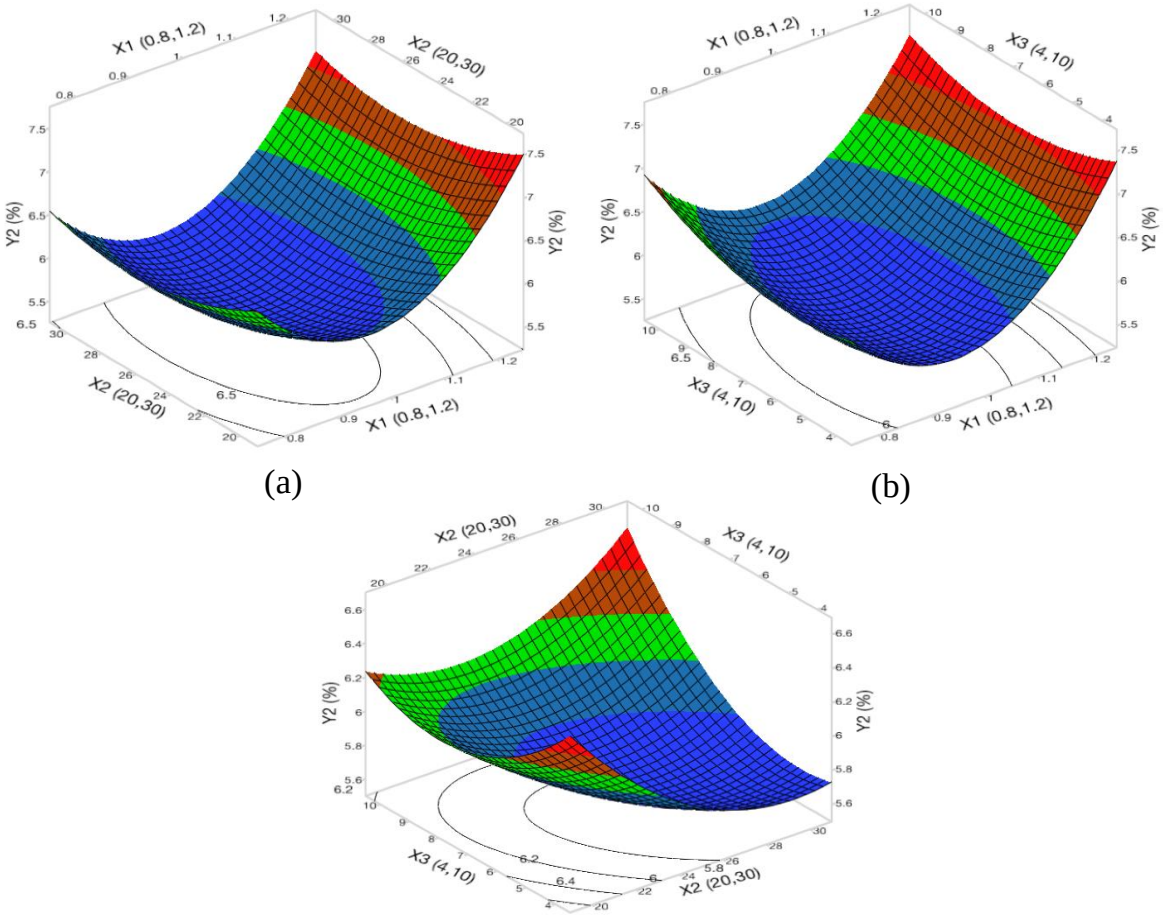
phương trình hồi quy của hàm mục tiêu Y_1 và Y_2 theo biến mã hóa được thiết lập như sau:

$$Y_1 = 9{,}747 - 0{,}255X_1 + 0{,}093X_2 - 0{,}080X_3 + 0{,}108X_1X_3 - 0{,}213X_2X_3 - 0{,}477X_1^2 - 0{,}157X_2^2 - 0{,}182X_3^2 \quad (1)$$

$$Y_2 = 5{,}690 + 0{,}290X_1 - 0{,}104X_2 + 0{,}109X_3 + 0{,}200X_2X_3 + 0{,}680X_1^2 + 0{,}198X_2^2 + 0{,}213X_3^2 \quad (2)$$



Hình 3.7. Bề mặt đáp ứng 3D và họ đường đồng mức 2D của (Y1) với ảnh hưởng của các biến độc lập X1, X2 và X3



Hình 3.8. Bề mặt đáp ứng 3D và họ đường đồng mức 2D của (Y2) với ảnh hưởng của các biến độc lập X1, X2 và X3

Tối ưu hóa bề mặt đáp ứng khi loại bỏ phi collagen

Hình 3.7 cho thấy ảnh hưởng của nồng độ NaOH, thời gian xử lý NaOH và tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá đến phần trăm của hydroxyproline so với protein. Nhìn chung có thể thấy rằng khi gia tăng nồng độ NaOH (từ 0,8 N đến 0,93 N Hình 3.7a) kết quả là tỷ lệ hudroxyproline/protein tăng. Điều này chỉ ra rằng khi tăng nồng độ NaOH thì hiệu quả loại bỏ phi collagen tăng. Tuy nhiên khi tăng nồng độ NaOH từ 0,93 N đến 1,2 N thì tỷ lệ hydroxyproline/protein giảm. Nó có thể được giải thích là do sự thủy phân collagen, dẫn đến giảm tỷ lệ hydroxyproline so với protein (Liu và ctv., 2015). Khi collagen bị mất cũng dẫn đến giảm chất khô, do đó tỷ lệ giữa lipid

và chất khô tăng. Kết quả này cũng tương tự trong nghiên cứu của Woo và ctv (2008), về xử lý phi collagen từ da lưng của cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*).

Khi gia tăng thời gian xử lý từ 20 đến 28 giờ (Hình 3.7) thì tỷ lệ hydroxyproline /protein cũng tăng. Nó cho thấy ảnh hưởng của thời gian xử lý kiềm đối với việc loại bỏ phi collagen. Tuy nhiên hiệu quả xử lý phi collagen vẫn không thay đổi khi kéo dài thời gian từ 28 đến 30 giờ. Điều này có thể được giải thích khi nồng độ NaOH và tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá là không thay đổi thì nồng độ chất tan vào dung dịch sau một thời gian sẽ đạt đến giá trị maximun và nồng độ chất tan sẽ thay đổi không đáng kể. Theo Woo và ctv (2008), thời gian xử lý là 24 giờ nhưng nhiệt độ xử lý là 9 °C. Tương tự, một nghiên cứu khác cho thấy điều kiện xử lý phi collagen cho da cá ngừ vây vàng bao gồm nhiệt độ, nồng độ NaOH và thời gian lần lượt là 10 °C, 1,89% và 2,87 ngày (Cho và ctv, 2005). Tuy nhiên kết quả của những nghiên cứu này vẫn không chỉ ra được tỷ lệ protein không phải là collagen đã được loại bỏ mà chỉ xác định các tính chất của collagen thu được. Điều mong muốn là xác định được độ tinh khiết của collagen thu được.

Mặt dù thời gian xử lý phụ thuộc vào nhiệt độ xử lý và nồng độ NaOH, nhưng hầu hết các nghiên cứu đã chỉ ra rằng để đạt được collagen chất lượng tốt khi nhiệt độ xử lý nhỏ hơn 10 °C do bản chất collagen là protein. Trong nghiên cứu này nhiệt độ xử lý được cố định là 4 °C trong quy trình tối ưu.

Tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) cũng ảnh hưởng đến loại bỏ phi collagen trên da cá ngừ vây vàng. Khi tăng tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá từ 4:1 đến 5:1(v/w) thì phi collagen bị loại bỏ tăng lên đáng kể. Trái lại cho thấy loại bỏ phi collagen giảm khi tiếp tục tăng tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w). Sự gia tăng này dẫn đến một lượng nhỏ collagen bị hòa tan vào dung môi, dẫn đến giảm hiệu quả của việc loại bỏ phi collagen. Theo Woo và ctv (2008), tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) được cố định là 5:1(v/w), trong khi Cho và ctv (2005), khuyến nghị tỷ lệ này là 8:1(v/w). Sự khác nhau này có thể là do điều kiện xử lý khác nhau như nhiệt độ và nồng độ NaOH.

Tối ưu hóa bề mặt đáp ứng khi loại bỏ lipid

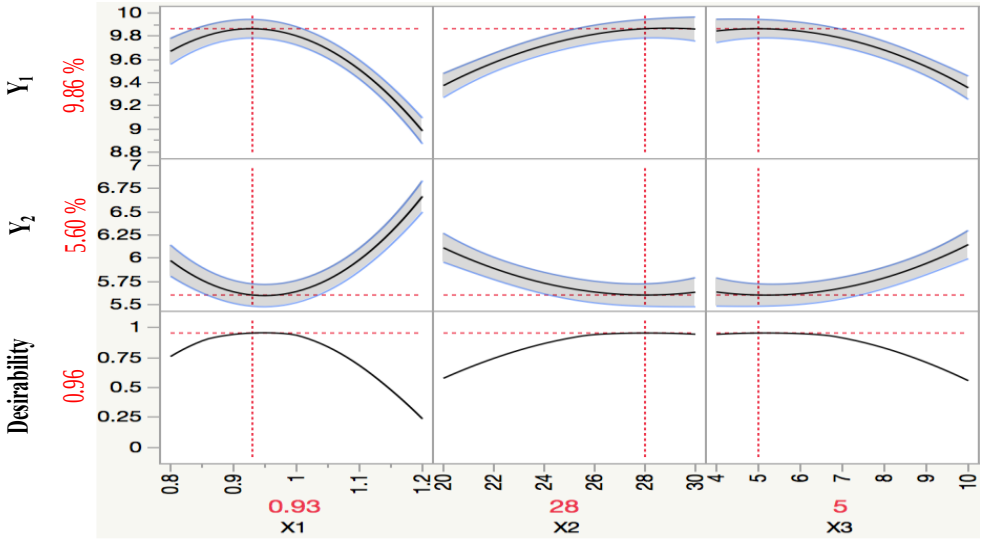
Theo Hình 3.8, ảnh hưởng của nồng độ NaOH, thời gian xử lý và tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá(v/w) đến tỷ lệ phần trăm lipid loại bỏ. Khi tăng nồng độ NaOH từ 0,8N đến 0,93 N thì phần trăm của lipid còn lại so với chất khô giảm có nghĩa là lượng lipid bị loại bỏ tăng. Như đã đề cập ở trên, lượng lipid còn lại tăng khi tăng nồng độ NaOH từ 0,93N đến 1,2 N. Điều này là do collagen bị mất khi tăng nồng độ NaOH làm giảm hàm lượng chất khô. Hơn nữa phần trăm lipid còn lại cũng tăng lên khi gia tăng tỷ lệ dung dịch NaOH /da cá khi tỷ lệ này lớn hơn 5:1(v/w). Vấn đề này có thể là do sự hòa tan lipid ít bị ảnh hưởng bởi tỷ lệ NaOH/da cá (v/w) mà chỉ phụ thuộc vào nồng độ NaOH. Trái lại khi tăng tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá thì hàm lượng chất khô giảm do protein bị hòa tan. Vì vậy tỷ lệ lipid còn lại so với chất khô tăng. Ngoài ra, lipid bên trong cấu trúc không hòa tan ở nồng độ kiềm cao, do đó không nên dùng nồng độ NaOH cao.

Khi tăng thời gian ngâm NaOH từ 20 đến 28 giờ, thì lượng lipid còn lại giảm (Hình 3.8). Tuy nhiên, hiệu quả loại bỏ lipid vẫn không thay đổi khi thời gian xử lý tăng từ 28 đến 30 giờ. Điều này có thể được giải thích rằng khi da được ngâm trong dung dịch NaOH, lipid trong da cá sẽ hòa tan vào dung dịch NaOH. Như vậy, sự chênh về nồng độ lipid trong dung dịch NaOH và trong da cá giảm dần theo thời gian ngâm. Do đó, sự di chuyển lipid từ da cá sang dung dịch đạt đến trạng thái cân bằng.

Điều kiện xử lý tối ưu tổng thể và xác nhận mô hình

Mục đích của nghiên cứu này là xác định điều kiện xử lý phi collagen của da cá ngừ vây vàng được thể hiện ở Hình 3.9. Mục tiêu quan trọng nhất là thu được tỷ lệ phần trăm của hydroxyproline/protein (Y_1) là cao nhất và phần trăm của lipid còn lại so với chất khô là thấp nhất (Y_2). Dựa vào Hình 3.9 dự đoán theo lý thuyết từ mô hình để hàm mục tiêu Y_1 đạt giá trị maximum và Y_2 đạt giá trị minnimum thì điều kiện xử lý như sau: nồng độ NaOH 0,93N (X_1), thời gian xử lý 28 giờ (X_2) và tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá là 5:1(v/w). Theo điều kiện dự đoán của mô hình, thí nghiệm kiểm chứng tại điều kiện tối ưu đã được tiến hành với 3 lần lặp lại và thu được kết quả ở Bảng 3.5. Kết quả thống kê chỉ ra rằng không có sự khác biệt đáng kể giữa kết

quả dự đoán và kết quả thực nghiệm của Y1 và Y2 (Bảng 3.5). Rõ ràng là các giá trị đo được của các hàm mục tiêu rất phù hợp với các dự đoán của mô hình hồi quy. Do đó, phương trình hồi quy bậc hai là phù hợp để dự đoán điều kiện tối ưu.



Hình 3.9. Dự đoán phần trăm của hydroxyproline/protein (Y1) và phần trăm còn lại của lipid (Y2) với các biến độc lập X1, X2 và X3

Bảng 3.5. Điều kiện tối ưu để loại bỏ phi collagen

Điều kiện tối ưu			**Y_1 (%)**		**Y_2 (%)**	
X_1 (N)	X_2 (h)	X_3 (v/w)	Dự đoán	Thực nghiệm	Dự đoán	Thực nghiệm
0,93	28	5/1	9,86[a]	9,94[a]	5,60[a]	5,50[a]

Nồng độ NaOH (X_1), thời gian xử lý (X_2), và tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) (X_3); phần trăm của hydroxyproline/protein (Y_1) và phần trăm của lipid còn lại/chất khô (Y_2)

Tóm lại, điều kiện tối ưu để loại bỏ phi collagen trên da cá ngừ vây vàng bằng NaOH: nồng độ NaOH 0,93N, thời gian xử lý 28 giờ và tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá là 5:1 (v/w). Kết quả thu được phần trăm của hydroxyproline/protein (Y_1) là cao nhất (9,94 %) và phần trăm của lipid còn lại/chất khô (Y_2) là nhỏ nhất (5,50 %).

Thành phần hóa học của da cá ngừ vây vàng sau khi xử lý để loại bỏ phi collagen

Kết quả cho thấy rằng khi xử lý da cá ngừ vây vàng với điều kiện: nồng độ NaOH 0,93 N; thời gian xử lý 28 giờ; tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá là 5:1(v/w) thì phần trăm của hydroxyproline/protein là maximun và phần trăm chất béo còn lại so

với chất khô là minimum. Thành phần amino axit của da cá đã xử lý được trình bày ở Bảng 3.6. Hơn nữa, thành phần của da cá ban đầu và da cá sau khi xử lý cũng được phân tích và so sánh (Bảng 3.7). Kết quả chỉ ra rằng hàm lượng protein và collagen trong da cá được xử lý ở điều kiện tối ưu cao hơn đáng kể so với hàm lượng của chúng trong da cá ban đầu.

Bảng 3.6. Thành phần amino acid của da cá ngừ vây vàng sau khi xử lý loại bỏ phi collagen

No	Amino axit	(g/100 g)
1	Arginine	1,6
2	Serine	1,0
3	Aspartic axit	1,7
4	Glutamic axit	2,1
5	Hyroxyproline	10,8
6	Glycine	23,4
7	Threonine	0,3
8	Alanine	5,1
9	Aminobutyric axit	0,5
10	Proline	20,3
11	Methionine	25,2
12	Tryptophane	0,1
13	Valine	0,1
14	Phenylalanine	1,3
15	Cysteine	0,9
16	Tyrosine	2,7
17	Isoleucine	0,5
18	Leucine	2,2
19	Ornthine	0,0
20	Lysine	0,1
21	Histidine	0,2

Bảng 3.7. Thành phần hóa học của da cá ngừ vây vàng trước và sau khi xử lý

Xử lý	Độ ẩm (%)	Protein thô (%, d.m.)	Collagen (%, d.m.)	Lipid thô (%, d.m.)	khoáng (%, d.m.)
Trước	$63,59^{a} \pm 0,78$	$87,94^{a} \pm 0,12$	$69,68^{a} \pm 0,07$	$11,07^{a} \pm 0,05$	$0,99^{a} \pm 0,02$
Sau	$77,69^{b} \pm 0,02$	$92,54^{b} \pm 0,03$	$85,58^{b} \pm 0,06$	$5,50^{b} \pm 0,02$	$1,6^{b} \pm 0,07$

Giá trị trung bình ± SD; (a–b) là những chỉ số thể hiện sự khác nhau ở mức ý nghĩa ($P < 0.05$)

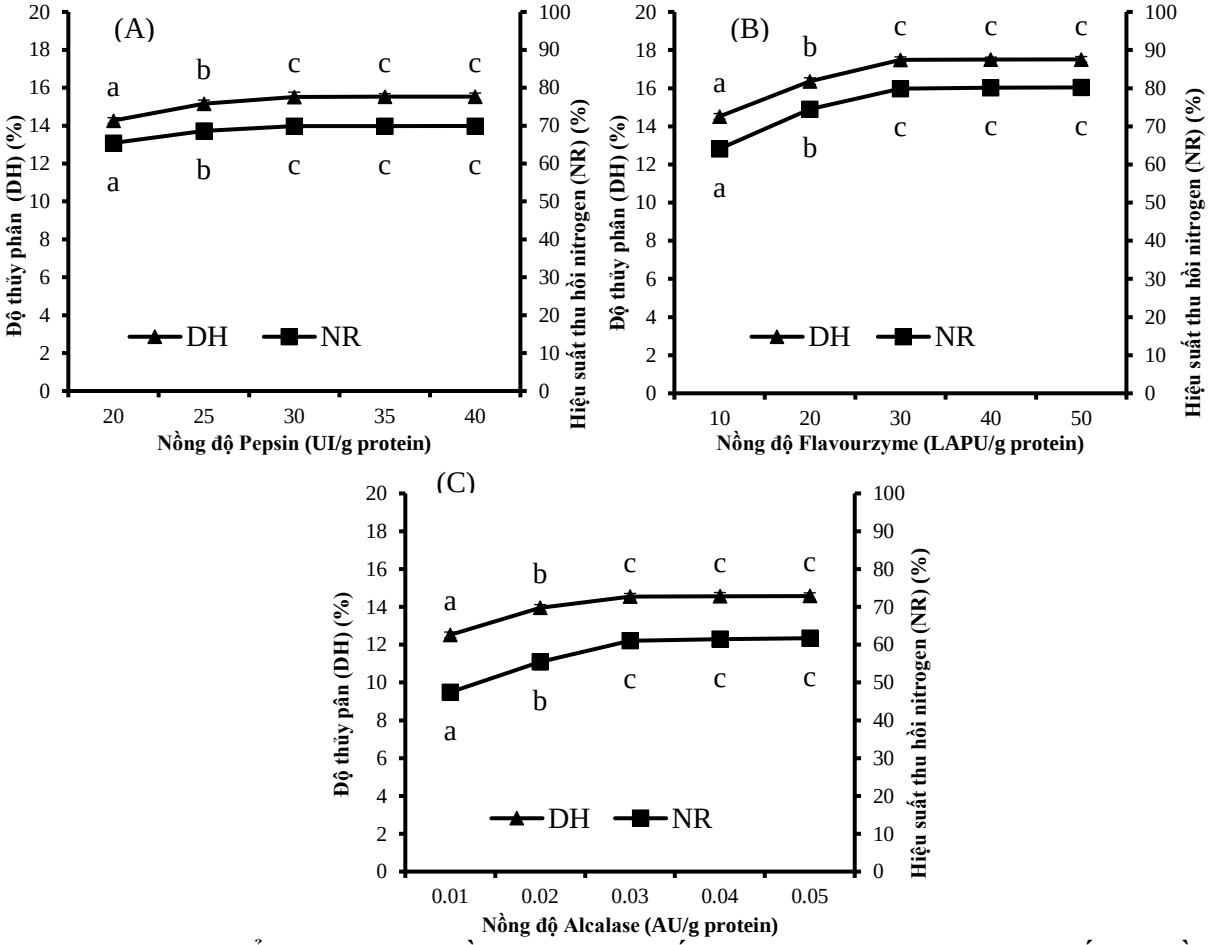
Trong nghiên cứu này, phương pháp tối ưu bằng bề mặt đáp ứng cho các điều kiện xử lý để loại bỏ phi collagen từ da cá ngừ vây vàng đã được kiểm tra bằng thực nghiệm. Việc xử lý da cá ban đầu có ảnh hưởng đến các bước tiếp theo và thành phần hóa học của da cá sau khi xử lý. So sánh trước và sau khi xử lý, kết quả cho thấy sự cải thiện đáng kể ở da cá được xử lý tối ưu, về mặt loại bỏ phi collagen và lipid, là cao hơn so với phương pháp không được xử lý. Nói chung, hệ số chuyển đổi từ hydroxyproline sang collagen có thể được xác định từ thành phần hydroxyproline. Bảng 3.6 cho thấy hàm lượng hydroxyproline là 10,8% so với tổng axit amin. Vì vậy ta có thể xác định được hệ số chuyển đổi từ hydroxyproline sang collagen (k) là 9,3. Hệ số chuyển đổi (k) này có thể được sử dụng để tính toán hàm lượng collagen từ hàm lượng hydroxyproline trong da cá ngừ vây vàng.

3.2. Thủy phân collagen trong da cá ngừ vây vàng bằng enzyme

3.2.1. Ảnh hưởng của loại enzyme và nồng độ enzyme đến độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR)

Ảnh hưởng của nồng enzyme pepsin vào độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR) được trình bày ở Hình 3.10A. DH và NR được nghiên cứu ở các nồng độ enzyme pepsin khác nhau (20, 25, 30, 35 và 40 NFU/g), trong khi các yếu tố khác được cố định như: nhiệt độ thủy phân 40 °C, pH 2 và thời gian thủy phân 5 giờ. DH và NR tăng lên khi tăng nồng độ pepsin tăng từ 20 đến 30 NFU/g và đạt giá trị cao nhất ở nồng độ pepsin là 30 NFU/g. Nếu tiếp tục tăng nồng độ pepsin từ 30 đến 40 NFU/g thì DH và NR thay đổi không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P \leq 0.05$). Do đó nồng độ pepsin được chọn là 30 NF U/g là điều kiện tốt nhất cho các thí nghiệm tiếp theo.

Hình 3.10B cho thấy ảnh hưởng của nồng độ enzyme flavourzyme đến độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR). DH và NR được khảo sát ở các nồng độ flavozyme (10, 20, 30, 40 và 50 LAPU/g với các yếu tố cố định như: nhiệt độ thủy phân 50 °C, pH 6 và thời gian thủy phân 5giờ. Khi tăng nồng độ flavourzyme từ 10 đến 30 LAP U/g thì DH và NR tăng nhanh, đạt giá trị lớn nhất ở nồng flavourzyme 30 LAPU/g. Nếu tiếp tục tăng nồng độ enzyme từ 30 đến 50 LAP U/g thì DH và NR tăng không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P \leq 0.05$). Vì vậy nồng độ của enzyme flavourzyme 30 LAPU/g được chọn là nồng độ tốt nhất để thủy phân collagen da cá ngừ vây vàng.



Hình 3.10. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR)

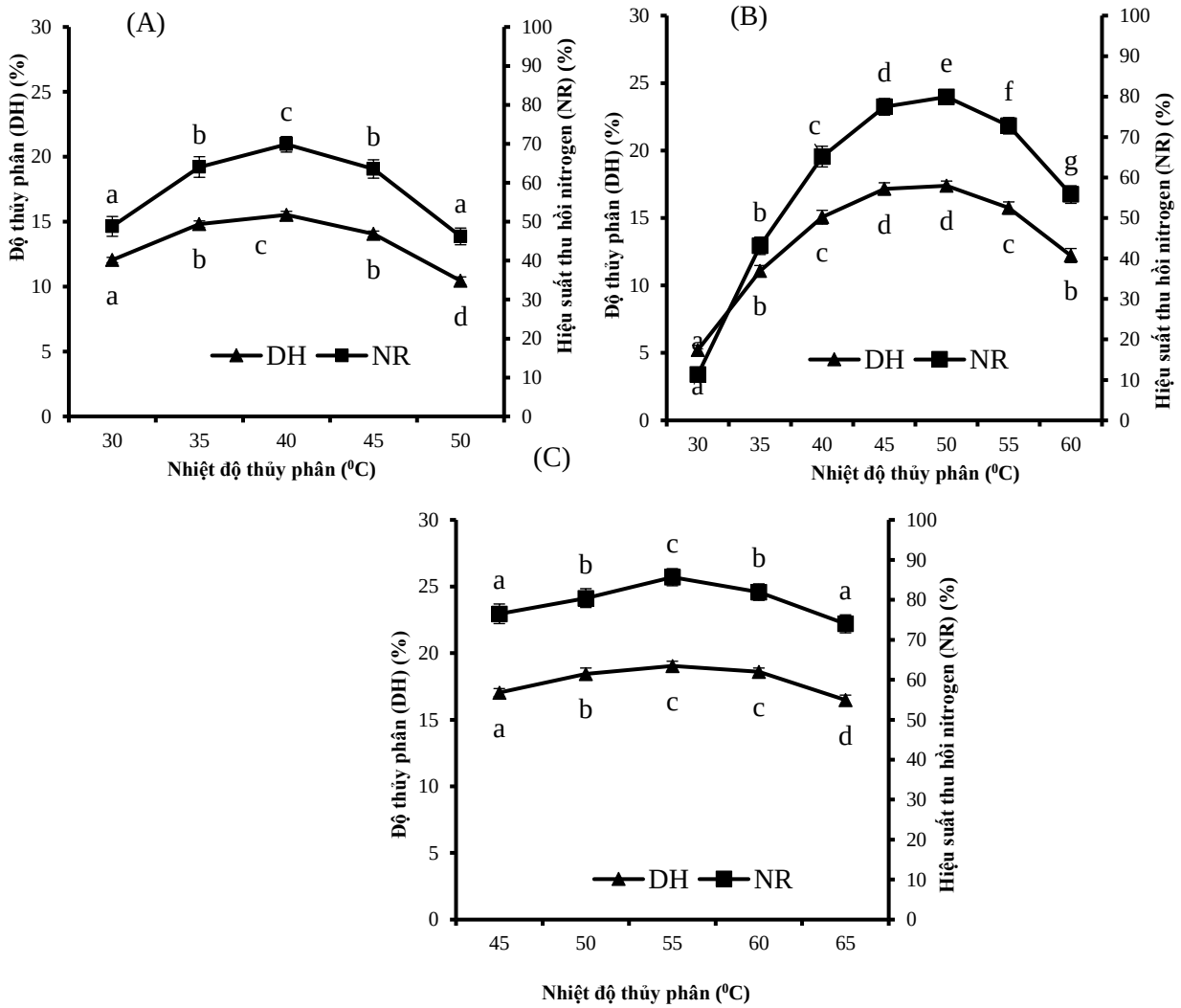
(A): Enzyme pepsin; (B): Enzyme flavourzyme; (C): Enzyme alcalase

Ảnh hưởng của nồng độ alcalase đến độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR) được thể hiện trong Hình 3.10C. DH và NR được thực hiện ở các nồng độ alcalase khác nhau (0,01, 0,02, 0,03, 0,04 và 0,05 AU/g) trong khi các điều kiện khác được cố định như sau: Nhiệt độ thủy phân 50 °C, pH 7 và thời gian thủy phân 5 giờ. DH và NR tăng nhanh khi tăng nồng độ alcalase và đạt giá trị lớn nhất ở nồng độ alcalase 0,03 AU/g. Sau đó, cả hai không thay đổi đáng kể khi nồng độ alcalase trên 0,03 AU/g. Do đó, nồng độ alcalase 0,03 AU/g được chọn làm nồng độ cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến DH và NR

Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến DH và NR của enzyme pepsin được trình bày ở Hình 3.11A. DH và NR được xác định ở các nhiệt độ thủy phân khác nhau: 30, 35, 40, 45 and 50 °C. Các điều khác được cố định như: nồng độ enzyme pepsin 30 NFU/g, pH 2 và thời gian thủy phân 5 giờ. DH và NR đạt giá trị cao nhất ở nhiệt độ 40 °C (Hình 3.11A). Khi tăng nhiệt độ lớn hơn 40 °C thì DH và NR giảm điều này có thể giải thích là nhiệt độ trên 40 °C là nhiệt độ không thích hợp cho enzyme pepsin hoạt động. Vì vậy 40 °C là nhiệt độ thích hợp cho enzyme pepsin hoạt động.

Hình 3.11B cho thấy ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến DH và NR của enzyme flavourzyme. Thí nghiệm được tiến hành ở các nhiệt độ khác nhau: 30, 35, 40, 45, 50,55 và 60 °C. Các điều kiện khác được cố định như: nồng độ enzyme flavourzyme 30 LAPU/g, pH 6 và thời gian thủy phân 5 giờ. Khi tăng nhiệt độ từ 30 đến 50 °C thì DH và NR tăng nhanh. Tuy nhiên, nếu tăng nhiệt độ lên hơn 50 °C thì DH và NR giảm, vì khi tăng nhiệt độ lên cao hơn nhiệt độ thích hợp của enzyme thì enzyme bị bất hoạt làm cho khả năng xúc tác của enzyme giảm. Vì vậy trong nghiên cứu này, 50 °C là nhiệt độ thích hợp cho enzyme flavourzyme hoạt động.



Hình 3.11. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR)

(A): Enzyme pepsin; (B): Enzyme flavourzyme; (C): Enzyme alcalase

Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến DH và NR của enzyme alcalase được thể hiện trong Hình 3.11C. DH và NR được xác định ở các nhiệt độ thủy phân khác nhau: 45, 50, 55, 60 và 65 °C; cố định các điều kiện thí nghiệm khác như: nồng độ alcalase 0,03 AU/g, pH 7 và thời gian thủy phân 3 giờ. Có thể thấy DH và NR tăng lên khi nhiệt độ thủy phân tăng từ 45 đến 55 °C. Sau đó, chúng giảm đáng kể ở nhiệt độ trên 55 °C. Có thể nhiệt độ trên 55 °C là nhiệt độ không phù hợp cho các enzyme

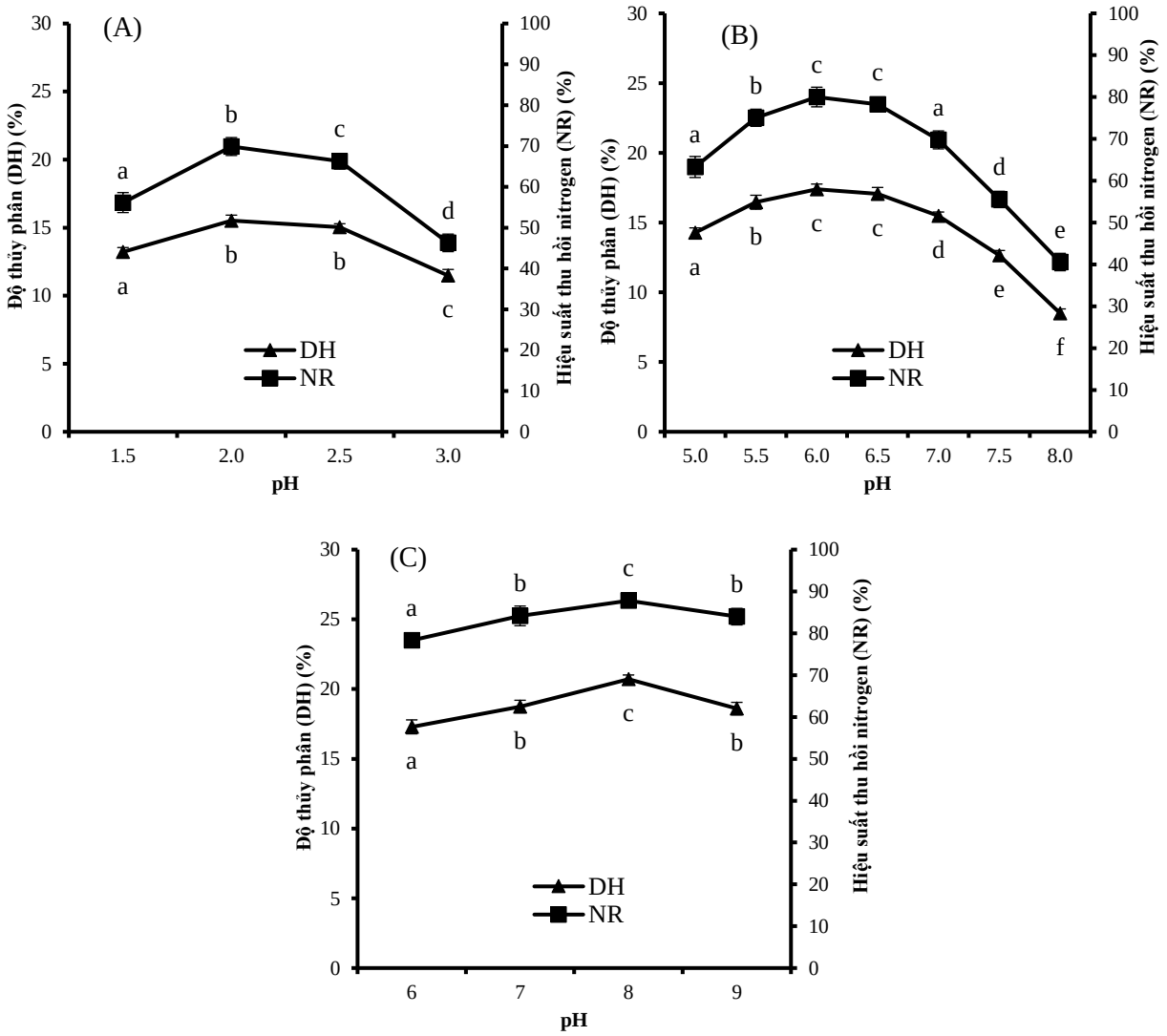
alcalase hoạt động. Do đó, trong nghiên cứu này 55 °C là nhiệt độ phù hợp cho alcalase để DH và NR cao nhất.

3.2.3. Ảnh hưởng của pH đến DH và NR

Để nghiên cứu ảnh hưởng của pH thủy phân đến độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR), thí nghiệm được bố trí ở các giá trị pH tương ứng là 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0; các thông số thủy phân khác được cố định là nồng độ pepsin: 30 NFU/g; nhiệt độ thủy phân 40 °C và thời gian thủy phân 5giờ. Hình 3.12A cho thấy DH và NR tăng lên khi tăng độ pH thủy phân từ 1,5 lên 2,0. Khi thủy phân pH ≥ 2, DH và NR giảm. Có thể pH trên 2 là pH không phù hợp với enzyme pepsin hoạt động. Do đó, pH 2,0 đã được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Để nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến DH và NR của enzyme flavourzyme, các giá trị pH được khảo sát là 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0. Các tham số khác được cố định như: nồng độ enzyme flavourzyme 30 LAPU/g; nhiệt độ thủy phân 50 °C; thời gian thủy phân 5giờ, kết quả thu được ở Hình 3.12B. DH và NR tăng lên khi tăng pH từ 5,0 đến 6,0. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng pH từ 6,0 đến 8,0 thì DH và NR giảm. Vì vậy có thể kết luận rằng pH 6,0 là thích hợp để enzyme flavourzyme thủy phân collagen của da cá ngừ vây vàng. Do đó, pH 6,0 đã được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Để nghiên cứu ảnh hưởng của pH thủy phân đến DH và NR của enzyme alcalase, pH thủy phân được khảo sát tương ứng là 6, 7, 8 và 9; Ba thông số thủy phân khác được cố định là nồng độ alcalase 0,03 AU/g, nhiệt độ thủy phân 55 °C và thời gian thủy phân 5 giờ. Kết quả thu được ở Hình 3.12C cho thấy DH và NR tăng lên khi tăng pH thủy phân từ 6 đến 8. Khi pH thủy phân cao hơn 8 thì DH và NR giảm. Như vậy pH trên 8 và dưới 8 là pH không phù hợp cho enzyme alcalase hoạt động. Do đó, pH 8 được chọn là pH thích hợp và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

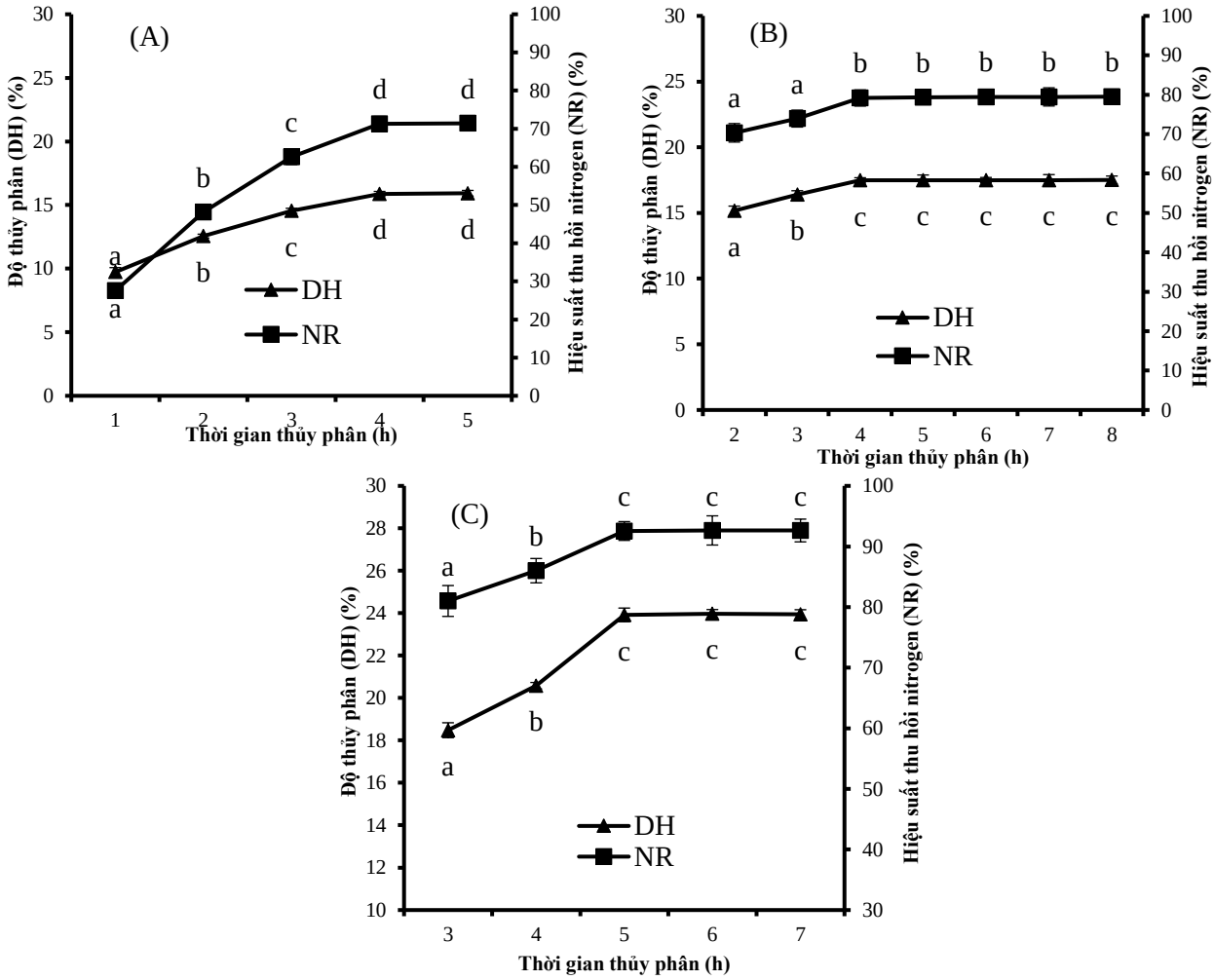


Hình 3.12. Ảnh hưởng của pH đến độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR)
(A): Enzyme pepsin; (B): Enzyme flavourzyme; (C): Enzyme alcalase

3.2.4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến DH và NR

Hình 3.13A cho thấy ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến DH và NR của enzyme pepsin. Thời gian thủy phân được khảo sát là 1, 2, 3, 4 và 5 giờ. Các thông số khác được cố định: nồng độ enzyme pepsin 30 NFU/g, nhiệt độ thủy phân là 40 °C, và pH 2. DH và NR tăng nhanh khi tăng thời gian từ 1 giờ đến 4 giờ và đạt giá trị cao nhất ở 4 giờ. Khi tiếp tục tăng thời gian từ 4 giờ đến 5 giờ thì DH và NR thay đổi không đáng kể. Vì vậy có thể chọn thời gian thủy phân thích hợp của enzyme pepsin là 4 giờ.

Để nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến DH và NR của enzyme flavourzyme, thời gian thủy phân được khảo sát là 2, 3, 4, 5, 6, 7 và 8 giờ. Các tham số khác được cố định như: nồng độ enzyme flavourzyme 30 LAPU/g; nhiệt độ thủy phân 50 °C; pH 6,0 và kết quả thu được ở Hình 3.13B. DH và NR đạt giá trị cao nhất khi thời gian thủy phân là 4 giờ. Nếu tiếp tục tăng thời gian thủy phân từ 4 giờ đến 8 giờ thì DH và NR tăng lên không đáng kể so với thời gian thủy phân là 4 giờ. Vì vậy trong nghiên cứu này thời gian thủy phân của alcalase thích hợp là 4giờ.



Hình 3.13. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR)

(A): Enzyme pepsin; (B): Enzyme flavourzyme; (C): Enzyme alcalase

Hình 3.13C cho thấy ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến DH và NR khi thời gian thủy phân được khảo sát ở 3, 4, 5, 6 và 7 giờ; các thông số thủy phân khác

được cố định như sau: nồng độ alcalase 0,03 AU/g, nhiệt độ thủy phân 55 °C và pH 8. DH và NR tăng nhanh với thời gian thủy phân tăng lên và đạt giá trị cao nhất sau 5 giờ thủy phân. Sau đó, cả hai thay đổi không đáng kể (trên 5 giờ), có thể do phản ứng thủy phân đã kết thúc. Vì vậy, 5giờ là thời gian thích hợp DH và NR đạt giá trị cao nhất.

Tóm lại, điều kiện thích hợp để thủy phân collagen của da cá ngừ vây vàng bằng enzyme pepsin, flavourzyme và alcalase được thể hiện trong Bảng 3.8

Bảng 3.8. Điều kiện thủy phân thích hợp để thủy phân collagen từ da cá ngừ vây vàng

STT	Enzyme	Nồng độ E/S	Nhiệt độ (°C)	pH	Thời gian (giờ)	DH (%)	NR (%)
1	Pepsin	30 NFU/g	40	2,0	4	15,78±0,20	71,31±1,91
2	Flavourzyme	30 LAPU/g	50	6,0	4	17,4±0,20	79,17±2,05
3	Alcalase	0,03AU/g	55	8,0	5	23,92±0,32	92,56±1,55

Bảng 3.8 cho thấy độ thủy phân và hiệu suất thu hồi nitrogen của alcalase là cao nhất. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Qiu và ctv (2019) khi thủy phụ phẩm cá ngừ sọc dưa (Skipjack Tuna - *Katsuwonus pelamis*) bằng enzyme pepsin và alcalase thì độ thủy phân của alcalase lớn hơn pepsin và flavourzyme. Vì vậy enzyme alcalase được chọn để nghiên cứu tiếp theo.

3.2.5. Tối ưu hóa điều kiện thủy phân của enzyme alcalase

Từ kết quả thí nghiệm đơn yếu tố đã xác định được điều biên của các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân collagen từ da cá ngừ vây vàng bằng enzyme alcalase để thực hiện thí nghiệm tối ưu hóa như sau:

Nhiệt độ thủy phân (X_1): 50 – 60°C; pH (X_2): 7 – 9; nồng độ của enzyme alcalase (AU/g) (X_3): 0,02 – 0,04; thời gian thủy phân (giờ) X_4): 4 – 6 (Bảng 3.9).

Hai hàm mục tiêu là độ thủy phân (DH) Y_1 (%) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR) Y_2 (%).

Bảng 3.9. Giá trị thực và mã hóa của biến độc lập

Biến độc lập	Ký hiệu	Phạm vi của biến		
		-1	0	1
Nhiệt độ thủy phân (°C)	X_1	50	55	60
pH	X_2	7	8	9
Nồng độ của enzyme alcalase (AU/g)	X_3	0,02	0,03	0,04
Thời gian thủy phân (giờ)	X_4	4	5	6

Thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện thủy phân collagen trên da cá ngừ vây vàng bằng enzyme alcalase được thiết kế thí nghiệm theo phương pháp bề mặt đáp ứng (response surface methodology) (Box- Belnken,1960) với 3 lần thí nghiệm lặp lại tại điểm tâm và sử dụng phần mềm JMP để bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

3.2.5.1. Kiểm tra tính thích ứng của mô hình và phân tích dữ liệu

Các biến phụ thuộc Y_1 (DH%) và Y_2 (NR%) được trình bày trong Bảng 3.10. 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 ($P < 0,05$), giá trị R^2 và Lack of fit của mô hình (Bảng 3.11 và Bảng 3.12). Cả hai biến phụ thuộc Y1 và Y2 đều có các hệ số tương quan $R^2 \geq 0,98$ với giá trị P tương ứng là 0,0001 và 0,0001. Lack of fit của cả hai mô hình có giá trị P lần lượt là 0,7801 và 0,1004, không có ý nghĩa thống kê ($P< 0,05$). Do đó, cả hai mô hình thử nghiệm cho hai giá trị phụ thuộc Y_1 và Y_2 đều phù hợp.

Bảng 3.10. Kết quả Y1 và Y2 được thực hiện từ thiết kế thí nghiệm theo Box-Behnken

STT	Biến mã				Biến thực				Y_1	Y_2
	x_1	x_2	x_3	x_4	X_1	X_2	X_3	X_4		
1	+1	0	-1	0	60	8	0,02	5	7,75±0,05	33,09±0,52
2	+1	0	+1	0	60	8	0,04	5	9,94±0,07	44,25±0,73
3	-1	-1	0	0	50	7	0,03	5	8,75±0,02	41,04±0,85
4	-1	0	+1	0	50	8	0,04	5	12,81±0.04	52,08±0,25
5	-1	0	0	+1	50	8	0,03	6	12,22±0,03	49,78±0,76
6	0	-1	+1	0	55	7	0,04	5	18,72±0,06	84,43±0,28
7	0	-1	0	-1	55	7	0,03	4	12,36±0,01	50,01±0,63
8	0	0	0	0	55	8	0,03	5	23,99±0,02	93,29±0,34
9	+1	0	0	+1	60	8	0,03	6	9,80±0,01	44,05±0.21
10	0	0	+1	+1	55	8	0,04	6	25,00±0,03	93,72±0,28
11	0	+1	0	-1	55	9	0,03	4	11,14±0,03	46,75±0,32
12	0	0	-1	-1	55	8	0,02	4	17,10±0,05	77,92±0,45
13	-1	+1	0	0	50	9	0,03	5	7,02±0,06	31,46±0,19
14	0	0	0	0	55	8	0,03	5	24,49±0,04	93,35±0,15
15	0	0	-1	+1	55	8	0,02	6	12,11±0,01	48,38±0,31
16	+1	0	0	-1	60	8	0,03	4	5,85±0,04	27,19±0,22
17	0	+1	-1	0	55	9	0,02	5	12,55±0,06	50,47±0,29
18	+1	+1	0	0	60	9	0,03	5	5,07±0,02	23,45±0,15
19	0	0	+1	-1	55	8	0,04	4	14,47±0,07	61,05±0,62
20	0	-1	0	+1	55	7	0,03	6	14,97±0,03	65,42±0,17
21	0	+1	+1	0	55	9	0,04	5	11,56±0,02	47,17±0,23
22	-1	0	0	-1	50	8	0,03	4	7,04±0,01	33,76±0,24
23	0	+1	0	+1	55	9	0,03	6	14,02±0,04	58,12±0,31
24	+1	-1	0	0	60	7	0,03	5	5,75±0,03	24,07±0,17
25	0	0	0	0	55	8	0,03	5	22,05±0,04	90,26±0,19
26	0	-1	-1	0	55	7	0,02	5	9,14±0,05	42,79±0,34
27	-1	0	-1	0	50	8	0,02	5	6,15±0,01	29,35±0,23

X_1: Nhiệt độ thủy phân (°C); X_2: pH; X_3: Nồng độ Alcalase (AU/g); X_4: Thời gian thủy phân (h); Y_1: DH (%), Y_2: NR (%)

Bảng 3.11. Phân tích (ANOVA) cho hàm mục tiêu Y1 (%)

Source	DF	SS	MS	F-value	P-value	R^2
Model	14	891,964	63,712	60,139	0,0001	0,996
Error	12	12,713	1,059			
C.Total	26	904,677				
Lack of fit	10	9,391	29,191	0,565	0,7801	
Pure Error	2	3,322	3,122			
Total Error	12	12,713				

DF: Bậc tự do, SS: Tổng bình phương, MS: Bình phương trung bình

Bảng 3.12. Phân tích (ANOVA) cho hàm mục tiêu Y2 (%)

Source	**DF**	**SS**	**MS**	**F-value**	**P-value**	R^2
Model	14	12543,687	895,978	36,061	0,0001	0,98
Error	12	298,152	24,846			
C.Total	26	12841,839				
Lack of fit	10	291,90814	29,191	9,350	0,1004	
Pure Error	2	6,24420	3,122			
Total Error	12	298,15234				

DF: Bậc tự do, SS: Tổng bình phương, MS: Bình phương trung bình

Hệ số của phương trình hồi quy Y_1 và Y_2 được xác định dựa vào giá trị của P-value trong Bảng 3.13 và Bảng 3.14. Hệ số của các tham số được chấp nhận khi P-value của các tham số $\leq 0,05$ ($P < 0.05$).

Bảng 3.13. Xác định các hệ số của phương trình hồi cho hàm mục tiêu Y1 (DH, %)

Parameter	Estimated coefficients	Standard error	t-Value	P-value
Intercept	23,510	0,594	39,56	<,0001*
X_1	-0,819	0,297	-2,76	0,0174*
X_2	-0,694	0,297	-2,34	0,0376*
X_3	2,308	0,297	7,77	<,0001*
X_4	1,680	0,297	5,65	0,0001*
$X_1{}^*X_2$	0,263	0,515	0,51	0,6193
$X_1{}^*X_3$	-1,118	0,515	-2,17	0,0507
$X_2{}^*X_3$	-2,643	0,515	-5,13	0,0002*
$X_1{}^*X_4$	-0,308	0,515	-0,60	0,5613
$X_{2*}X_4$	0,068	0,515	0,13	0,8978
$X_3{}^*X_4$	3,880	0,515	7,54	<,0001*
$X_1{}^*X_1$	-10,790	0,446	-24,21	<,0001*
$X_2{}^*X_2$	-6,678	0,446	-14,98	<,0001*
$X_3{}^*X_3$	-3,396	0,446	-7,62	<,0001*
$X_4{}^*X_4$	-3,549	0,446	-7,96	<,0001*

X_1: Nhiệt độ thủy phân (^{0}C); X_2: pH; X_3: Nồng độ Alcalase (AU/g); X_4: Thời gian thủy phân (h)

Bảng 3.14. Xác định các hệ số của phương trình hồi cho hàm mục tiêu Y2 (NR, %)

Parameter	Estimated coefficients	Standard error	t-Value	P-value
Intercept	92,300	2,878	32,07	<,0001*
X_1	-3,448	1,439	-2,40	0,0338
X_2	-4,195	1,439	-2,92	0,0130
X_3	8,392	1,439	5,83	<,0001*
X_4	5,233	1,439	3,64	0,0034*
$X_1{}^*X_2$	2,240	2,492	0,90	0,3865
$X_1{}^*X_3$	-2,893	2,492	-1,16	0,2684
$X_2{}^*X_3$	-11,235	2,492	-4,51	0,0007*
$X_1{}^*X_4$	0,210	2,492	0,08	0,9342
$X_2{}^*X_4$	-1,010	2,492	-0,41	0,6924
$X_3{}^*X_4$	15,553	2,492	6,24	<,0001*
$X_1{}^*X_1$	-40,279	2,158	-18,66	<,0001*
$X_2{}^*X_2$	-23,828	2,158	-11,04	<,0001*
$X_3{}^*X_3$	-11,388	2,158	-5,28	0,0002*
$X_4{}^*X_4$	-12,456	2,158	-5,77	<,0001*

X_1: Nhiệt độ thủy phân (^{0}C); X_2: pH; X_3: Nồng độ Alcalase (AU/g); X_4: Thời gian thủy phân (h)

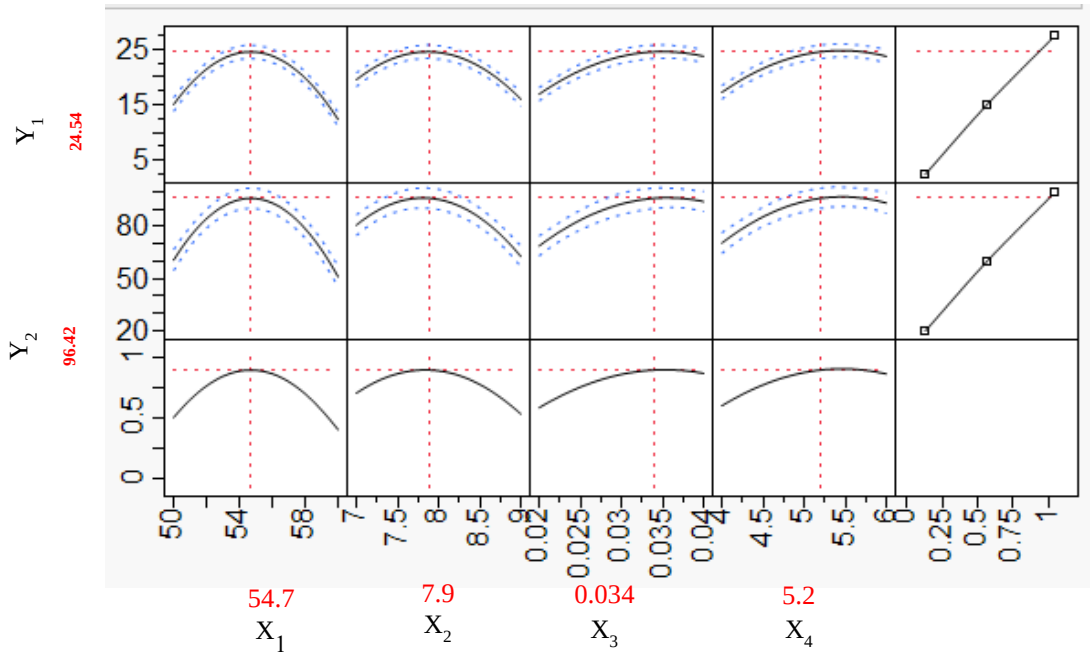
Bảng 3.13 và Bảng 3.14, phương trình hồi quy của hàm mục tiêu Y_1 và Y_2 được thiết lập như sau:

$$Y_1 = 23{,}510 - 0{,}8197X_1 - 0{,}694X_2 + 2{,}308X_3 + 1{,}680X_4 - 2{,}643X_2X_3 + 3{,}880X_3X_4 - 10{,}790X_1^2 - 6{,}678X_2^2 - 3{,}396X_3^2 - 3{,}549X_4^2$$

$$Y_2 = 92{,}300 - 3{,}448X_1 - 4{,}195X_2 + 8{,}392X_3 + 5{,}233X_4 - 11{,}235X_2X_3 + 15{,}553X_3X_4 - 40{,}279X_1^2 - 23{,}828X_2^2 - 11{,}388X_3^2 - 12{,}456X_4^2$$

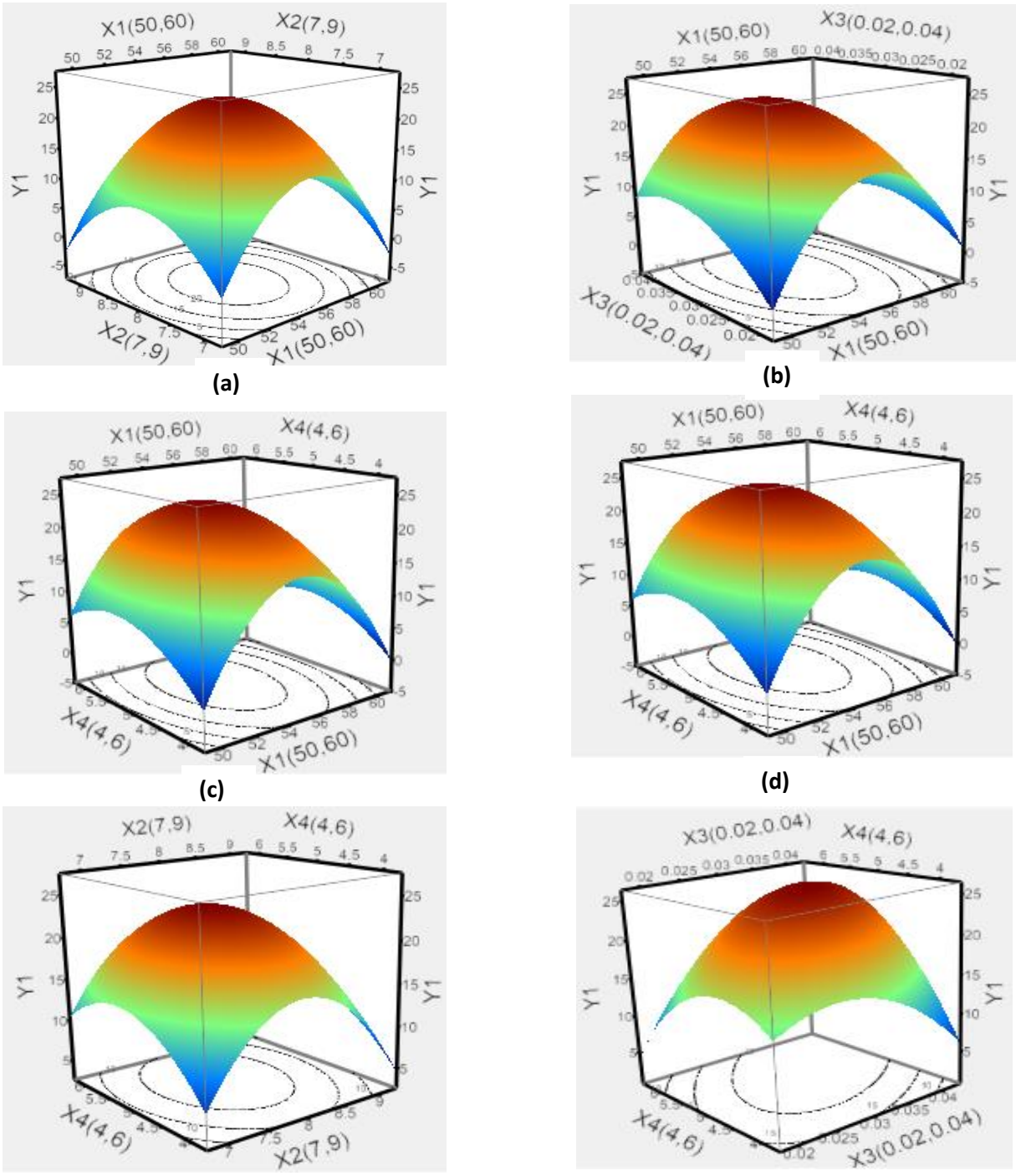
3.2.5.2. Điều kiện tối ưu

Sơ đồ bề mặt đáp ứng ba chiều thể hiện sự kết hợp các yếu tố khác nhau và dự đoán độ thủy phân (Y_1) và hiệu suất thu hồi nitrogen (Y_2) với các biến độc lập X_1, X_2, X_3 và X_4 (Hình 3.14)

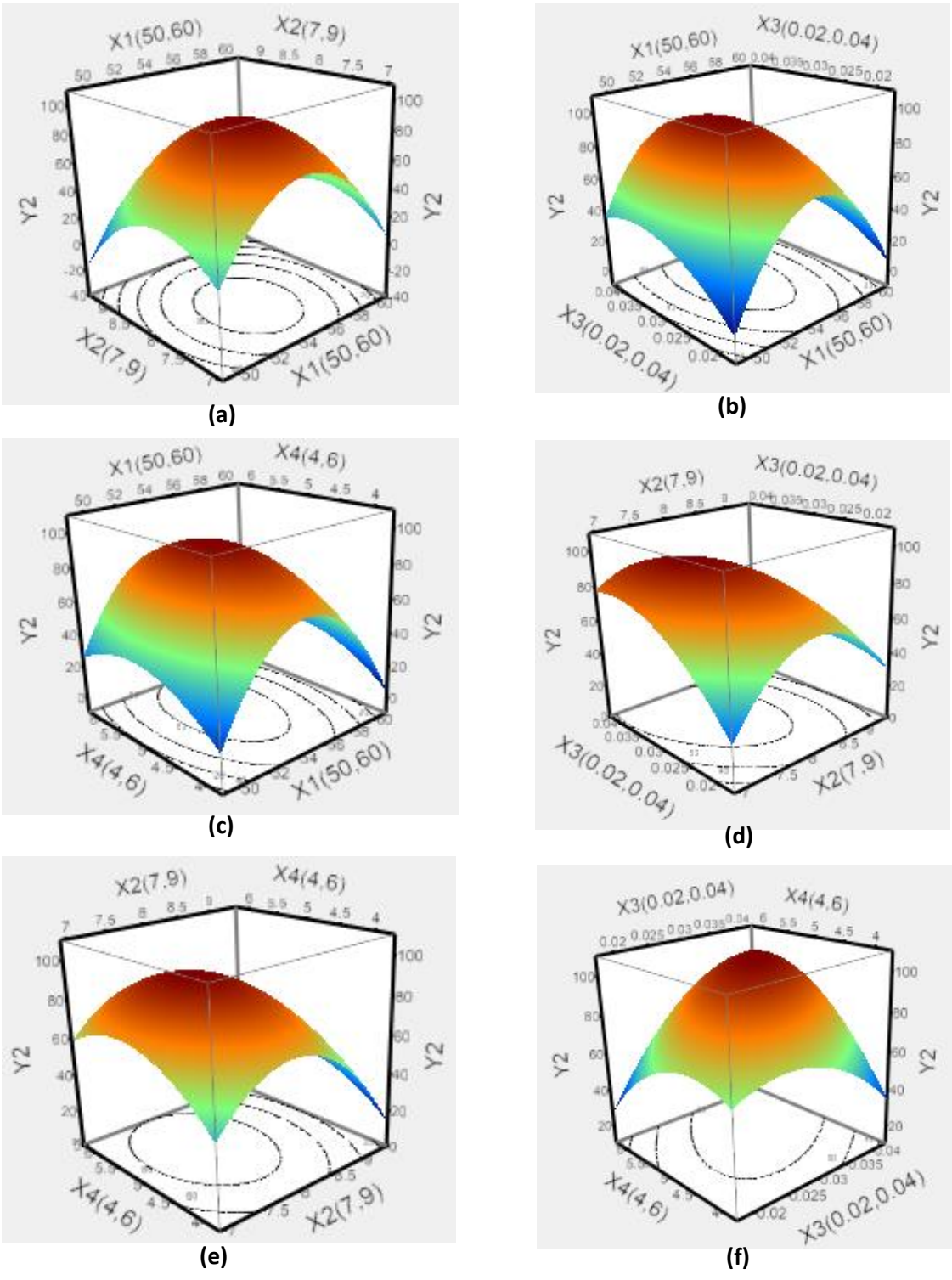


Hình 3. 14. Dự đoán phần độ thủy phân (Y1) và hiệu suất thu hồi nitrogen (Y2) với các biến độc lập X1, X2, X3 và X4

Ảnh hưởng của các biến khác nhau đến điều kiện tối ưu của DH (Y_1) và NR (Y_2). Dựa vào Hình 3.14, có thể dự đoán điều kiện tối ưu khi thủy phân collagen từ da cá ngừ vây vàng bằng enzyme alcalase.



Hình 3. 15. Bề mặt đáp ứng 3D và họ đường đồng mức 2D của (Y1) với ảnh hưởng của các biến độc lập X1, X2, X3 và X4



Hình 3. 16. Bề mặt đáp ứng 3D và họ đường đồng mức 2D của (Y2) với ảnh hưởng của các biến độc lập X1, X2, X3 và X4

Hình dạng của đường cong thủy phân có liên quan đến sự biến tính enzyme ở nhiệt độ cao, pH, ức chế enzyme bằng các sản phẩm thủy phân đóng vai trò là chất cạnh tranh cơ chất hiệu quả với protein không bị thủy phân và có thể tự động tiêu hóa enzyme (Rebeca và ctv, 1991). Hình 3.15a và Hình 3.16a cho thấy rằng ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân (X_1) và pH (X_2) đến DH và NR là rất lớn. Điều này đã được chứng minh là ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân và pH cực kỳ lớn đến hoạt độ của enzyme (Hema và ctv, 2017). Nếu nhiệt độ thủy phân và pH nằm ngoài phạm vi này, thì DH và NR không thể đạt được giá trị tối đa. Mặt khác, ảnh hưởng của nồng độ alcalase (X_3) và thời gian thủy phân (X_4) có hình dạng tương tự nhau, chỉ ra rằng nếu nồng độ alcalase và thời gian thủy phân tăng lên trên 0,034 AU/g và 5,2 giờ, thì DH và NR sẽ không thay đổi. Các điều kiện tối ưu hóa để có được DH và NR tối đa là nhiệt độ thủy phân 54,7 °C (X_1), pH 7,9 (X_2), nồng độ alcalase (0,034 AU/g) (X_3) và thời gian thủy phân 5,2 giờ (X_4). Các giá trị được xác định của các biến phụ thuộc Y_1max và Y_2max lần lượt là 24,54% và 96,42% (Hình 3.14)

Để kiểm chứng các điều kiện tối ưu, thí nghiệm được lặp lại 3 lần ở các điều kiện tối ưu và kết quả thử nghiệm thu Y_1 (DH, %) và Y_2 (NR, %) lần lượt là 24,51 ± 0,15% và 96,35 ± 0,27% (Bảng 3.15). Kết quả thu được không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$) so với giá trị dự đoán từ mô hình.

Bảng 3.15. Điều kiện tối ưu để thủy phân da cá ngừ vây vàng bằng enzyme alcalase

Biến phụ thuộc	Biến độc lập	Giá trị của biến độc lập	Kết quả dự đoán	Kết quả thí nghiệm
Y_1 (%)	X_1	54,7 °C	24,54	24,51±0,15
	X_2	7,9		
Y_2 (%)	X_3	0,034AU/g	96,42	96,35± 0,27
	X_4	5,2 giờ		

Tóm lại, điều kiện tối ưu để thủy phân collagen trong da cá ngừ vây vàng bằng enzyme alcalase: nồng độ enzyme 0,034AU/g, nhiệt độ thủy phân 54,7 °C, pH 7,9 và thời gian thủy phân 5,2 giờ. Kết quả thu được độ thủy phân (Y_1) và hiệu suất thu hồi nitrogen (Y_2) lần lượt là 24,51 % và 96,35 %.

3.3. Tinh sạch, phân đoạn và khảo sát tính chất của các phân đoạn collagen thủy phân

3.3.1. Thành phần hóa học của dịch thủy phân, lọc sơ bộ và sau khi ly tâm của da cá ngừ vây vàng

Da cá ngừ vây vàng sau khi đã được xử lý bằng dung dịch NaOH và thủy phân bằng enzyme alcalase thì phần lớn lipid và protein không phải là collagen đã bị loại bỏ. Collagen thủy phân đã được tinh sạch qua hai bước là lọc chân không và ly tâm. Thành phần của dịch collagen sau tinh sạch được trình bày ở Bảng 3.16.

Bảng 3.16. Bảng thành phần hóa học của dịch collagen sau thủy phân và làm sạch sơ bộ

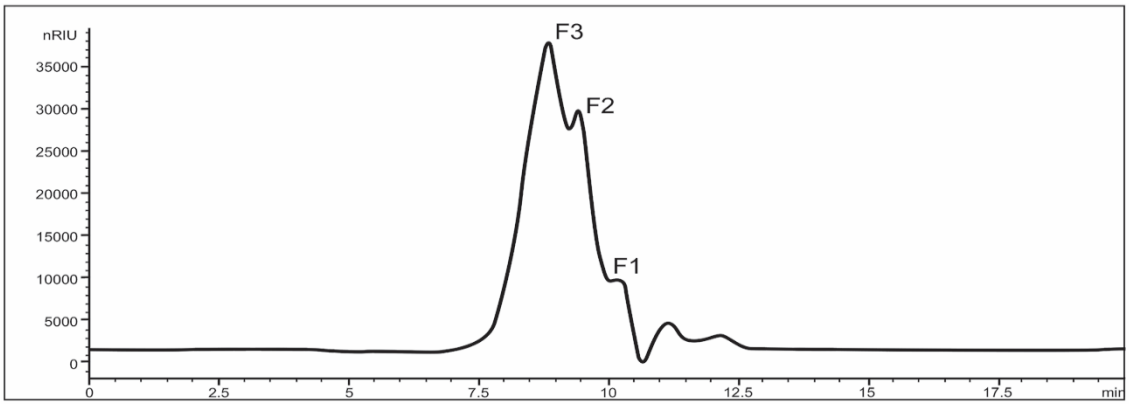
Chỉ tiêu	Dịch thủy phân	Dịch sau lọc chân không	Dịch sau ly tâm
Đạm (gN/L)	$14,7^{a}\pm0,50$	$15,1^{a}\pm0,53$	$14,6^{a}\pm0,32$
Lipid (%)	$0,55^{a}\pm0,05$	$0,08^{b}\pm0,02$	$0,09^{b}\pm0,01$
Tro (%)	$0,17^{a}\pm0,01$	$0,17^{a}\pm0,02$	$0,171^{a}\pm0,01$
Chất khô (%)	$10,06^{a}\pm0,31$	$9,77^{a}\pm0,24$	$9,69^{ba}\pm0,15$
Hiệu suất thu hồi nitrogen trong da cá (%)	$82,82^{a}\pm1,50$	$79,92^{b}\pm1,05$	$79,30^{ba}\ \pm0,50$
Hiệu suất thu hồi collagen (%)	$96,61^{a}\pm0,95$	$94,81^{b}\pm1,02$	$94,52^{b}\pm0.35$

a, b, c: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

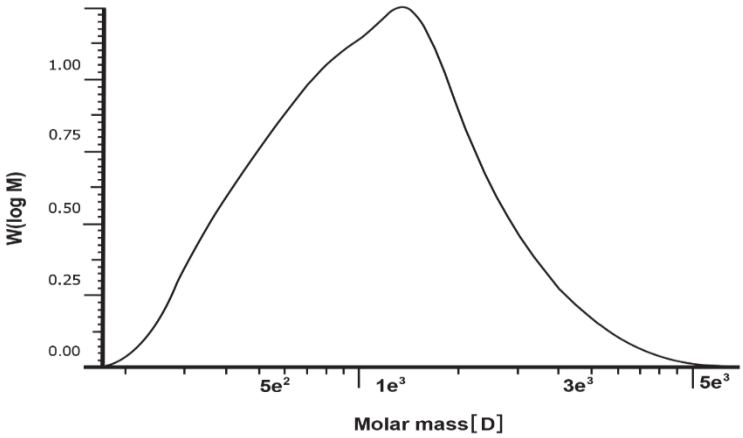
Dịch collagen sau khi thủy phân được làm lạnh xuống 4 °C sau đó được lọc qua 2 lớp bông thấm nước bằng thiết bị lọc chân không. Dịch collagen thủy phân sau khi lọc chân không có hàm lượng chất khô giảm chủ yếu là do chất béo bị loại ra khỏi dịch thủy phân (Bảng 3.16). Sau khi lọc chân không, đã loại bỏ một lượng lớn lipid từ 0,55±0,05% xuống còn 0,08±0,02% điều này rất tốt cho bảo quản collagen thủy phân sau này. Dịch collagen sau khi ly tâm có màu sắc trong hơn và không còn màu đen. Như vậy công đoạn ly tâm cũng giúp loại bỏ các sắc tố trên da cá ngừ. Như vậy sau khi làm sạch bằng phương pháp lọc và ly tâm, dịch thủy phân trong hơn và hàm lượng chất béo giảm đáng kể.

3.3.2. Kết quả khảo sát phân bố khối lượng phân tử peptide collagen trong dịch thủy phân sau khi tinh sạch

Sự phân bố trọng lượng phân tử của các peptide trong dịch collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng ≤ 5 kDa bằng sắc ký GPC được trình bày trong Hình 3.17 và Hình 3.18. Sản phẩm thủy phân bao gồm 3 phân đoạn trong đó 10% peptide có khối lượng phân tử nhỏ hơn 416 Da (F1), 40% (416 Da đến 1 kDa) (F2) và 50% (1 kDa đến 5kDa) (F3).



Hình 3.17. Sắc ký đồ phân bố trọng lượng phân tử của peptide collagen trong dịch thủy phân da cá ngừ vây vàng sau khi ly tâm



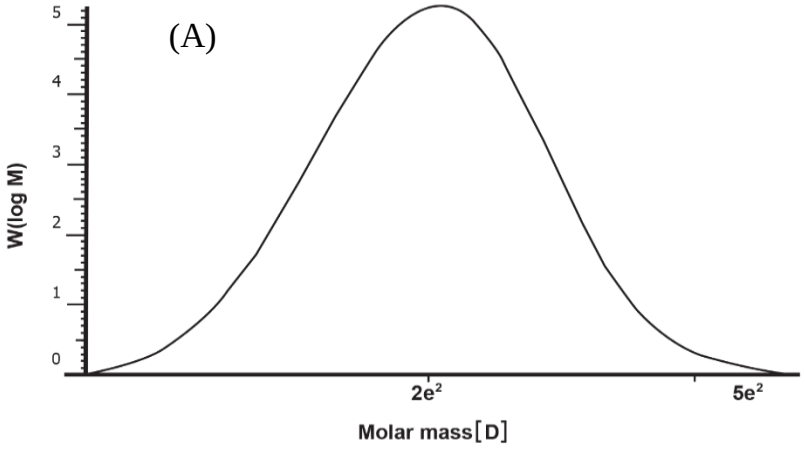
Mn:	1,2319e3	g/mol
Mw:	1,4417e3	g/mol
Mz:	1,4417e3	g/mol
Mv:	3,4606e3	g/mol
D :	1,6898e0	
[n] :	0,000000	ml/g
Vp:	9,2015e0	ml
Mp:	1,3311e3	g/mol
A :	1,7916e5	ml*V
10%	4,1578e2	g/mol
30%	7,2688e2	g/mol
50%	1,1047e3	g/mol
70%	1,6105e3	g/mol
90%	2,8438e3	g/mol

Hình 3.18. Phân bố khối lượng phân tử của các peptide collagen trong dịch sau khi ly tâm

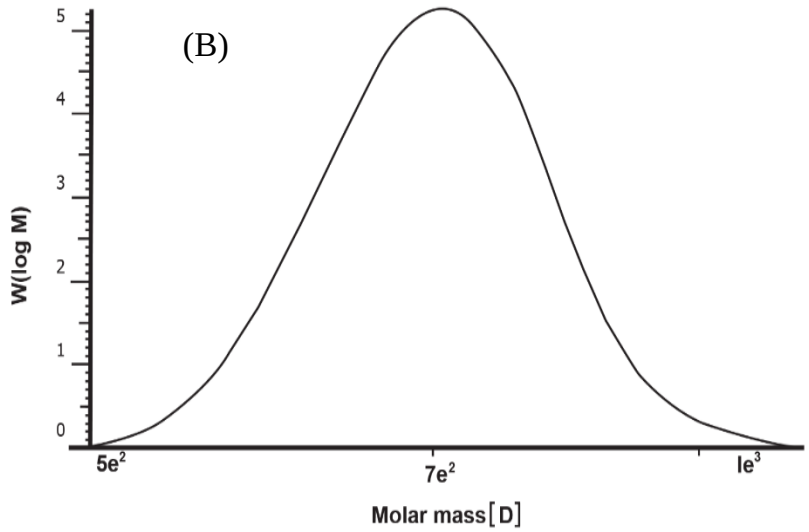
3.3.3. Phân đoạn collagen thủy phân bằng sắc ký lọc gel

Sắc ký đồ khi chạy sắc ký dịch thủy phân collagen từ da cá ngừ vây vàng được trình bày trong Hình 3.17. Sắc ký lọc gel (GPC) được dùng để tách 3 phân đoạn F1, F2 và F3 ra khỏi phân dịch collagen thủy phân bằng cách hứng sản phẩm đầu ra của

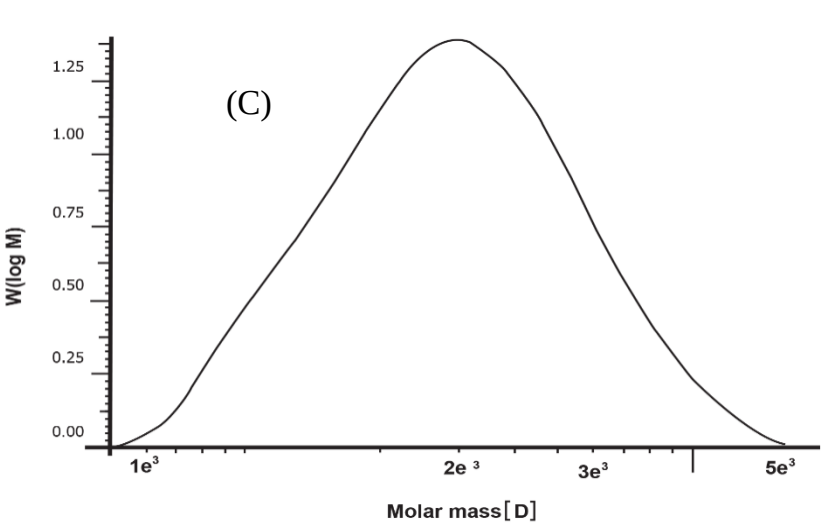
sắc ký theo thời gian lưu của các phân đoạn khi chạy sắc ký. Theo sắc ký đồ (Hình 3.17) phân đoạn F3 sẽ ra khỏi sắc ký từ phút thứ 7 đến phút thứ 9; phân đoạn F2 là từ phút thứ 9 đến phút thứ 10 và phân đoạn F3 từ phút thứ 10 đến phút thứ 11. Ba phân đoạn F1, F2 và F3 được tách ra và kết quả kiểm tra khối lượng phân tử của các phân đoạn được trình bày trong Hình 3.19



Mn:	2,0157e2	g/mol
Mw:	2,2339e2	g/mol
Mz:	2,0933e2	g/mol
Mv:	2,0339e2	g/mol
D :	1,0294e0	
[n] :	0,000000	ml/g
Vp:	1,2297e2	ml
Mp:	2,0361e2	g/mol
A :	2,9762e3	ml*V
10%	1,4021e2	g/mol
30%	1,6223e2	g/mol
50%	2,0103e2	g/mol
70%	3,1991e2	g/mol
90%	4,1501e2	g/mol



Mn:	7,0157e2	g/mol
Mw:	8,2339e2	g/mol
Mz:	7,0933e2	g/mol
Mv:	7,0339e2	g/mol
D :	1,0294e0	
[n] :	0,000000	ml/g
Vp:	1,2297e2	ml
Mp:	2,0361e2	g/mol
A :	2,9762e3	ml*V
10%	5,4021e2	g/mol
30%	6,3223e2	g/mol
50%	7,0103e2	g/mol
70%	8,1991e2	g/mol
90%	9,9501e2	g/mol



Mn:	2,0319e3	g/mol
Mw:	2,0417e3	g/mol
Mz:	2,4417e3	g/mol
Mv:	3,4606e3	g/mol
D :	1,6898e0	
[n] :	0,000000	ml/g
Vp:	9,2015e0	ml
Mp:	1,3311e3	g/mol
A :	1,7916e5	ml*V
10%	1,4578e3	g/mol
30%	1,6688e2	g/mol
50%	2,0547e3	g/mol
70%	2,6105e3	g/mol
90%	3,0438e3	g/mol

Hình 3.19. Kết quả kiểm tra khối lượng phân tử của 3 phân đoạn collagen thủy phân

(A) : Khối lượng phân tử phân đoạn F1

(B) : Khối lượng phân tử phân đoạn F2

(C) : Khối lượng phân tử phân đoạn F3

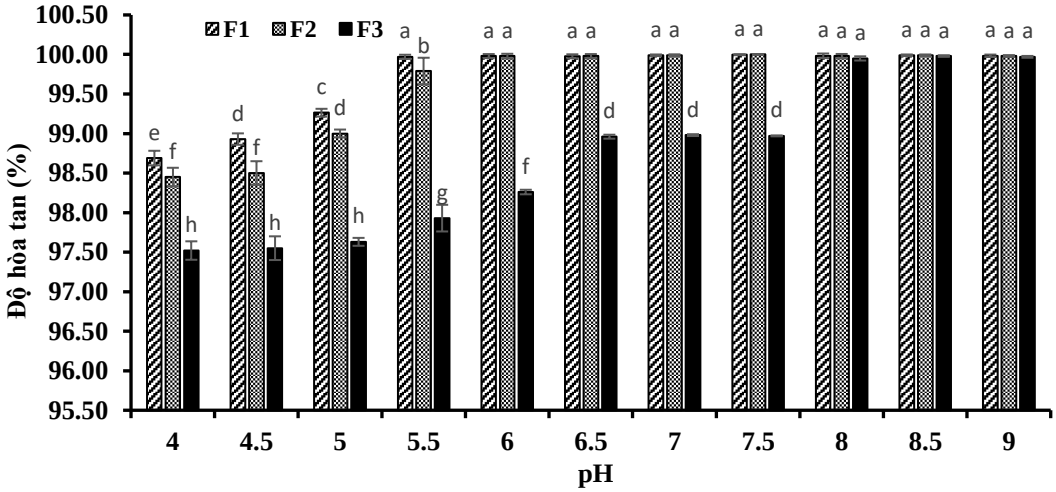
Khi sử dụng sắc ký lọc gel để tách 3 phân đoạn F1, F2 và F3. Sự phân bố khối lượng phân tử của các peptide trong phân đoạn F1, F2 và F3 được thể hiện lần lượt trong hình 3.19A, 3.19B và 3.19C. Khối lượng phân tử của các peptide trong phân đoạn F1 là 90% khối lượng phân tử nhỏ hơn 415 Da, trong phân đoạn F2 là từ 415 Da đến 1 kDa, F3 có khối lượng phân tử từ 1 kDa – 5 kDa trong đó có 90% là dưới 3 kDa.

3.3.4. Tính chất của các phân đoạn collagen thủy phân

3.3.4.1. Khả năng hòa tan

Tính hòa tan là một trong những đặc tính quan trọng nhất của sản phẩm collagen thủy phân bởi vì tính chất này xác định các ứng dụng tiếp theo của chúng trong thực phẩm, dược phẩm và các ngành công nghiệp khác (Chi và ctv, 2014). Khả năng hòa tan của các phân đoạn collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng ở các độ pH khác nhau được thể hiện trong Hình 3.20. Tất cả các phân đoạn peptide collagen đều hòa tan trong một phạm vi pH rộng, với độ hòa tan hơn 97% thu được. Hình 3.20 cho thấy cả ba phân đoạn F1, F2 và F3 đều tăng khả năng hòa tan khi pH tăng. Phân đoạn F1 hòa tan tốt nhất kể cả ở pH 4 thì độ hòa tan vẫn đạt trên 98,5%. Không có sự

khác biệt về độ hòa tan của phân đoạn F1 và F2 khi pH ≥ 5,0. Độ hòa tan của 3 phân đoạn giống nhau khi pH ≥ 8,0. Với khả năng hòa tan tốt của phân đoạn F1 và F2 trong môi trường kiềm lẫn môi trường axit điều này rất phù hợp để bổ sung vào các loại thực phẩm nhất là các loại đồ uống mà không làm cho đồ uống bị đục hoặc là kết tủa.



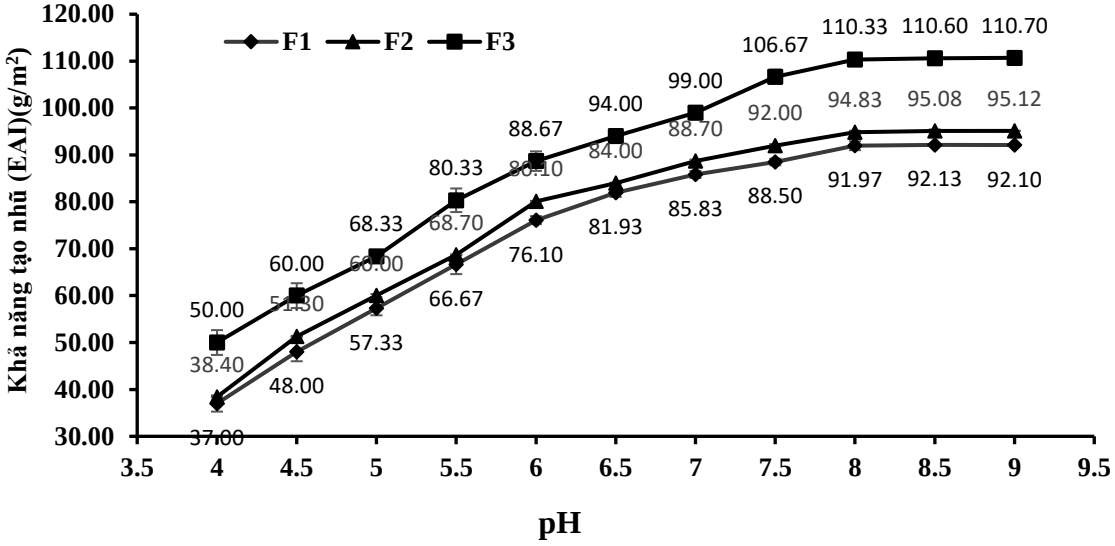
Hình 3.20. Ảnh hưởng của pH đến độ hòa tan của các phân đoạn collagen

Kết quả nghiên cứu cũng tương đồng với các nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng độ hòa tan của các peptide collagen tăng lên khi trọng lượng phân tử giảm, vì các phân tử nhỏ có thể phân cực hơn. Các peptide có phân tử lượng càng nhỏ từ các protein sợi myofibrillar khi thủy phân sẽ có nhóm phân cực nhiều hơn và khả năng tạo liên kết hydro với nước dễ dàng hơn nên tăng khả năng hòa tan (Chi và ctv, 2014; Chi, Hu, Li, Wang, & Luo, 2016). Kết quả phù hợp với những gì được mô tả đối với sản phẩm thủy phân gelatin trên da của cá *Oneknife Unicorfish* (Alolod, Nuñal, Nillos, & Peralta, 2019) và thủy phân gelatin từ da và vảy của cá *Sole* (Viji và ctv, 2019) đã chỉ ra khả năng hòa tan tăng khi tăng pH và ngược lại.

Nhờ vào khả năng hòa tan dễ dàng trong nước, collagen thủy phân thường được bổ sung vào nước ép trái cây giúp tăng cường dinh dưỡng và khả năng tiêu hóa cho người tiêu dùng. Các nhà khoa học cho rằng 90% collagen thủy phân có thể được tiêu hóa (Bilek và Bayram, 2015; Ichikawa và ctv, 2010).

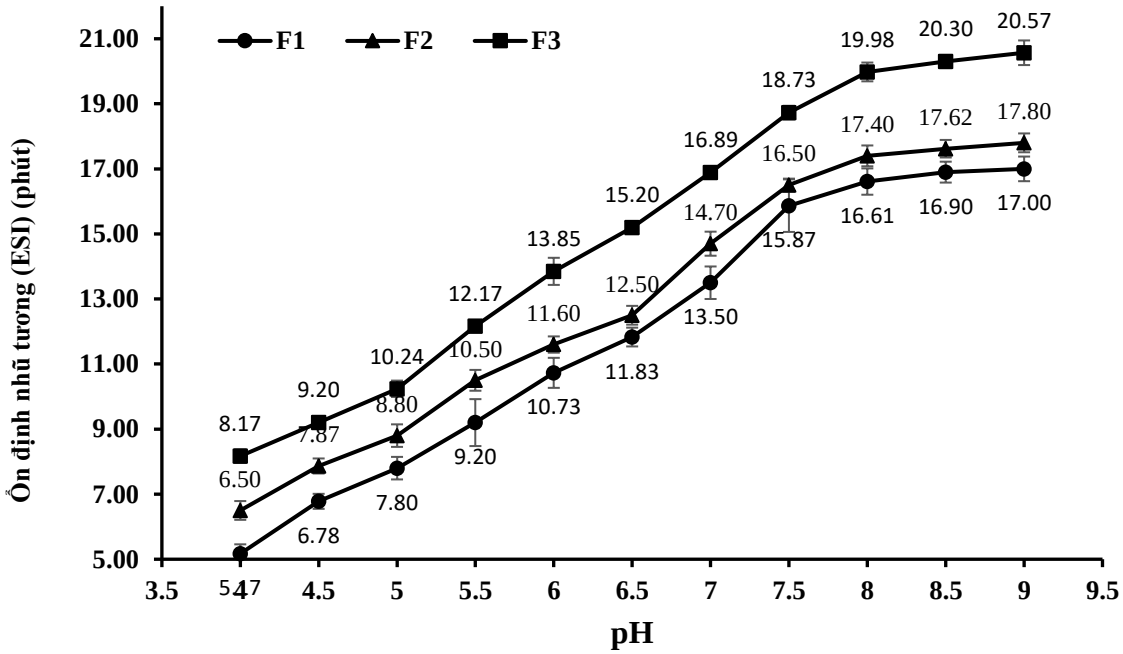
3.3.4.2. Khả năng tạo nhũ

Chỉ số hoạt động của nhũ tương (EAI) của các phân đoạn collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng được biểu diễn trên Hình 3.21. Giá trị EAI của F1, F2 và F3 đều tăng khi pH tăng. Hình 3.21 cho thấy khả năng tạo nhũ tương cao nhất là 91,97 g/m^2 (F1); 95,97 g/m^2 (F2) và 110,33 g/m^2 (F3) ở pH 8 ($p < 0,05$). Kết quả này tương đồng với Chi và ctv (2014) với EAI của collagen thủy phân từ da cá thu Tây Ban Nha (*Scomberomorous niphonius*) là 97,44 (m^2/g) (Chi và ctv, 2014) và của một nghiên cứu khác khi cho thấy EAI của collagen thủy phân từ da cá Ornate threadfin bream (Nemipterus hexodon) là 116,00 (m^2/g) (Nalinanon và ctv, 2011). Khi độ thủy phân cao, collagen thủy phân chứa nhiều peptide có trọng lượng phân tử thấp làm mất các đặc tính nhũ hóa (Klompong và ctv, 2007; Gbogouri và ctv, 2004). Klompong và ctv (2007) cho rằng các peptide có khối lượng phân tử thấp có thể không đủ amphiphilic để thể hiện sự thích hợp nhũ hóa tốt. Một nghiên cứu khác cho thấy khi khối lượng phân tử của các peptide collagen lớn hơn 10kDa thì khả năng tạo nhũ tương giảm (Hajfathalian, Ghelichi, García-Moreno, Moltke Sørensen, & Jacobsen, 2018) vì khó sắp xếp lại phân tử ở bề mặt phân cách của nhũ tương và do đó, sự khuếch tán tiếp theo ở bề mặt phân cách dầu-nước giảm. Hơn nữa, EAI thấp cho thấy số lượng các hạt cầu chất béo phân tán kém hơn. Klompong và ctv (2007) cho rằng các peptide có MW thấp có thể không đủ amphiphilic để thể hiện sự thích hợp nhũ hóa tốt. Vậy với phân đoạn F3 thì khả năng tạo nhũ tốt nhất còn phân đoạn F1 và F2 thì khả năng tạo nhũ gần tương đương nhau.



Hình 3.21. Khả năng tạo nhũ tương của các phân đoạn collagen thủy phân

Chỉ số ổn định của nhũ tương (ESI) của các phân đoạn collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng được biểu diễn trên Hình 3.22. Chỉ số ESI của F1, F2 và F3 đều tăng khi pH tăng. Hình 3.22 cho thấy ESI của F1, F2 và F3 đạt cao nhất lần lượt là 16,61 (phút), 17,40 (phút) và 19,98 (phút) ở pH 8 ($p < 0,05$). Kết quả nghiên cứu này tương đồng với Nalinanon và các ctv (2011) cho thấy ESI của collagen thủy phân từ da cá Ornate threadfin bream (Nemipterus hexodon) là 25,80 (phút) (Nalinanon và ctv, 2011). Mutilangi và ctv (1996) công nhận rằng các peptide có trọng lượng phân tử cao hơn góp phần vào sự ổn định của nhũ tương (Mutilangi, Panyam, & Kilara, 1996). Các peptide có trọng lượng phân tử thấp hơn có thể có mức cân bằng bề mặt thấp, không đủ để tăng cường tính ổn định do không có sự hình thành màng nhớt trên bề mặt nhũ tương (Razali và ctv, 2015), các peptide nhỏ hơn kém hiệu quả hơn trong việc giảm sức căng bề mặt và do đó, nhanh chóng phá vỡ nhũ tương.

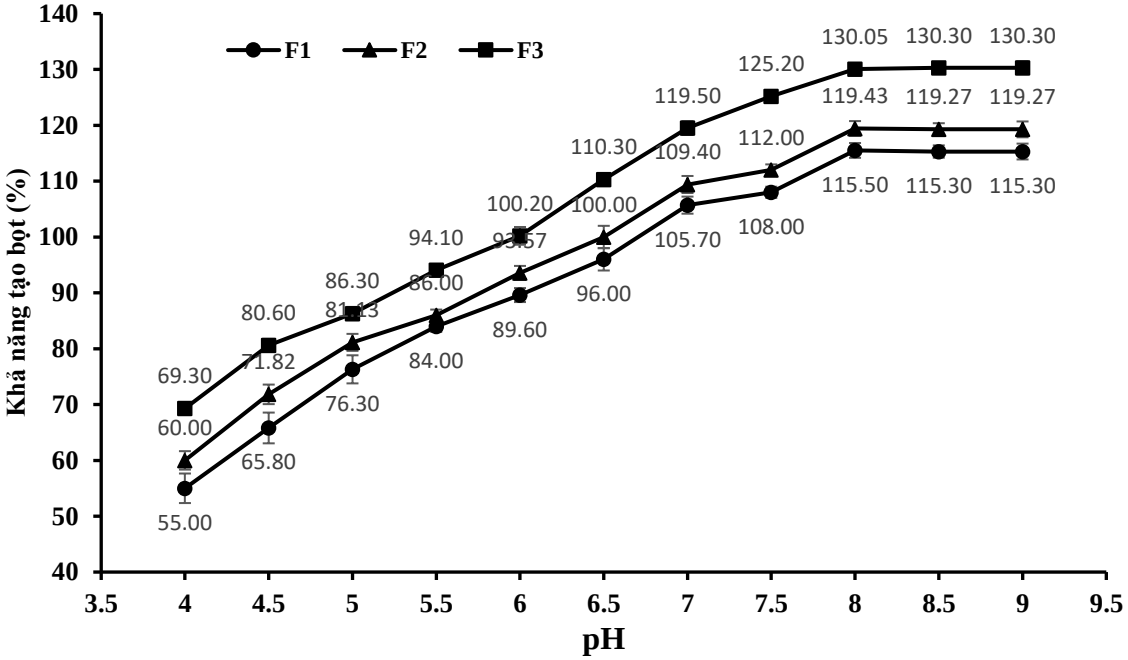


Hình 3.22. Khả năng ổn định nhũ tương của các phân đoạn collagen thủy phân

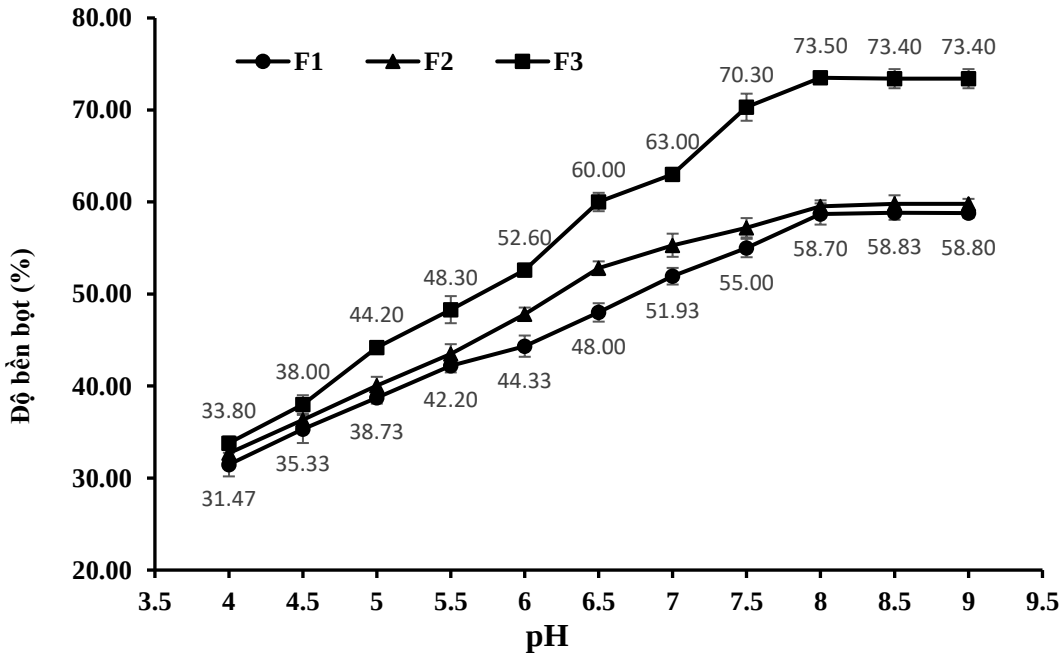
3.3.4.3. Khả năng tạo bọt

Tính chất tạo bọt là đặc điểm hóa lý của protein để hình thành và ổn định bọt (Thiansilakul và ctv, 2007). Khả năng tạo bọt (FC) và độ ổn định của bọt (FS) của các phân đoạn collagen thủy phân được biểu diễn trên đồ thị Hình 3.23 và Hình 3.24. Khả năng tạo bọt (FC) tăng khi pH tăng từ 4,0 đến 8,0 và không có sự khác biệt khi pH ≥ 8,0 ($p < 0,05$). Khả năng tạo bọt của các phân đoạn F1, F2 và F3 đạt cao nhất là 115,5%, 121,5% và 130,1% ở pH 8 ($p < 0,05$). Kết quả này cũng tương đồng với Nalinanon và ctv 2011 của collagen thủy phân từ da cá Ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*) với FC là 131,0% (Nalinanon và ctv, 2011). Điều này có thể là do sự liên kết yếu hơn của các peptide nhỏ trong giao diện của bề mặt không khí - nước (Hajfathalian, Ghelichi, García-Moreno, Moltke Sørensen, & Jacobsen, 2018). Sự hình thành bọt được điều chỉnh bởi ba yếu tố, bao gồm vận chuyển, thâm nhập và tổ chức lại các phân tử tại giao diện không khí và nước (Klompong và ctv, 2007). Một kết quả tương tự cũng được báo cáo trong các sản phẩm thủy phân protein từ thịt cá chỉ vàng (Selaroides leptolepis) được thủy phân bởi Alcalase và Flavourzyme với

5–25% DH (Klompong và ctv, 2007). Như vậy các peptide có khối lượng phân tử thấp không thể duy trì sự định hướng có trật tự của phân tử tại bề mặt phân cách.



Hình 3.23. Khả năng tạo bọt của các phân đoạn collagen thủy phân

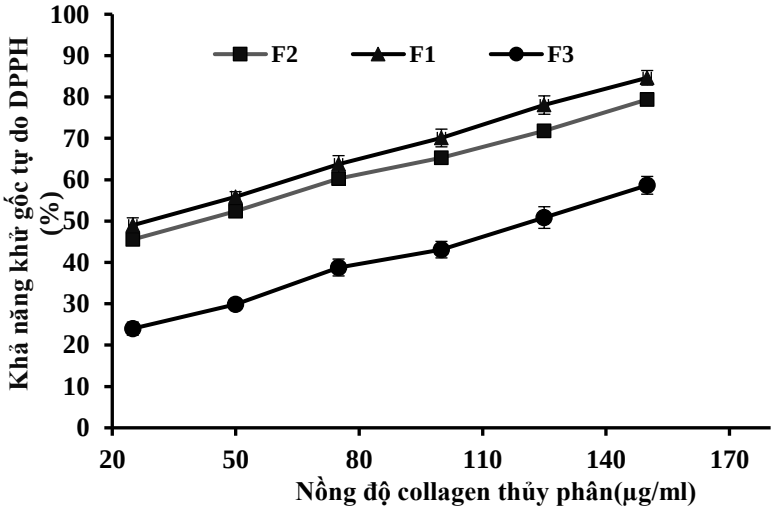


Hình 3.24. Độ bền bọt của các phân đoạn collagen thủy phân

3.3.4.4. Khả năng chống oxy hóa

a. Khả năng khử gốc tự do DPPH

Khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch collagen thủy phân, các phân đoạn collagen thủy phân F1, F2 và F3 được thể hiện trong Hình 3.25.



Hình 3.25. Khả năng khử gốc tự do DPPH của các phân đoạn collagen thủy phân

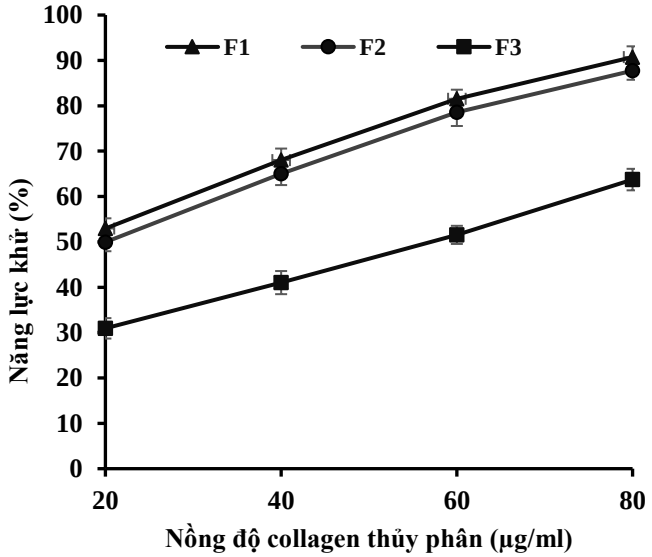
DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) là một hợp chất có màu tím và có thể xác định ở bước sóng 517nm. Khi gặp chất nền có electron tự do, nó sẽ oxy hóa (nhận electron) và trở thành một phân tử từ tính ổn định và mất màu tím (Bougatef và ctv., 2010). Do đó, khả năng của các chất chống oxy hóa có thể được đánh giá bằng khả năng khử gốc tự do của DPPH. Phần trăm làm mất màu DPPH của các phân đoạn collagen thủy phân F1, F2 và F3 lần lượt là 48,99% – 84,64%; 45,54% – 79,39% và 23,99% – 58,64% ở nồng độ colllagen thủy phân là 25 – 150 µg/ml (Hình 3.9). Do đó, phân đoạn F1, F2 và F3 có khả năng khử gốc tự do DPPH với IC50 lần lượt là 28,64 µg/ml, 40,64 µg/ml và 120,75 µg/ml. Kết quả cho thấy các phân đoạn collagen thủy phân có khối lượng phân tử nhỏ có khả năng khử gốc tự do DPPH mạnh hơn các phân đoạn collagen có khối lượng phân tử lớn hơn. Những kết quả trong nghiên cứu này các phân đoạn collagen F1, F2 và F3 có khả năng khử gốc tự do DPPH tốt hơn so với báo cáo của Chi và ctv (2014), người phát hiện ra sự ức chế gốc tự do DPPH dưới 30% đối với các phân đoạn collagen có trọng lượng phân tử ≥30 kDa và cao nhất (81%) là đối với F5 (≤1 kDa) ở 5 mg/ml. Hoạt tính khử gốc tự do DPPH của

collagen thủy phân từ da cá thu Tây Ban Nha (IC50 = 1570 µg/ml) (Chi và ctv, 2014) và da cá pollack ở Alaska (IC50 = 2500 µg/ml) (Jia và ctv, 2010) và tương đương với phân đoạn peptide từ 3 – 10 kDa từ da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*) trong nghiên cứu của Nurilmala và ctv (2020) với IC50 = 75,94 µg/ml. Collagen thủy phân từ da cá hồi có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất ở phân đoạn có khối lượng phân tử nhỏ hơn 3 kDa (Wu và ctv, 2018).

Kết quả này cũng tương đồng với kết quả của Chi và ctv (2014) báo cáo rằng các phân đoạn peptide có trọng lượng phân tử thấp có khả thu nhận điện tử để tạo ra các sản phẩm ổn định. (Chi và ctv, 2014; Hajfathalian và ctv, 2018). Mặt khác các peptide collagen có phân tử lượng thấp có khả năng khử gốc tự do DPPH cao là do các axit amin có tính axit có khả năng chống oxy hóa mạnh do sự hiện diện của các nhóm carboxyl trong phân tử (Sarmadi & Ismail, 2010; Udenigwe & Aluko, 2011). Các axit amin có tính axit như axit glutamic và arginine có thể ảnh hưởng đến khả năng chống oxy hóa của các peptide collagen trọng lượng phân tử thấp.

b. Năng lực khử

Năng lực khử cũng là một phép phân tích nhằm đánh giá khả năng chống oxy hóa trong *vitro*.

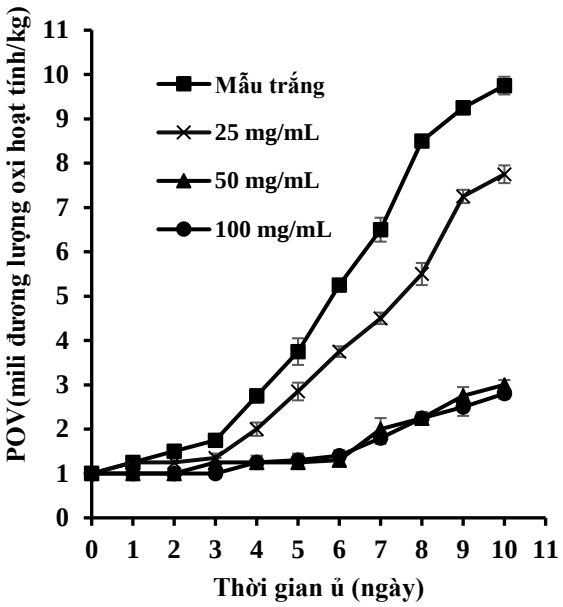


Hình 3.26. Năng lực khử của các phân đoạn collagen thủy phân

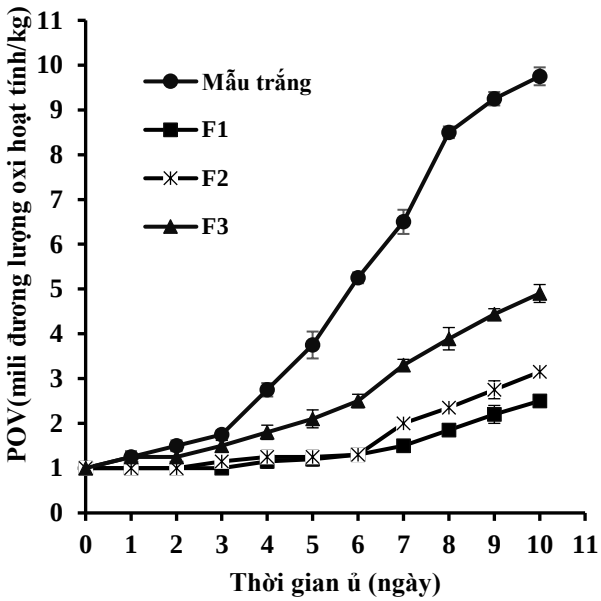
Hình 3.26 cho thấy rằng tất cả các phân đoạn peptide collagen đều phụ thuộc trực tiếp vào nồng độ, nồng độ cao có nghĩa là hoạt tính gốc hydroxyl cao. Ngoài ra, hoạt tính thu nhận gốc hydroxyl đối với F1, F2 và F3 được tăng lên khi khối lượng phân tử giảm đi. Kết quả cho thấy năng lực khử thể hiện qua giá trị IC50 của các phân đoạn collagen thủy phân F1, F2 và F3 lần lượt là 13,30 μg/ml, 16,57 μg/ml và 57,38 μg/ml. Kết quả của nghiên cứu này cao hơn so với một số peptide tách chiết từ các loài thủy sản khác như ACH-P3 từ vẩy của cá croceine croaker (IC50 = 170 μg/ml) (Wang và ctv, 2013), PSYV (IC50 = 2640 μg/ml) từ protein thủy phân từ cá loạch (B. Wang và ctv, 2012) , LKQELEDLLEKQE (IC50 46 μg/ml) protein hydrolyzate từ hàu (Qian và ctv, 2008) và FDSGPAGVL (IC50 78 μg/ml) từ mực khổng lồ (Mendis và ctv, 2005). Tuy nhiên, nó thấp hơn so với MQIFVKTLTG (IC50 = 5 μg/ml) và DLSDGEQGVL (IC50 = 7 μg/ml) protein thủy phân từ thịt nai (Kim và ctv, 2009). Như đã mô tả ở trên, hoạt động chống oxy hóa có thể được kết hợp với hàm lượng cao của các axit amin kỵ nước và phân đoạn peptide có trọng lượng phân tử thấp có khả thu nhận điện tử để tạo ra các sản phẩm ổn định (Chi và ctv, 2014; Hajfathalian và ctv, 2018). Vì vậy, hoạt tính chống oxy hóa cao hơn được thể hiện bằng các phân đoạn peptide có trọng lượng phân tử thấp hơn, chẳng hạn như F1 (< 500 Da).

Những dữ liệu này cho thấy collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng có hiệu quả cao trong việc chống lại các gốc hydroxyl. Do đó, nó có thể được sử dụng để ngăn ngừa thiệt hại do các gốc hydroxyl gây ra trong các sinh vật sống.

c. ***Khả năng chống oxy hóa trên môi trường dầu-nước***



Hình 3.27. Ảnh hưởng nồng độ collagen thủy phân đến khả năng chống oxy hóa



Hình 3.28. Ảnh hưởng các phân đoạn collagen thủy phân đến khả năng chống oxy hóa ở nồng độ 50mg/mL

Quá trình oxy hóa của nhũ tương dầu trong nước là một vấn đề phổ biến gây ra mùi ôi và mất dinh dưỡng trong nhiều sản phẩm thực phẩm như nước sốt, súp và đồ uống (Cheng và ctv, 2010). Do đó, hoạt tính chống oxy hóa của collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng cũng được đánh giá thông qua khả năng ức chế quá trình oxy hóa lipid bằng sự thay đổi giá trị peroxide (POV) của hệ nhũ tương. Hình 3.27 cho thấy khả năng chống oxy hóa lipid trong hệ nhũ tương phụ thuộc vào nồng độ của collagen thủy phân. Khi tăng nồng độ collagen thủy phân trong hệ nhũ tương thì khả năng ức chế quá trình oxy hóa lipid tăng nhưng kết quả nghiên cứu cho thấy khi tăng nồng độ collagen từ 50 mg/ml lên 100 mg/ml thì khả năng ức chế oxy hóa của lipid không thay đổi ($p < 0,05$). Mẫu nhũ tương với việc bổ sung 50 mg/ml collagen thủy phân trong 10 ngày ủ ở 50 °C, cho thấy tỷ lệ ức chế POV lên tới 73,53% (ngày 8) và có mức ức chế trung bình là 57,95 % so với mẫu trắng. Kết quả này tương đương với tỷ lệ ức chế giá trị POV được báo cáo trước đây của protein thủy phân từ hạt cao

lương và protein thủy phân từ khoai tây, lần lượt là 55,38% và 62,80%, trong 10 ngày ủ với nồng độ 20 mg/ml (Cheng và ctv, 2010; Xu và ctv, 2019).

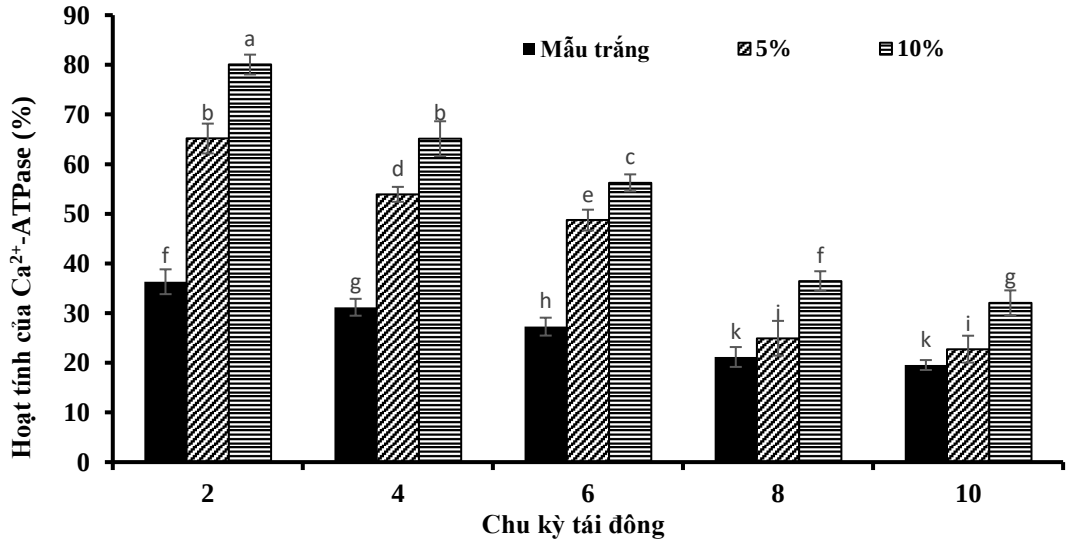
Trong nghiên cứu này hoạt tính ức chế khả năng oxy hóa của hệ nhũ tương với việc bổ sung 50 mg/ml collagen thủy phân mỗi phân đoạn F1, F2 và F3 cho thấy tỷ lệ ức chế POV so với mẫu trắng lần lượt là 78,23%, 72,35 và 50,59% (ngày 8) và có mức ức chế trung bình là 69,31%, 64,59% và 43,78% (sau 10 ngày) (Hình 3.28). Như vậy các phân đoạn collagen thủy phân có khối lượng phân tử nhỏ có khả năng chống oxy hóa chất béo tốt hơn. Theo Vignesh và ctv (2011) xác định chất chống oxy hóa hoạt động của quá trình thủy phân protein phụ thuộc vào mức độ và thành phần của cả axit amin tự do và peptide. Bên cạnh đó, Lassoued, Mora, Barkia (2015) đã đề cập rằng hoạt động chống oxy hóa là liên quan đến thành phần axit amin, trình tự và tính kỵ nước. Hầu hết các peptide chống oxy hóa được xác định cho đến nay đều ngắn (từ 5 – 16 axit amin) và chứa axit amin kỵ nước (Val và Leu) ở đầu cuối N của chuỗi peptide và Pro, His hoặc Tyr trong trình tự của chúng. Ngoài ra hoạt động chống oxy hóa của collagen thủy phân có thể là do nhiều cơ chế, trong đó thành phần axit amin của chuỗi peptide có tầm quan trọng vì các axit amin kỵ nước như Val, Ile, Leu, Met, Phe, Trp và Cys có khả năng thu nhận các gốc hydroxyl cao hơn các axit amin ưa nước (Betts & Russell, 2007; Ren và ctv, 2008). Thành phần collagen từ da cá chứa một lượng lớn axit amin kỵ nước như glycine, alanine, proline và methionine, do đó collagen hydrolyzate có khả năng chống oxy hóa cao (Matilla và ctv, 2002).

3.3.4.5. Khả năng chống đông

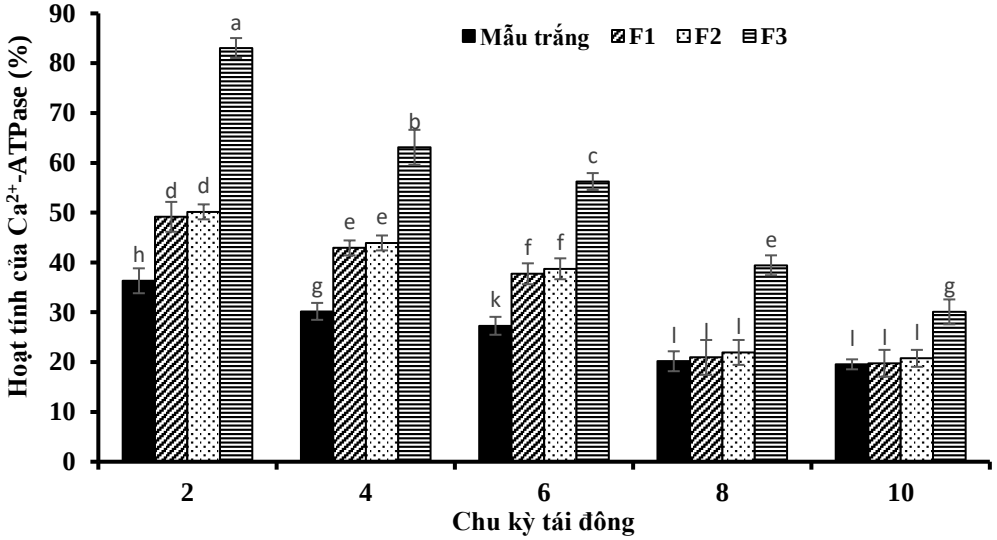
Collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng được đánh giá hoạt tính chống đóng băng được thể hiện trong Hình 3.29 và 3.30. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trong Hình 3.13 cho thấy hoạt tính chống đông của collagen thủy phân phụ thuộc vào nồng độ collagen. Các mẫu được thêm 10% collagen thủy phân có hoạt tính chống đông cao hơn đáng kể so với mẫu có 5% collagen thủy phân. Hoạt tính $Ca2^{+}$-ATPase còn lại của myoglobin giảm rõ rệt sau 2, 4, 6 và 10 chu kỳ đóng băng trong mẫu mà không có collagen thủy phân. Khi nồng độ tăng, nhiệt độ điểm đóng băng giảm, dẫn đến tăng hoạt động chống đóng băng.

Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng collagen có thể là một nguồn peptide chống đóng băng. Theo Wu và ctv (2018) collagen thủy phân từ da cá hồi có khối lượng phân tử lớn hơn 3 kDa có hoạt tính chống đông rất tốt 3, 6 và 9 chu kỳ đóng băng. Một nghiên cứu khác các peptide thu được khi thủy phân da cá mập thể hiện tác dụng bảo vệ tế bào rất tốt đối với surimi khi thực hiện nhiều tái đông (Phanat và ctv, 2012).

Trong chu kỳ đóng băng, các tinh thể băng được tạo ra và cường độ ion tăng lên, myosin có thể bị biến tính và phá hủy cấu trúc protein ban đầu (Benjakul & Sutthipan, 2009). Tuy nhiên, peptide của collagen hydrolyzate chứa lượng một lượng lớn nhóm ưa nước, có thể liên kết với nước để ngăn chặn sự hình thành tinh thể băng (Phanat và ctv, 2012). Các peptide chống đông collagen loại I có thể tăng cường hoạt động liên kết và chống đóng băng của chúng bằng cách tăng số lượng các vị trí hoạt động do cấu trúc homo-dimers song song của chúng chứa Ala và Thr trong cấu trúc xoắn ốc (Jeong et al., 2013).



Hình 3.29. Ảnh hưởng nồng độ collagen thủy phân đến khả năng chống đông



Hình 3.30. Khả năng chống đông của các phân đoạn collagen thủy phân ở nồng độ 10%

Hình 3.30 cho thấy rằng các phân đoạn collagen khác nhau có khả năng chống đông khác nhau. Hai phân đoạn F1 và F2 khả năng chống đóng băng không có sự khác biệt ($p<0,05$) nhưng phân đoạn F3 khả năng chống đóng băng cao hơn nhiều so với phân đoạn F1 và F2. Sau 8 lần tái đông thì mẫu có chứa các phân đoạn F1 và F2 không có sự khác biệt với mẫu trắng điều này đồng nghĩa với sau 8 lần tái đông trở lên thì các phân đoạn collagen F1, F2 mất hoạt tính chống đông. Còn sau 6 chu kỳ tái đông thì phân đoạn F3 vẫn còn 56,24% khả năng chống đông. Điều này có thể giải thích các peptide chống đông collagen loại I có thể tăng cường hoạt động liên kết và chống đóng băng của chúng bằng cách tăng số lượng các vị trí hoạt động do cấu trúc homo-dimers song song của chúng có chứa Ala và Thr trong cấu trúc xoắn ốc (Jeong và ctv, 2013).

Tóm lại, các phân đoạn collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng có khối lượng phân tử khác nhau và tính chất khác nhau được trình bày trong Bảng 3.17. Dựa vào kết quả thu được ở Bảng 3.17 cho thấy khả năng hòa tan của của 3 phân đoạn collagen thủy phân là rất cao nhưng về tính chất tạo bọt, tạo nhũ tương và chống đông thì F3 là cao nhất. Ngược lại F1 và F2 có tính chống oxy hóa mạnh hơn.

Bảng 3.17. Tóm tắt tính chất của các phân đoạn collagen thủy phân

Tính chất	Phân đoạn peptide collagen		
	F1	F2	F3
Khối lượng phân tử	<416Da	416Da – 1kDa	1kDa – 5kDa
Độ hòa tan (pH 4) (%)	> 98,63	> 98,00	> 97,52
Tỷ lệ (%)	10	40	50
Khả năng tạo nhũ tương (EAI) (g/m^2)	91,97	95,97	110,33
Độ bền nhũ tương (ESI) (g/m^2)	16,61	17,40	19,98
Khả năng tạo bọt (FC) (%)	115,50	121,50	130,05
Độ bền bọt (FS) (%)	60,70	62,67	73,50
Khử gốc tự do DPPH (IC50) (µg/ml)	28,64	40,64	120,75
Năng lực khử tổng (IC50) (µg/ml	13,30	16,57	57,38
Khả năng chống oxy hóa trên mô hình dầu nước (8 ngày)/mẫu trắng (mqE)	1,85/8,50	2,35/8,50	3,89/8,50
Khả năng chống đông (4 chu kỳ tái đông) (%)	42,92	43,92	63,13

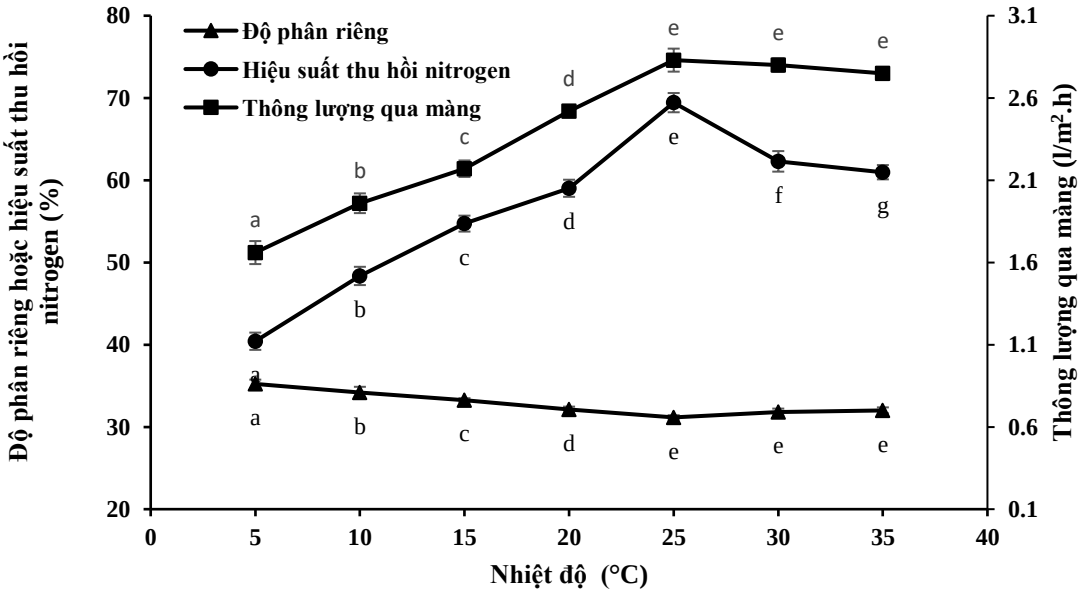
3.4. Thử nghiệm sử dụng màng lọc để phân đoạn collagen thủy phân và ứng dụng trong công nghệ thực phẩm

Nồng độ chất khô của dịch collagen thủy phân là 10,06±0,31%, thích hợp cho lọc màng UF (ultrafiltration). Khối lượng phân tử peptide qua dòng permeate có thể gấp 3 lần khối lượng quy định của màng (Fallis, 2013). Do khối lượng phân tử của các peptide trong dịch thủy phân chủ yếu nhỏ hơn 5 kDa, màng lọc UF có NMWC 1kDa được sử dụng.

3.4.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá tình lọc màng

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình lọc màng được thể hiện ở Hình 3.31. Khi tăng nhiệt độ từ 5 °C đến 25 °C thì thông lượng qua màng tăng độ phân riêng giảm và hiệu suất thu hồi nitrogen tăng. Có nghĩa là khi tăng nhiệt độ trong trong phạm vi này thì khả tăng tách các cấu tử trong dịch collagen thủy phân rất tốt là do

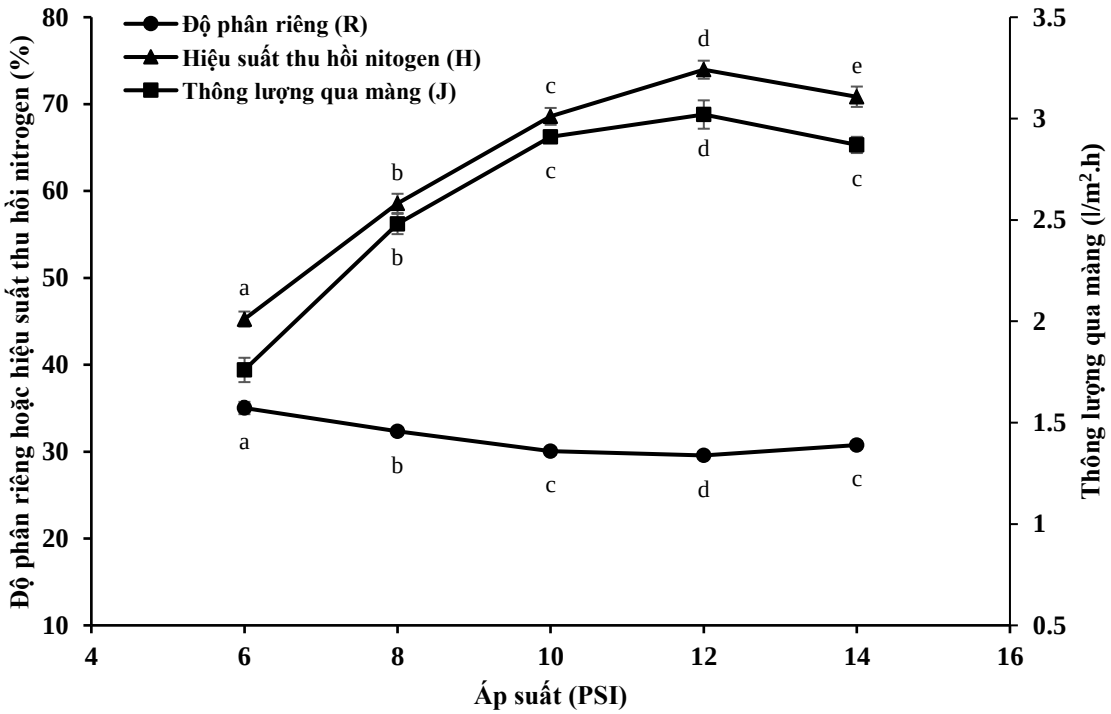
độ nhớt của dịch thủy phân giảm. Khi lọc ở nhiệt độ 25 °C và các điều kiện khác cố định thì thông lượng qua màng và hiệu suất thu hồi nitrogen là cao nhất lần lượt là 2,83 L/m^2.h và 69,43% còn độ phân riêng nhỏ nhất 31,16%.



Hình 3.31. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình lọc màng

Khi tiếp tục tăng nhiệt độ từ 25 °C đến 35 °C thì thông lượng qua màng tăng không đáng kể còn hiệu suất thu hồi nitrogen giảm và độ phân riêng tăng. Điều này hoàn toàn hợp lý khi nhiệt độ tăng thì khả năng hình thành các micelle tăng làm tăng độ phân riêng của màng (Shishegaran và ctv, 2020). Vì vậy nhiệt độ lọc màng dịch collagen thủy phân thích hợp là 25 °C.

3.4.2. Ảnh hưởng của áp suất đến quá trình lọc màng



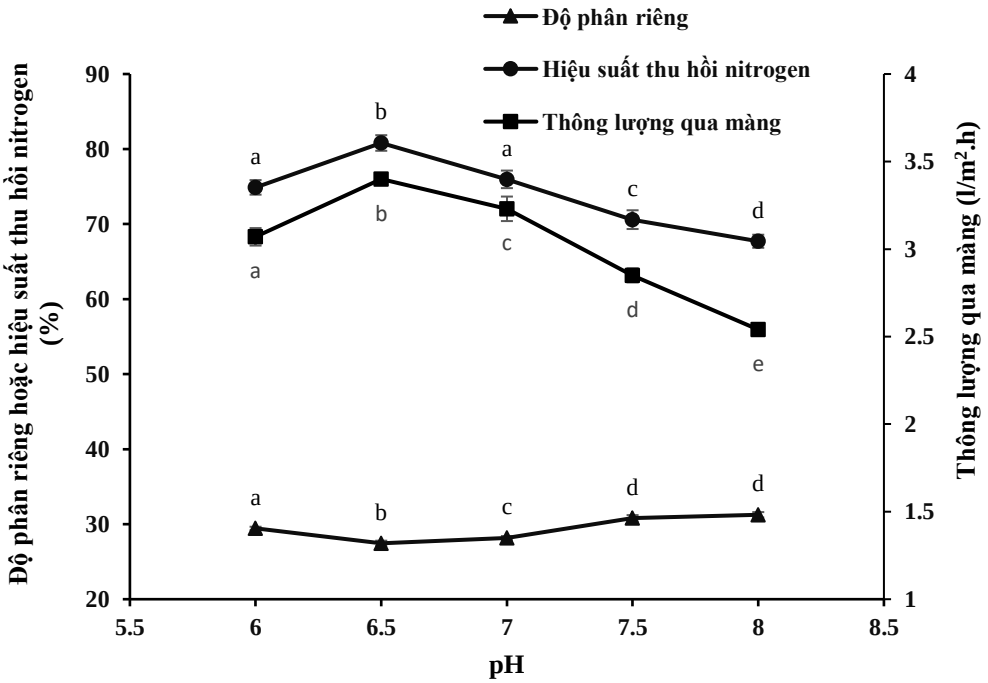
Hình 3.32. Ảnh hưởng của áp suất đến quá trình lọc màng

Hình 3.32 thể hiện sự ảnh hưởng của áp suất đến quá trình lọc màng. Khi tăng áp suất xuyên màng từ 6 – 12 psi thì thông lượng qua màng và hiệu suất thu hồi nitrogen tăng và độ phân riêng giảm. Nếu tăng áp suất xuyên màng từ 12 – 14 psi thì thông lượng qua màng giảm và độ phân riêng tăng dẫn đến hiệu suất thu hồi nitrogen giảm. Trong lọc tiếp tuyến áp suất xuyên màng chính là động lực cho các peptide collagen thẩm thấu qua màng nhưng khi tăng áp suất xuyên màng đến một giới hạn nào đó sẽ hình thành một lớp gel trên bề mặt màng dẫn đến thông lượng qua màng giảm (Fallis, 2013).

Như vậy, áp suất 12 psi là áp suất tốt nhất để lọc dung dịch collagen thủy phân trên thiết bị lọc (QuixStand Benchtop System**)** với áp suất này được cố định cho các nghiên cứu tiếp theo. thì thông lượng qua màng và hiệu suất thu hồi nitrogen là lớn nhất lần lượt là 3,02 L/m^2.h và 74,96% và độ phân riêng là nhỏ nhất 29,56% (Hình 3.32).

3.4.3. Ảnh hưởng của pH đến quá trình lọc màng

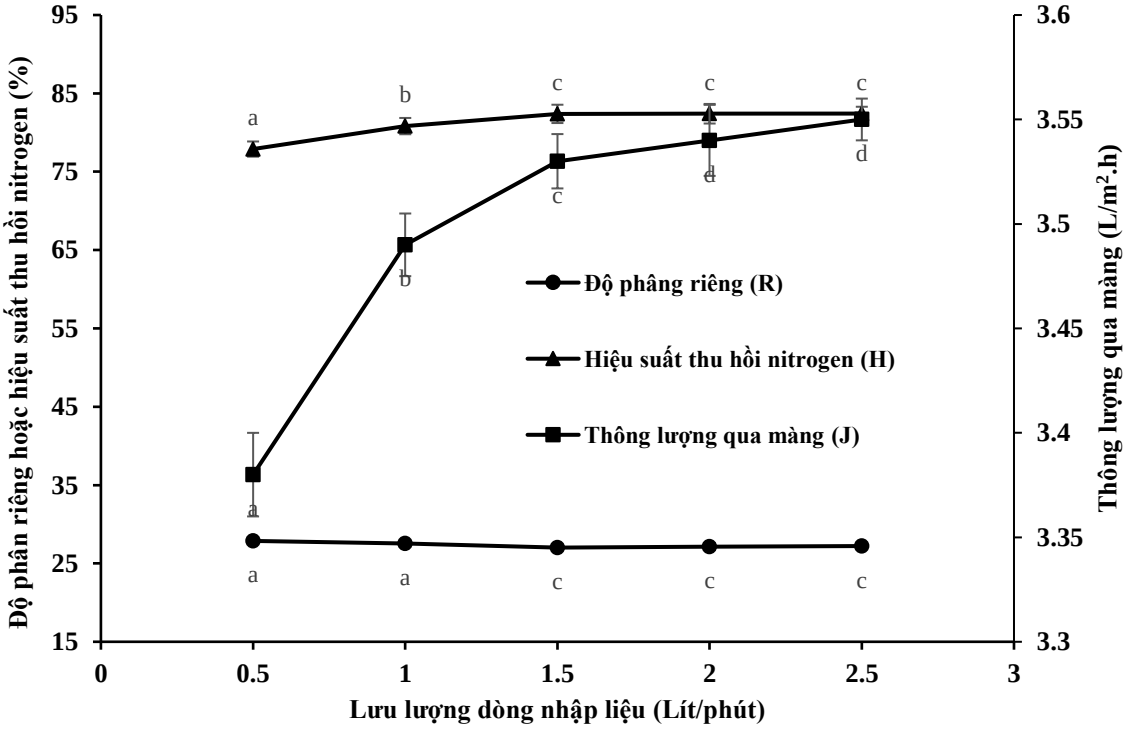
Ảnh hưởng của pH đến quá trình lọc màng được thể hiện ở Hình 3.33. Khi tăng pH từ 6,0 lên 6,5 thì thông lượng qua màng tăng, độ phân riêng giảm và hiệu suất thu hồi nitrogen tăng. Thông lượng qua màng và liệu suất thu hồi nitrogen đạt giá trị cao nhất lần lượt là 3.4 l/m^2.h và 80,81%. Khi pH tăng từ 6,5 đến 8,0 thì thông lượng qua màng, hiệu suất thu hồi nitrogen giảm còn độ phân riêng tăng. Điều này có thể giải thích rằng pH là một trong những thông số ảnh hưởng đến khả năng tích điện, cấu trúc và hình dạng của các peptide. Do đó khi lọc màng nó ảnh hưởng đến thông lượng qua màng và độ phân riêng của màng. Khi ở pH đẳng điện thì peptide bị kết tủa và khả năng thẩm thấu qua màng giảm làm giảm thông lượng qua màng. Còn pH lớn hơn hay nhỏ hơi pH đẳng điện thì các peptide sẽ tích điện và thay đổi khả năng thẩm thấu qua màng làm ảnh hưởng đến thông lượng qua màng (Fane, Fell, & Suki, 1983; Burns & Zydney, 1999). Nghiên cứu này cho thấy tại pH 6,5 thì thông lượng qua màng và hiệu suất thu hồi nitrogen là cao nhất.



Hình 3.33. Ảnh hưởng của pH đến quá trình lọc màng

3.4.4. Ảnh hưởng của lưu lượng dòng nhập liệu đến quá trình lọc màng

Ảnh hưởng của lưu lượng dòng nhập liệu đến quá trình lọc màng được thể hiện ở Hình 3.34. Khi tăng lưu lượng dòng nhập liệu từ 0,5 đến 1,5 l/m^2.h và các thông số khác không thay đổi thì thông lượng qua màng, hiệu suất thu hồi nitrogen tăng còn độ phân riêng giảm. Nhưng nếu tiếp tục tăng lưu lượng dòng nhập liệu tự 1,5 – 2,5 l/m^2.h thì lưu lượng qua màng, hiệu suất thu hồi nitrogen thay đổi không đáng kể. Mặt dầu lưu lượng dòng nhập liệu tạo ra áp suất xuyên màng nhưng trong thí nghiệm này lại cố định áp suất xuyên màng bằng cách điều chỉnh dòng hồi lưu. Nhưng khi tăng lưu lượng dòng nhập liệu và tăng dòng hồi lưu thì khả năng tắc nghẽn màng (fouling) vì dòng chảy tiếp tuyến cung cấp một động lực cọ rửa nhằm hạn chế sự tích tụ của các cấu tử không thẩm thấu được ở bề mặt màng và do đó thông lượng thấm được duy trì ở mức ổn định. Trong nghiên cứu này lưu lượng dòng nhập liệu tốt nhất là 1,5 l/phút.



Hình 3.34. Ảnh hưởng của lưu lượng dòng nhập liệu đến quá trình lọc màng

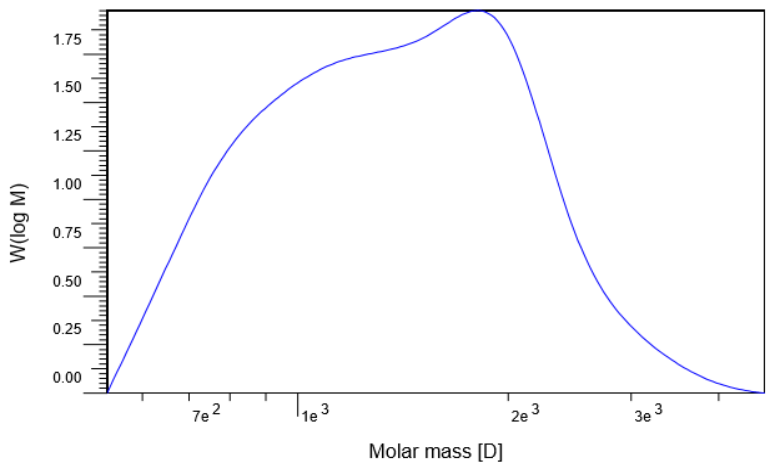
3.4.5. Thành phần hóa học, hiệu suất thu hồi của các loại dịch thủy phân qua các công đoạn tinh sạch

Để so sánh mức độ tinh sạch của các loại dịch collagen thủy phân qua các công đoạn làm sạch như lọc chân không, ly tâm và lọc màng UF. Bảng 3.18 cho thấy dịch collagen thủy phân sau khi lọc qua màng UFP-1-C-6 của GE (Mỹ) với chất liệu là Polysulfone với trọng lượng phân tử cắt (NMWC) là 1kDa trên thiết bị lọc QuixStand Benchtop System. Dòng thẩm thấu qua màng (permeate) là SP1 còn dòng hồi lưu (retentate) là SP2. Kết quả ở Bảng 3.18. cho thấy hiệu suất thu hồi của nitrogen trong SP1 và SP2 lần lượt là 71,33±1,13% và 7,97±1,06%. Hiệu suất thu hồi collagen trong SP1 và SP2 lần lượt là 86,01±0,43% và 8,51±0,52%. Trong phân đoạn SP1 có hàm lượng lipid thấp hơn nhiều trong phân đoạn SP2 vì kích thước của lipid không thẩm thấu qua màng. Hàm lượng đạm và chất khô trong phân đoạn SP2 cao hơn trong phân đoạn SP1, điều này là hoàn toàn hợp lý vì khi lọc màng thì phần dung môi (nước) và các peptide collagen kích thước nhỏ thẩm thấu qua màng còn các peptide có kích thước lớn không thẩm thấu qua màng làm cho nồng độ chất tan trong dòng hồi lưu ngày càng tăng. Phân đoạn SP1 trong và sáng hơn nhiều so với phân đoạn SP2.

Bảng 3.18. Thành phần hóa học và hiệu suất thu hồi của các loại dịch thủy phân qua các công đoạn tinh sạch

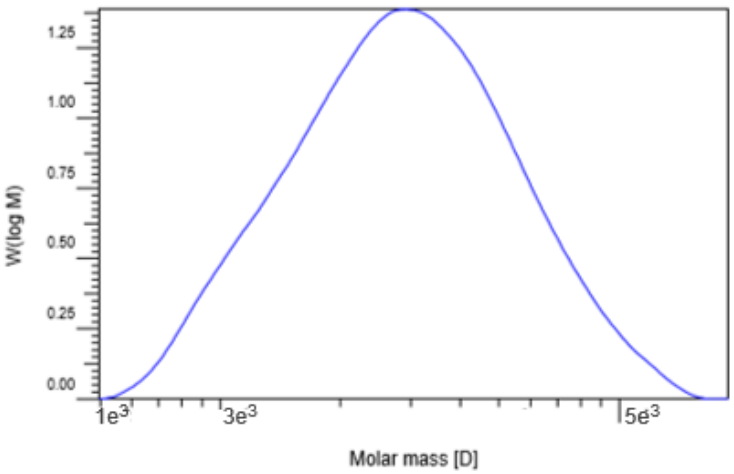
Chỉ tiêu	Dịch thủy phân	Dịch sau lọc chân không	Dịch sau ly tâm	SP1	SP2
Đạm (gN/L)	$14,7^{a}$±0,50	$15,1^{a}$±0,53	$14,6^{b}$±0,32	$14,14^{b}$±0,40	$18,63^{c}$±0,35
Lipid (%)	$0,55^{a}$±0,05	$0,08^{b}$±0,02	$0,09^{b}$±0,01	$0,05^{c}$±0,01	$0,40^{d}$±0,04
Tro (%)	$0,17^{a}$±0,01	$0,17^{a}$±0,02	$0,171^{a}$±0,01	$0,175^{b}$±0,02	$0,139^{c}$±0,02
Chất khô (%)	$10,06^{a}$±0,31	$9,77^{a}$±0,24	$9,69^{a}$±0,15	$9,04^{b}$±0,33	$15,41^{c}$±0,26
Hiệu suất thu hồi nitrogen (%)	$82,82^{a}$±1,50	$79,92^{b}$±1,05	$79,30^{b}$ ±0,50	$71,33^{c}$±1,13	$7,97^{d}$±1,06
Hiệu suất thu hồi collagen (%)	$96,61^{a}$±0,95	$94,81^{b}$±1,02	$94,52^{b}$±0,35	$86,01^{c}$±0,43	$8,51^{d}$±0,52

a, b, c, d: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%



Mn:	**1,2550e3**	**g/mol**
Mw:	**1,4872e3**	**g/mol**
Mz:	**1,7483e3**	**g/mol**
Mv:	**1,4872e3**	**g/mol**
D :	**1,1851e0**	
[n] :	**0,000000**	**ml/g**
Vp:	**8,9927e0**	**ml**
Mp:	**1,8107e3**	**g/mol**
A :	**3,3934e5**	**ml*V**
10%	**4,1578e2**	**g/mol**
30%	**1,0607e3**	**g/mol**
50%	**1,3837e3**	**g/mol**
70%	**1,7696e3**	**g/mol**
90%	**2,3110e3**	**g/mol**

Hình 3.35. Phân bố khối lượng phân tử peptide collagen của SP1



Mn:	**4,0318e3**	**g/mol**
Mw:	**3,4606e3**	**g/mol**
Mz:	**4,9638e3**	**g/mol**
Mv:	**3,4606e3**	**g/mol**
D :	**1,4841e0**	
[n] :	**0,000000**	**ml/g**
Vp:	**8,6687e0**	**ml**
Mp:	**2,9189e3**	**g/mol**
A :	**7,0641e2**	**ml*V**
10%	**3,0044e3**	**g/mol**
30%	**3,4628e3**	**g/mol**
50%	**3,8648e3**	**g/mol**
70%	**4,0402e3**	**g/mol**
90%	**4,9650e3**	**g/mol**

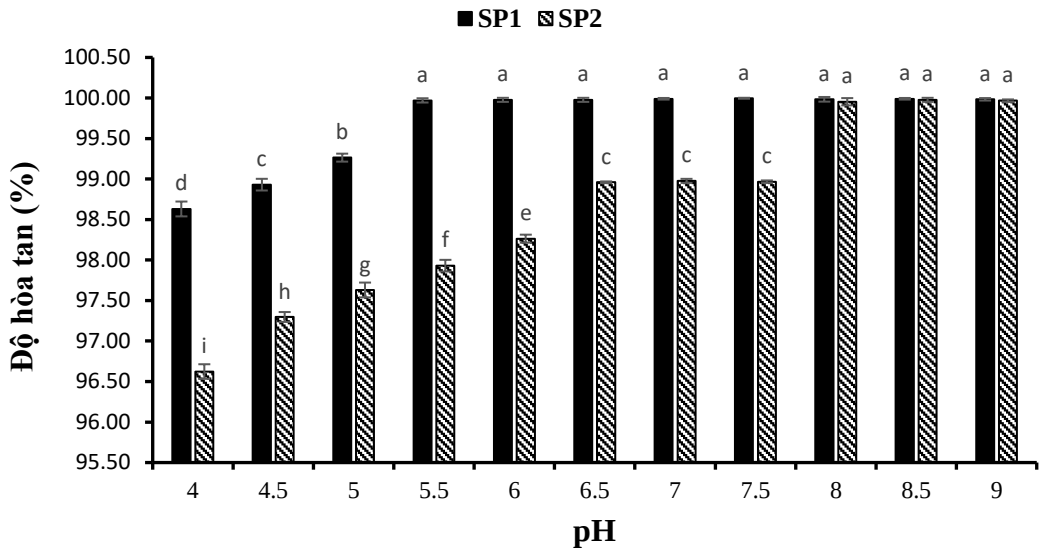
Hình 3.36. Phân bố khối lượng phân tử peptide collagen của SP2

3.4.6. Kết quả khảo sát tính chất của collagen thủy phân

3.4.6.1. Khả năng hòa tan

Khả năng hòa tan của collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng ở các độ pH khác nhau được thể hiện trong Hình 3.37. Tất cả các phân đoạn peptide collagen đều hòa tan trong một phạm vi pH rộng, với độ hòa tan hơn 96%. Hình 3.37 cho thấy đối với sản phẩm SP1 có độ hòa tan tăng khi pH tăng từ 4,0 lên 5,5 nhưng độ tan gần như không thay đổi khi tăng pH từ 5,5 đến 9,0. Trong môi trường axit thì SP2 có độ hòa

tan nhỏ hơn trong môi trường kiềm. Kết quả cho thấy độ hòa tan của SP1 đạt 99,97% tại pH ≥ 5.5 tương đương với độ hòa tan của SP2 99,95 với pH ≥ 8,0. Với pH ≤ 5.5 thì độ hòa tan của SP1 cao hơn so với SP2.



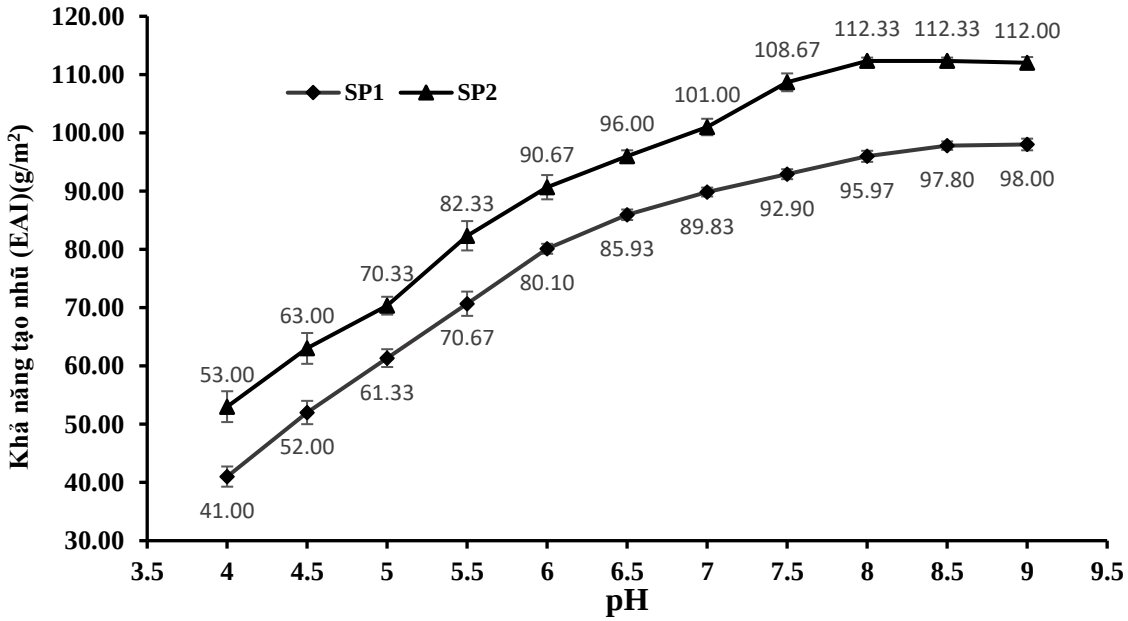
Hình 3.37. Ảnh hưởng của pH đến độ hòa tan của collagen thủy phân

Độ hòa tan của collagen thủy phân thu được khi thủy phân collagen từ da cá thu Tây Ban Nha (*Scomberomorous niphonius*) là 89,70% (Chi và ctv, 2014) và cũng một nghiên cứu khác khi cho thấy khi thủy phân collagen từ da cá Ornate threadfin bream (Nemipterus hexodon) thu được các peptide collagen có độ hòa tan là 99,30% (Nalinanon và ctv, 2011). Nói chung, sự thủy phân protein thành các peptide có khối lượng phân tử nhỏ dẫn đến các sản phẩm có độ hòa tan khác nhau (Klompong và ctv, 2007; Gbogouri và ctv, 2004). Các peptide có phân tử lượng càng nhỏ từ các protein sợi myofibrillar khi thủy phân sẽ có nhóm phân cực nhiều hơn và khả năng tạo liên kết hydro với nước dễ dàng hơn nên tăng khả năng hòa tan (Gbogouri và ctv, 2004). Thủy phân bằng enzyme có khả năng ảnh hưởng đến kích thước phân tử và tính kỵ nước, cũng như là nhóm phân cực và có thể ion hóa của protein thủy phân (Mutilangi và ctv, 1996). Sự cân bằng của lực hút nước và kỵ nước của peptide là một ảnh hưởng quan trọng khác đến độ hòa tan của sản phẩm thủy phân protein (Klompong và ctv, 2007; Gbogouri và ctv, 2004). Do đó, sự khác biệt về độ hòa tan của các phân đoạn peptide khác nhau và có thể được xác định bởi kích thước của các peptide, cân bằng

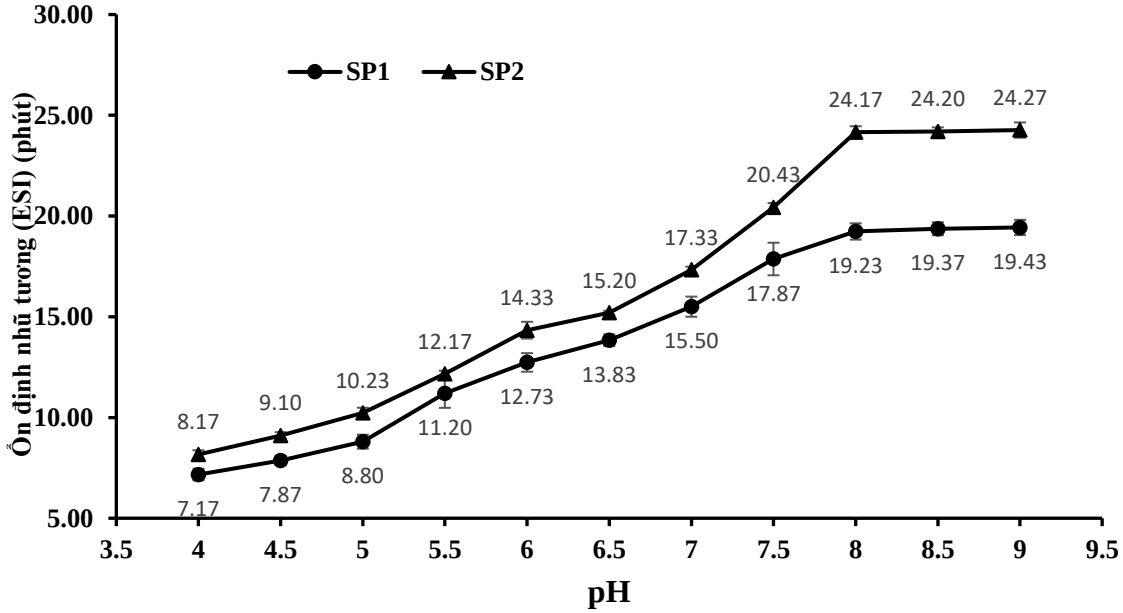
kỵ nước - ưa nước, cũng như nhóm điện tích của các peptide được tạo ra trong quá trình thủy phân.

3.4.6.2. Khả năng tạo nhũ của collagen thủy phân

Chỉ số hoạt động của nhũ tương (EAI) và chỉ số ổn định của nhũ tương (ESI) sản phẩm thủy phân collagen từ da cá ngừ vây vàng được biểu diễn trên Hình 3.38 và Hình 3.39. Cả hai chỉ số EAI và ESI của SP2 và SP1 đều tăng khi pH tăng. Hình 3.38 cho thấy EAI của SP2 cao hơn SP1 và chỉ số hoạt động nhũ tương có sự thay đổi không đáng kể khi pH > 8,0 đối với SP2 và pH > 8,5 đối với SP1 ($p < 0,05$). Khả năng tạo nhũ tương cao nhất là 112,33 (m^2/g) và 97,80 (m^2/g) lần lượt của SP2 và SP1 ($p < 0,05$). Kết quả này tương đồng với Chi và các ctv (2014) với EAI của collagen thủy phân từ da cá thu Tây Ban Nha (*Scomberomorous niphonius*) là 97,44 (m^2/g) (Chi và ctv, 2014) và từ da cá Ornate threadfin bream (Nemipterus hexodon) là 116,00 (m^2/g) (Nalinanon và ctv, 2011). Khi độ thủy phân cao, các peptide có trọng lượng phân tử thấp làm mất các đặc tính nhũ hóa (Klompong và ctv., 2007; Gbogouri và ctv, 2004). Klompong và ctv (2007) cho rằng các peptide có MW thấp có thể không đủ amphiphilic để thể hiện sự thích hợp nhũ hóa tốt.



Hình 3.38. Ảnh hưởng của pH đến khả năng tạo nhũ (EAI) của collagen thủy phân

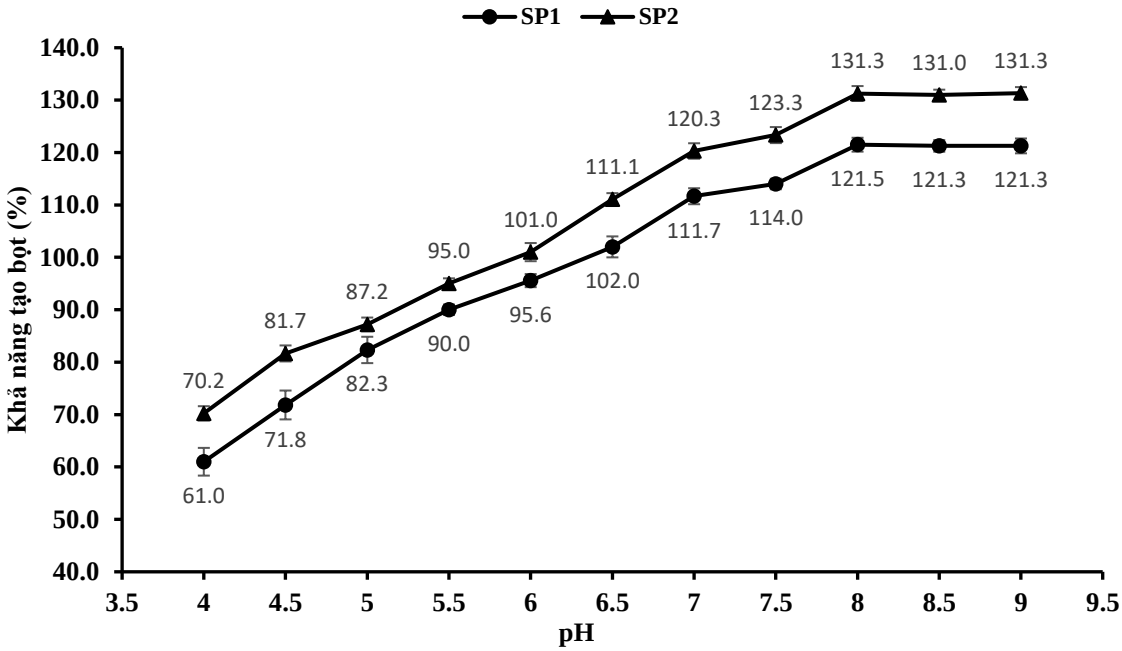


Hình 3.39. Ảnh hưởng của pH đến khả năng ổn định nhũ tương (ESI) của colllagen thủy phân

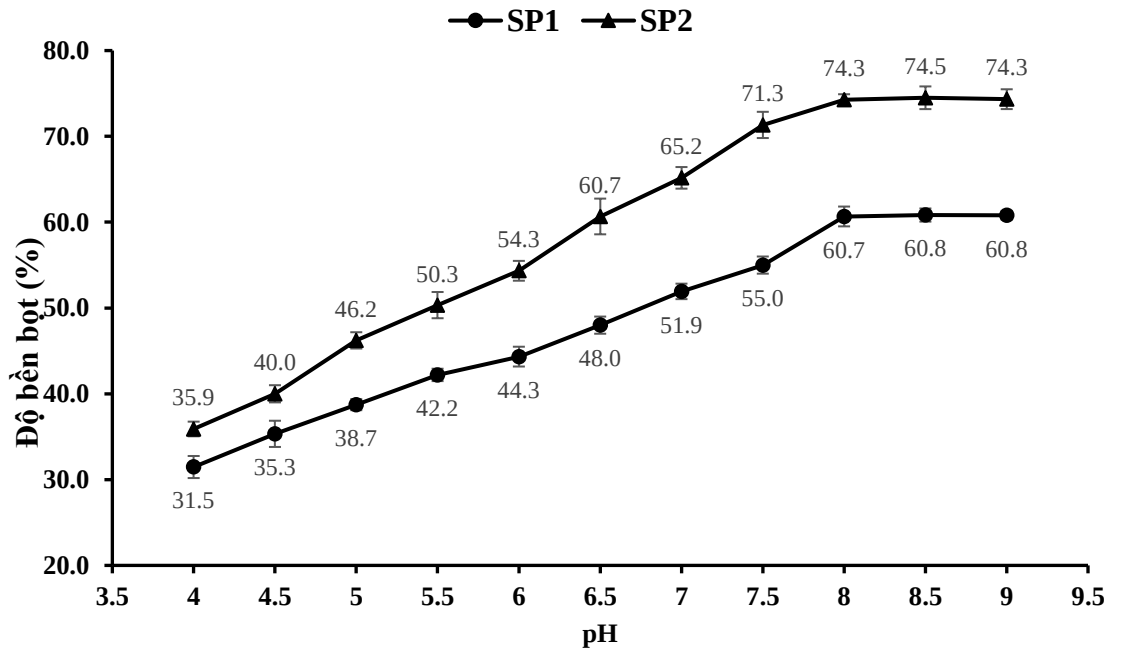
Hình 3.39 cho thấy ESI của SP2 cao hơn SP1 tăng khi pH tăng và chỉ số ổn định nhũ tương thay đổi không đáng kể khi pH > 8,0 ($p < 0,05$). Khả ổn định nhũ tương cao nhất là 24,17 (phút) và 19,23(phút) lần lượt của SP2 và SP1 ($p < 0,05$). Sản phẩm SP2 có kết quả ESI tương đồng với collagen thủy phân từ da cá Ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*) là 25,80 (phút) (Nalinanon và ctv, 2011). Mutilangi và ctv. (1996) công nhận rằng các peptide có trọng lượng phân tử cao hơngóp phần vào sự ổn định của nhũ tương (Mutilangi và ctv, 1996).

3.4.6.3. Khả năng tạo bọt của collagen thủy phân

Tính chất tạo bọt là đặc điểm hóa lý quan trọng của protein (Thiansilakul và ctv 2007). Khả năng tạo bọt (FC) và độ ổn định bọt (FS) của hai phân đoạn collagen thủy phân SP2 và SP1 được thể hiện trong Hình 3.40 và Hình 3.41.



Hình 3.40. Ảnh hưởng của pH đến khả năng tạo bọt của collagen thủy phân



Hình 3.41. Ảnh hưởng của pH đến khả năng bền bọt của collagen thủy phân

Khả năng tạo bọt (FC) và độ ổn định của bọt (FS) của SP1 lớn hơn SP2. Cả hai chỉ số FC và FS đều tăng khi pH tăng từ 4,0 đến 8,0 và không có sự khác biệt khi pH ≥ 8,0 ($p < 0,05$). Khả năng tạo bọt và bền bọt của SP2 đạt lần lượt là 131,3% và

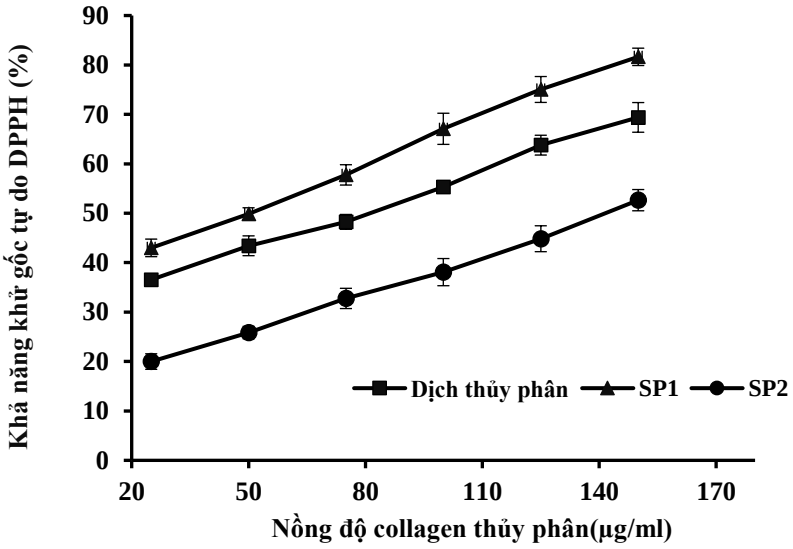
73,3% (p <0,05). Kết quả này cũng tương đồng với Nalinanon và ctv 2011 của collagen thủy phân từ da cá Ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*) với FC và FS lần lượt là 131,0% và 78% (Nalinanon và ctv, 2011). Khả năng tạo bọt và ổn định bọt của SP1 lần lượt là 121,5% và 60,7% (p < 0,05). Điều này có thể là do sự liên kết yếu hơn của các peptide nhỏ trong giao diện của bề mặt không khí - nước (Nalinanon, Benjakul, Visessanguan, & Kishimura, 2008). Sự hình thành bọt được điều chỉnh bởi ba yếu tố, bao gồm vận chuyển, thâm nhập và tổ chức lại các phân tử tại giao diện không khí và nước (Klompong và ctv, 2007). Nói chung, các protein, hấp thụ nhanh chóng tại giao diện không khí-lỏng mới được tạo ra trong quá trình tạo bọt và tăng lên, phân tử sắp xếp lại ở giao diện, thể hiện khả năng tạo bọt tốt hơn protein hấp thụ chậm (Damodaran, 1997). Một kết quả tương tự cũng được báo cáo trong các sản phẩm thủy phân protein từ thịt tre sọc vàng được điều chế bởi Alcalase và Flavourzyme với 5–25% DH (Klompong và ctv, 2007). Người ta cho rằng các peptide có MW thấp không thể duy trì sự định hướng có trật tự của phân tử tại bề mặt phân cách.

3.4.6.4. Hoạt tính chống oxy hóa của từng phân đoạn

Các quá trình oxy hóa xảy ra trong hệ thống thực phẩm hoặc sinh học rất phức tạp do các cơ chế phản ứng khác nhau. Do đó, trong nghiên cứu này, hoạt tính chống oxy hóa của dịch collagen thủy phân và hai phân đoạn SP1 và SP2 được xác định thông qua khả năng khử gốc tự do DPPH, năng lực khử và khả năng chống oxy hóa trên môi trường dầu-nước.

a. Khả năng khử gốc tự do DPPH (2,2- Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) là một hợp nhất có màu tím và có thể xác định ở bước sóng 517 nm. Khi gặp chất nền có electron tự do nó sẽ oxy hóa (nhận electron) và trở thành một phân tử từ tính ổn định và mất màu tím (Bougatef và ctv, 2010). Do đó, khả năng của các chất chống oxy hóa có thể được đánh giá bằng khả năng khử gốc tự do của DPPH. DPPH% của dịch collagen thủy phân, phân đoạn SP2 và SP1 được trình bày trong Hình 3.42.



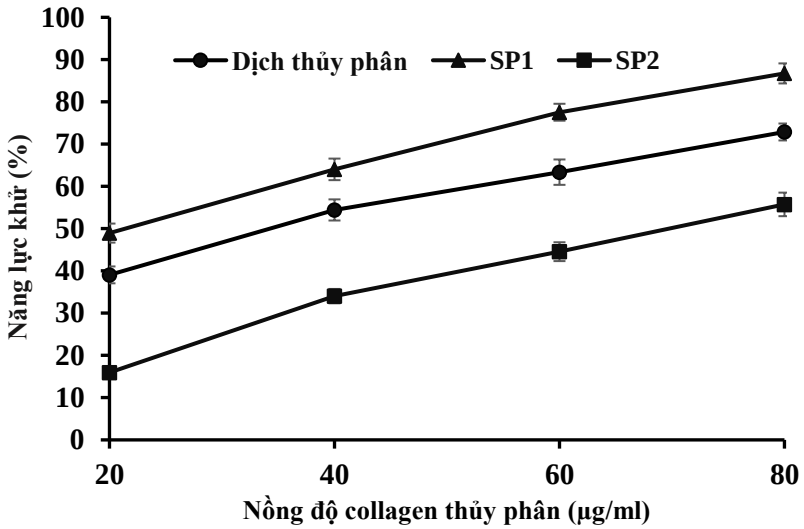
Hình 3.42. Khả năng khử gốc tự do DPPH của collagen

Hình 3.42 cho thấy ở nồng độ collagen thủy phân 25 – 150 µg/ml thì khả năng khử gốc tự do DPPH (%) của dịch thủy phân, phân đoạn SP2 và SP1 lần lượt trong các khoảng 36,54% – 69,39%, 19,99 % – 52,64% và 42,99% – 81,64%. Khi đó, dịch collagen thủy phân, phân đoạn SP2 và SP1 có hoạt tính gốc DPPH với IC50 lần lượt là 77,04 µg/ml, 142,98 µg/ml và 48,51 µg/ml. So sánh với chất chống oxy hóa mạnh là Vitamin C với IC50 của nó là 5,29 µg/ml cho thấy dịch collagen thủy phân và các phân đoạn SP2 và SP1 đều có khả năng kháng oxy hóa tương đối cao. Hoạt tính khử gốc tự do DPPH của dịch thủy phân collagen này cao hơn so với thủy phân collagen từ da cá thu Tây Ban Nha (IC50 = 1570 µg/ml) (Chi và ctv, 2014) và da cá pollack ở Alaska (IC50 = 2500 µg/ml) (Jia và ctv, 2010), và tương đương với phân đoạn peptide từ 3 – 10 kDa từ da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*) trong nghiên cứu của Nurilmala và ctv (2020) với IC50 = 75,94 µg/ml.

Kết quả nghiên cứu cho thấy phân đoạn SP1 có khả năng khử gốc tự do DPPH cao hơn phân phân đoạn SP2. Các peptide collagen có phân tử lượng thấp có khả năng khử gốc tự do DPPH cao là do sự hiện diện của các nhóm carboxyl trong phân tử các axit amin có tính axit (Sarmadi & Ismail, 2010; Udenigwe & Aluko, 2011). Collagen thủy phân từ da cá hồi có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất ở phân đoạn có khối lượng phân tử nhỏ hơn 3 kDa (Wu và ctv, 2018).

b. Năng lực khử

Năng lực khử cũng là một phép phân tích nhằm đánh giá khả năng chống oxy hóa trong *vitro*.



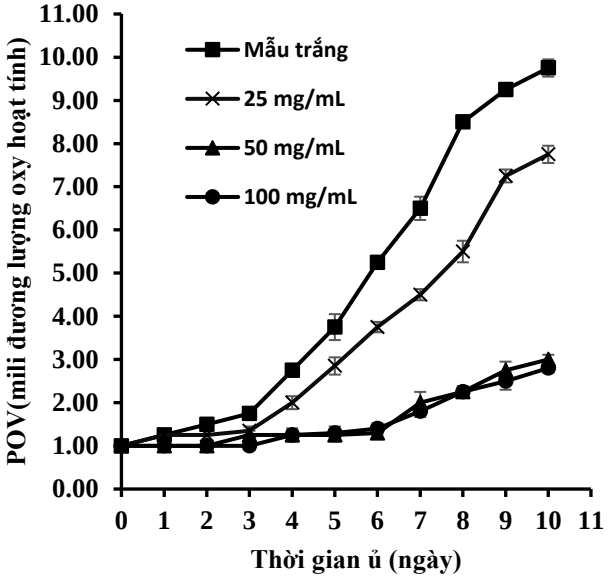
Hình 3.43. Ảnh hưởng nồng độ collagen collagen thủy phân đến năng lực khử

Hình 3.43 trình bày kết quả đánh giá năng lực khử của dịch collagen thủy phân, phân đoạn SP1 và SP2 sau khi lọc màng. Kết quả cho thấy năng lực khử thể hiện qua giá trị IC50 của dịch collagen thủy phân, phân đoạn SP1 và SP2 lần lượt là 36,59 µg/ml, 19,74 µg/ml và 75,66 µg/ml. Năng lực khử tỷ lệ thuận với nồng độ peptide collagen trong dung dịch (Hình 3.43). Nó cao hơn so với một số peptide phân lập từ các loài thủy sản khác như ACH-P3 từ vẩy của cá croceine croaker (IC50 = 170 µg/ml) (Wang và ctv, 2013), PSYV (IC50 = 2640 µg/ml) từ protein thủy phân từ cá loach (B. Wang và ctv, 2012), LKQELEDLLEKQE (IC50 46 µg/ml) protein hydrolyzate từ hàu (Qian và ctv, 2008) và FDSGPAGVL (IC50 78 µg/ml) từ mực khổng lồ (Mendis và ctv, 2005). Tuy nhiên, nó thấp hơn so với MQIFVKTLTG (IC50 = 5 µg/ml) và DLSDGEQGVL (IC50 = 7 µg/ml) protein thủy phân từ thịt nai (Kim và ctv, 2009).

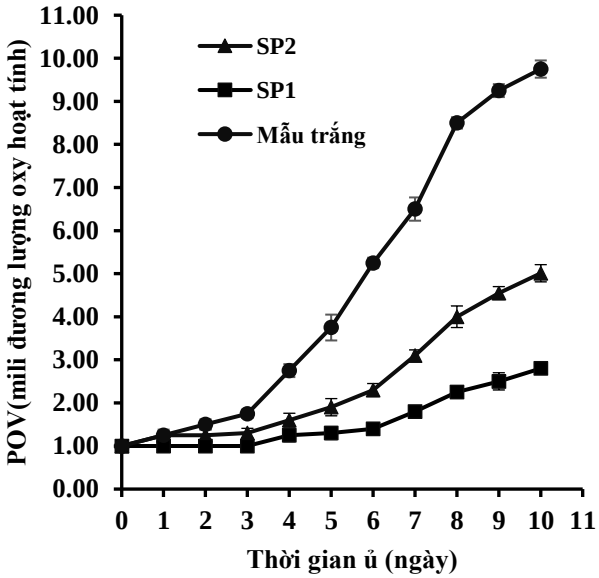
Kết quả nghiên cứu cho thấy phân đoạn SP1 có năng lực khử cao hơn phân phân đoạn SP2.

c. Khả năng chống oxy hóa trong môi trường dầu-nước

Quá trình oxy hóa của nhũ tương dầu trong nước là một vấn đề phổ biến gây ra mùi ôi và mất dinh dưỡng trong nhiều sản phẩm thực phẩm như nước sốt, súp và đồ uống (Cheng và ctv, 2010). Do đó, hoạt tính chống oxy hóa của collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng cũng được đánh giá thông qua khả năng ức chế quá trình oxy hóa lipid bằng sự thay đổi giá trị peroxide (POV) của hệ nhũ tương.



Hình 3.44. Ảnh hưởng nồng độ collagen đến khả năng chống oxy hóa trong môi trường dầu-nước



Hình 3.45. Ảnh hưởng các phân đoạn colllagen đến khả năng chống oxy hóa trong môi trường dầu-nước

Như được biểu thị trong Hình 3.44, trong 10 ngày ủ ở 50 °C, mẫu nhũ tương với việc bổ sung 50mg/ml collagen thủy phân cho thấy tỷ lệ ức chế POV lên tới 73,53% (ngày 8) và có mức ức chế trung bình là 57,95 %, tương tự như mẫu với 100 mg/ml collagen thủy phân, nhưng cao hơn mẫu với 25 mg/ml collagen thủy phân. Kết quả này tương đương với tỷ lệ ức chế giá trị POV được báo cáo trước đây của protein thủy phân từ hạt cao lương và protein thủy phân từ khoai tây, lần lượt là 55,38% và 62,80%, trong 10 ngày ủ với nồng độ 20 mg/ml (Cheng và ctv, 2010; Xu và ctv, 2019).

Trong nghiên cứu này hoạt tính ức chế sự oxy hóa của hệ nhũ tương của các phân đoạn collagen SP1 và SP2 là khác nhau (Hình 3.45). Mẫu nhũ tương với việc bổ sung 50mg/ml collagen thủy phân mỗi phân đoạn SP1 và SP2 cho thấy tỷ lệ ức chế POV lần lượt là 73,53% và 52,94% (ngày 8) và có mức ức chế trung bình là 57,95% và 39,44% (sau 10 ngày). Như vậy phân đoạn SP1 có khả năng ức chế oxy hóa hệ nhũ tương cao hơn so với phân đoạn SP2.

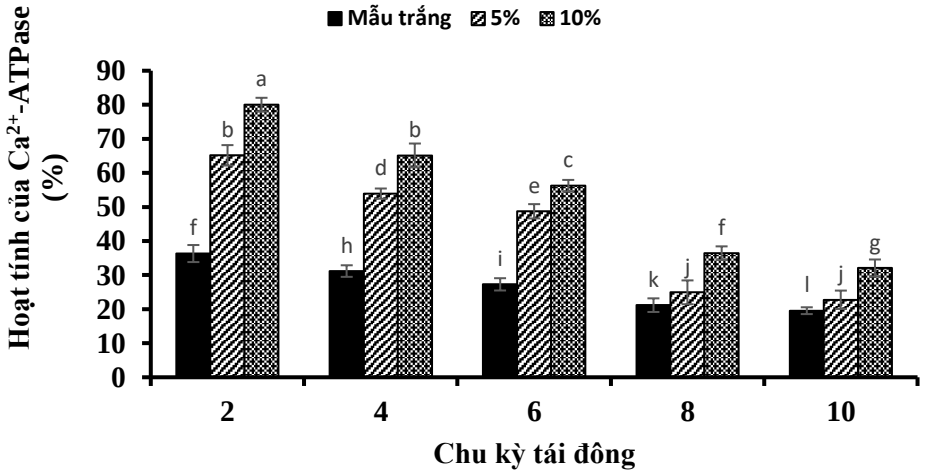
Kết quả đã chứng minh hoạt động chống oxy hóa của collagen hydrolyzate trong việc ức chế oxy hóa lipid, từ đó ổn định và làm chậm quá trình oxy hóa nhũ tương.

Peptide thu được khi thủy phân protein của cá bằng enzyme đã cho thấy các hoạt động chống oxy hóa đáng kể trong các hệ thống oxy hóa khác nhau (Lassoued, Mora, Nasri, Aydi và ctv, 2015; Lassoued, Mora, Nasri, Jridi và ctv, 2015; Nalinanon và ctv, 2011; Razali, Amin, & Sarbon, 2015; Vignesh và ctv, 2011). Theo Vignesh và ctv (2011) xác định chất chống oxy hóa hoạt động của quá trình thủy phân protein phụ thuộc vào mức độ và thành phần của cả axit amin tự do và peptide. Bên cạnh đó, Lassoued, Mora, Barkia (2015) đã đề cập rằng hoạt động chống oxy hóa là liên quan đến thành phần axit amin, trình tự và tính kỵ nước. Hầu hết các peptide chống oxy hóa được xác định cho đến nay đều ngắn (từ 5 – 16 axit amin) và chứa axit amin kỵ nước (Val và Leu) ở đầu cuối N của chuỗi peptide và Pro, His hoặc Tyr trong trình tự của chúng. Ngoài ra hoạt động chống oxy hóa của collagen thủy phân có thể là do nhiều cơ chế, trong đó thành phần axit amin của chuỗi peptide có tầm quan trọng vì các axit amin kỵ nước như Val, Ile, Leu, Met, Phe, Trp và Cys có khả năng thu nhận các gốc hydroxyl cao hơn các axit amin ưa nước (Betts & Russell, 2007; Ren và ctv, 2008). Thành phần collagen từ da cá chứa một lượng lớn axit amin kỵ nước như glycine, alanine, proline và methionine, do đó collagen hydrolyzate có khả năng chống oxy hóa cao (Matilla và ctv, 2002).

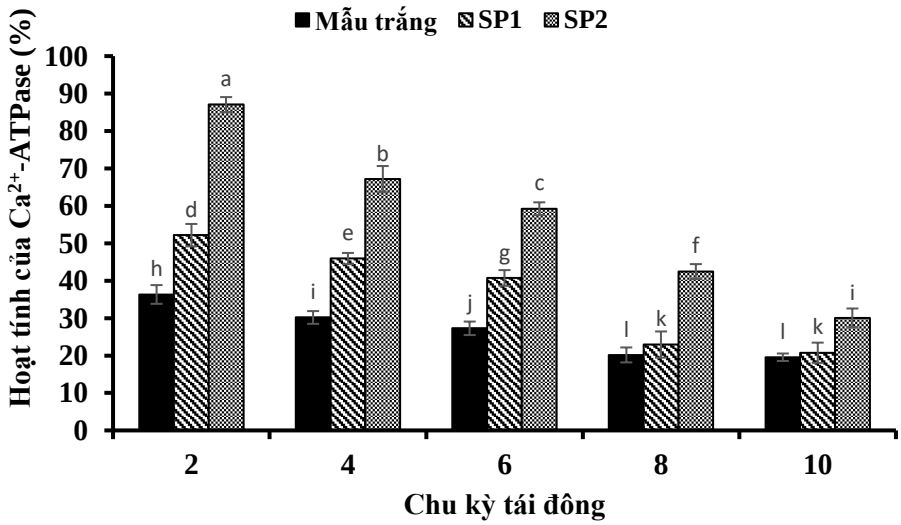
Kết quả đã chứng minh hoạt động chống oxy hóa của collagen hydrolyzate trong việc ức chế oxy hóa lipid, từ đó ổn định và làm chậm quá trình oxy hóa nhũ tương.

3.4.6.5. Khả năng chống đông của từng phân đoạn

Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng collagen có thể là một nguồn peptide chống đóng băng. Ví dụ, peptide (> 3 kDa) từ thủy phân collagen cá hồi thể hiện hoạt động chống đông bằng cách thay đổi hoạt tính $Ca2^{+}$ -ATPase của myoglobin sau 3, 6 và 9 chu kỳ đóng băng (Wu và ctv, 2018) hoặc peptide từ thủy phân da cá mập thể hiện tác dụng bảo vệ tế bào đối với surimi chịu các chu kỳ đóng băng khác nhau (Phanat và ctv, 2012). Do đó, collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng đã được đánh giá hoạt động chống đóng băng tiềm năng (Hình 3.46 và Hình 3.47).



Hình 3.46. Ảnh hưởng của nồng độ collagen đến hoạt tính chống đông



Hình 3.47. Ảnh hưởng của các phân đoạn collagen thủy phân đến khả năng chống đông

Kết quả nghiên cứu được thể hiện trong Hình 3.46, hoạt tính Ca2 + -ATPase còn lại của myoglobin giảm rõ rệt sau 2, 4, 6 và 10 chu kỳ đóng băng trong mẫu mà không có collagen collagen thủy phân. Các mẫu được thêm 10% collagen thủy phân có hoạt tính chống đông cao hơn đáng kể so với mẫu có 5% collagen thủy phân. Những dữ liệu này chỉ ra rằng hoạt động chống đóng băng phụ thuộc vào nồng độ collagen thủy phân trong dung dịch. Khi nồng độ tăng, nhiệt độ điểm đóng băng giảm, dẫn đến tăng hoạt động chống đóng băng.

Các phân đoạn peptide collagen thủy phân có khối lượng phân tử khác nhau thì khả năng chống đông khác nhau (Hình 3.47).

Trong chu kỳ đóng băng, các tinh thể băng được tạo ra và cường độ ion tăng lên, myosin có thể làm biến tính và phá hủy cấu trúc protein ban đầu (Benjakul & Sutthipan, 2009). Tuy nhiên, peptide của collagen hydrolyzate chứa lượng dư nhóm ưa nước cao, có thể liên kết với nước để ngăn chặn sự hình thành tinh thể băng (Phanat và ctv, 2012). Các peptide chống đông collagen loại I có thể tăng cường hoạt động liên kết và chống đóng băng của chúng bằng cách tăng số lượng các vị trí hoạt động do cấu trúc homo-dimers song song của chúng có chứa Ala và Thr trong cấu trúc xoắn ốc (Jeong và ctv, 2013). Nghiên cứu đã xác định khả năng chống đông của phân đoạn collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng có khối lượng phân tử từ 3 – 5 kDa có khả năng chống đông tốt hơn phân đoạn có khối lượng phân tử nhỏ hơn 3 kDa.

Tóm lại, khi sử dụng màng lọc UF (ultrafiltration) có khối lượng phân tử mặt cắt qua màng NMWC 1 kDa để lọc dung dịch collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng đã qua ly tâm thu được 2 sản phẩm collagen thủy phân SP1 và SP2 với khối lượng phân tử khác nhau và tính chất khác nhau được trình bày trong Bảng 3.19. Dựa vào kết quả thu được ở Bảng 3.19 cho thấy khả năng hòa tan của SP1 và SP2 là rất cao nhưng về tính chất tạo bọt, tạo nhũ tương và chống đông thì SP2 là cao hơn SP1 Ngược lại SP1 có tính chống oxy hóa mạnh hơn.

Bảng 3.19. Tóm tắt tính chất của các phân đoạn collagen thủy phân SP1 và SP2

Tính chất	Phân đoạn peptide collagen	
	SP1	**SP2**
Khối lượng phân tử	<3 kDa	3 – 5 kDa
Độ hòa tan (pH 4) (%)	> 98,63	> 96,62
Tỷ lệ (%)	90,0	10,0
Khả năng tạo nhũ tương (EAI) (g/m^2)	95,97	112,33
Độ bền nhũ tương (ESI) (g/m^2)	19,23	24,17
Khả năng tạo bọt (FC) (%)	121,50	131,30
Độ bền bọt (FS) (%)	60,70	74,30
Khử gốc tự do DPPH (IC50) (µg/ml)	48,51	142,98
Năng lực khử tổng (IC50) (µg/ml	19,74	75,66
Khả năng chống oxy hóa trên mô hình dầu nước (8 ngày)/mẫu trắng (mqE)	2,25/8,50	4,00/8,50
Khả năng chống đông (4 chu kỳ tái đông) (%)	45,92	67,13

3.4.7. So sánh tính chất của SP1, SP2 với ba phân đoạn F1, F2, F3

Bảng 3.20 trình bày tóm tắt tính chất của ba phân đoạn F1 F2, F3 và SP1, SP2. Với việc sử dụng màng lọc UFP-1-C-6 của GE (Mỹ) với khối lượng mặt cắt qua màng là 1kDa trên thiết bị lọc QuixStand Benchtop System thu được hai sản phẩm SP1 và SP2 khối lượng phân tử lần lượt < 3 kDa và 3 – 5 kDa. Tỷ lệ sản phẩm SP1 và SP2 lần lượt là 90% và 10%. So sánh với các phân đoạn F1, F2 và F3 sau khi chạy GPC cho thấy tính hòa tan của SP1 (98,63%) tương đương với phân đoạn F1 (98,69%) và F2 (98,45%), còn SP2 (96,62%) tương đương với phân đoạn F3; khả năng tạo nhũ, tạo bọt và chống đông thì SP1 tốt hơn F2 và SP2 lớn hơn F3; khả năng chống oxy hóa của SP1 thì thấp hơn F2 nhưng khả năng chống oxy hóa vẫn đạt mức cao với khả năng khử gốc tự do DPPH (IC50 = 48,51 µg/ml và năng lực khử tổng (IC50 = 19,74 µg/ml). Điều này cho thấy khi tinh sạch và phân đoạn collagen thủy phân bằng màng

lọc không làm thay đổi tính chất của các peptide colllagen và màng lọc có thể được sử dụng để sản xuất các phân đoạn collagen thủy phân với số lượng lớn phục vụ cho công nghiệp.

Bảng 3.20. Tóm tắt tính chất của các phân đoạn collagen thủy phân SP1 và SP2

Tính chất	Phân đoạn peptide collagen				
	F1	**F2**	**F3**	**SP1**	**SP2**
Khối lượng phân tử	<416 Da	416 Da – 1 kDa	1 kDa – 5 kDa	<3 kDa	3 – 5 kDa
Độ hòa tan (pH 4) (%)	> 98,63	> 98,00	> 97,52	> 98,63	> 96,62
Tỷ lệ (%)	10	40	50	90,0	10,0
Khả năng tạo nhũ tương (EAI) (g/m^2)	91,97	95,97	110,33	95,97	112,33
Độ bền nhũ tương (ESI) (g/m^2)	16,61	17,40	19,98	19,23	24,17
Khả năng tạo bọt (FC) (%)	115,50	121,50	130,05	121,50	131,30
Độ bền bọt (FS) (%)	60,70	62,67	73,50	60,70	74,30
Khử gốc tự do DPPH (IC50) (µg/ml)	28,64	40,64	120,75	48,51	142,98
Năng lực khử tổng (IC50) (µg/ml	13,30	16,57	57,38	19,74	75,66
Khả năng chống oxy hóa trên mô hình dầu nước (8 ngày)/mẫu trắng (mqE)	1,85/8,50	2,35/8,50	3,89/8,50	2,25/8,50	4,00/8,50
Khả năng chống đông (4 chu kỳ tái đông) (%)	42,92	43,92	63,13	45,92	67,13

3.4.8. Kết quả kiểm tra các chỉ tiêu vi sinh và kim loại nặng trong trong sản phẩm collagen thủy phân

Bảng 3.21. Kết quả kiểm tra kim loại nặng và vi sinh trong sản phẩm collagen thủy phân

STT	Chỉ tiêu	Phương pháp thử	Giới hạn phát hiện	Kết quả
1	Hàm lượng chì (mg/Kg)	AOAC 2016 (973.35)	3.00×10^{-2}	Không phát hiện
2	Hàm lượng thủy ngân (mg/Kg)	AOAC 2016 (971.21)	1.50×10^{-2}	Không phát hiện
3	Hàm lượng asen tổng số (mg/Kg)	TCVN 8427:2010	1.00×10^{-2}	Không phát hiện
4	Tổng số VSV hiếu khí	ISO 4833-1:2013	-	$2.2.10^3$CFU/g
5	*Escherichia coli*	ISO 16649-2: 2001	-	Không phát hiện
6	*Pseudomonas aeruginosa*	ISO 16266: 2006	-	Không phát hiện
7	*Staphylococcus aureus*	AOAC (975.55)	-	Không phát hiện
8	Tổng số bào tử nấm men, nấm mốc	ISO 21527-2: 2008	-	Không phát hiện
9	*Salmonella*	ISO 6579-1: 2017	-	Không phát hiện/25g

Kết quả về kiểm tra kim loại nặng và vi sinh vật trong Bảng 3.21 cho thấy sản phẩm collagen thủy phân đủ tiêu chuẩn để sử dụng vào sản phẩm thực phẩm.

3.4.9. Ứng dụng collagen thủy vào sản xuất thực phẩm

Với hai phân đoạn collagen thủy phân thu được từ quá trình lọc màng là SP1 và SP2 có khối lượng phân tử nhỏ có khả năng hòa tan, tạo bọt, tạo nhũ đồng thời có khả năng chống oxy hóa, chống đông tốt nên thường được sử dụng trong sản xuất các loại thực phẩm chức năng. Trong sản phẩm bơ sữa, collagen thủy phân đóng vai trò quan trọng trong việc tạo độ mịn, độ sánh cho sản phẩm. Khi bổ sung collagen thủy phân vào nước ép cam hoặc táo sẽ làm tăng làm lượng protein đồng thời làm tăng giá trị cảm quan cho sản phẩm (Bilek và Bayram, 2015).

Với phân đoạn SP1 có khối lượng phân tử nhỏ hơn 3 kDa có khả năng hòa tan và chống oxy hóa cao hơn sản phẩm SP2 nên được chọn bổ sung vào nước uống chanh dây để tăng hàm lượng đạm và tăng giá trị cảm quan cho sản phẩm. Với hoạt tính chống oxy hóa mạnh sẽ làm cho sản phẩm ít bị biến đổi về màu sắc. Đối với phân đoạn SP2 thì có độ hòa tan kém hơn phân đoạn SP1 nhưng có khả năng tạo nhũ và chống đông cao hơn nên được chọn bổ sung vào sản phẩm sữa chua để tăng độ mịn và tăng khả năng chống đông cho sản phẩm.

3.4.9.1. Ứng dụng phân đoạn (SP1) vào sản xuất nước uống chanh dây collagen

a. Xác định tỷ lệ nước phối trộn

Kết quả xác định tỷ lệ nước pha loãng được thể hiện ở Bảng 3.22 như sau:

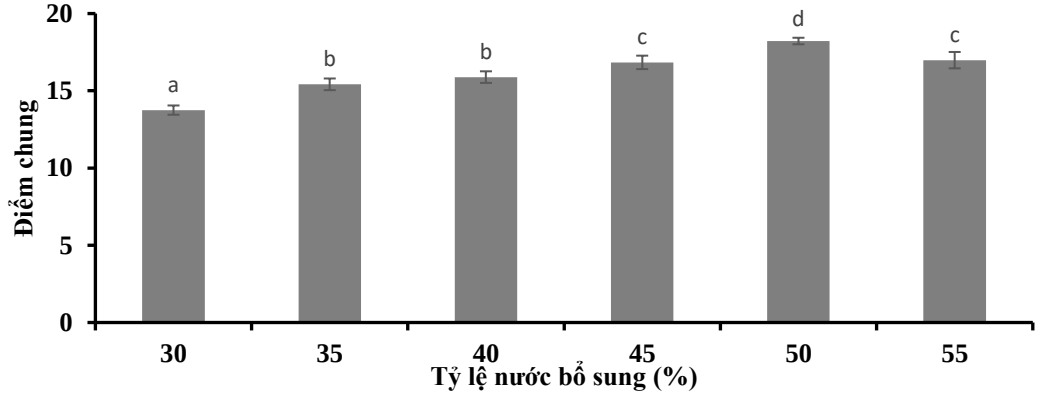
Bảng 3.22. Kết quả xác định tỷ lệ nước pha loãng

Tỷ lệ nước (%) so với dịch quả chanh dây	Màu sắc	Trạng thái	Mùi- vị
30%	Vàng cam	Nước trong, ít cặn lắng.	Vị ngọt gắt, chua, Mùi chanh dây nồng.
35%	Vàng cam hơi nhạt	Nước trong, ít cặn lắng.	Vị ngọt và chua. Mùi chanh dây hơi nồng.
40%	Vàng cam nhạt	Nước trong, ít cặn lắng.	Vị chua ngọt Mùi chanh dây hơi nồng
45%	Vàng rơm	Nước trong, ít cặn lắng.	Vị chua ngọt Mùi chanh dây hơi nồng
50%	Vàng chanh	Nước trong, ít cặn lắng.	Vị chua ngọt hài hòa. Mùi chanh dây nhẹ
55%	Vàng nhạt	Nước trong, ít cặn lắng.	Vị chua ngọt kém hài hòa. Mùi chanh dây nhẹ

Kết quả trên Bảng 3.22 và Hình 3.48 cho thấy lượng nước bổ sung vào với các tỷ lệ khác nhau có ảnh hưởng đến màu sắc cũng như mùi vị của sản phẩm. Khi lượng nước pha loãng 30% so với dịch dứa thì sản phẩm có màu vàng cam, vị ngọt gắt,

chua, mùi chanh dây nồng, dễ gây khó chịu cho người dùng. Khi lượng nước pha loãng 35% - 45% so với dịch dứa thì sản phẩm có màu vàng cam nhạt, vị ngọt, ít chua, mùi chanh dây hơi nồng. Theo khảo sát màu sắc sản phẩm ở tỷ lệ này được ưa thích nhất, do màu sắc hài hòa không quá đậm cũng không quá nhạt.

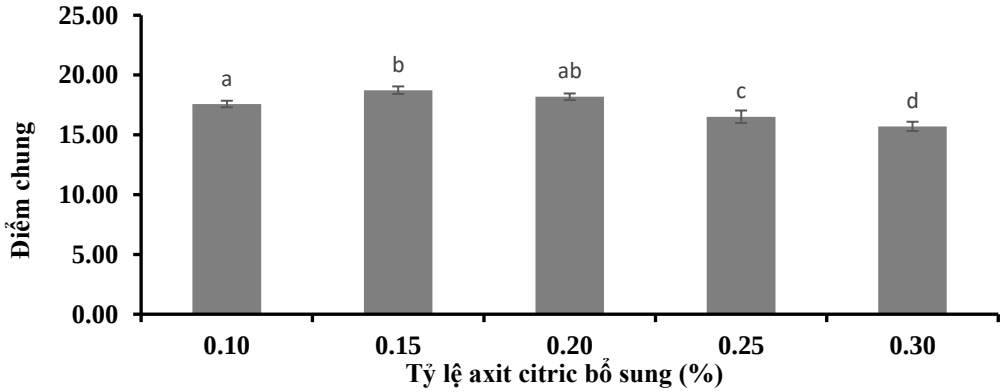
Khi lượng nước pha loãng 50% so với dịch dứa thì sản phẩm có màu vàng chanh, vị chua ngọt và mùi chanh dây hài hòa. Khi lượng nước pha loãng 55%- 60% so với dịch dứa thì sản phẩm chuyển sang màu rất nhạt, vị chua ngọt ít hài hòa và mùi chanh dây ít.



Hình 3. 48. Biểu diễn điểm chung của sản phẩm với các tỷ lệ nước phối trộn

Do đó, tỷ lệ nước pha loãng là 50% so với dịch chanh dây được sử dụng làm thông số cố định cho thí nghiệm tiếp theo.

b. Xác định tỷ lệ axit citric bổ sung



Hình 3. 49. Biểu diễn điểm chung của sản phẩm với các tỷ lệ axit citric phối trộn

Kết quả trên Hình 3.49 cho thấy axit citric bổ sung vào với các tỷ lệ khác nhau có ảnh hưởng đến trạng thái, màu sắc cũng như mùi vị của sản phẩm.

Về trạng thái: Tỷ lệ axit citric bổ sung không ảnh hưởng nhiều đến trạng thái của sản phẩm, sự khác biệt giữa các mẫu không quá lớn.

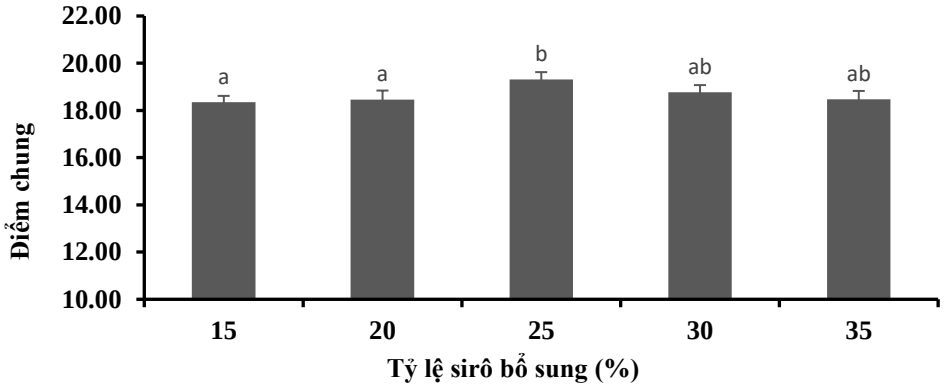
Về màu sắc: Tỷ lệ axit citric bổ sung không ảnh hưởng nhiều đến màu của sản phẩm, sự khác biệt giữa các mẫu không quá lớn

Về mùi- vị: Tỷ lệ axit citric bổ sung ảnh hưởng nhiều đến mùi, vị của sản phẩm, sự khác biệt giữa các mẫu khá rõ ràng.

Xét về tổng điểm và xếp loại, chọn kết quả tỷ lệ axit citric bổ sung là 0,15% so với dịch chanh dây làm chuẩn cho thí nghiệm tiếp theo.

c. Xác định tỷ lệ siro bổ sung

Kết quả điểm cảm quan sản phẩm theo tỷ lệ siro bổ sung được thể hiện ở Hình 3.50.

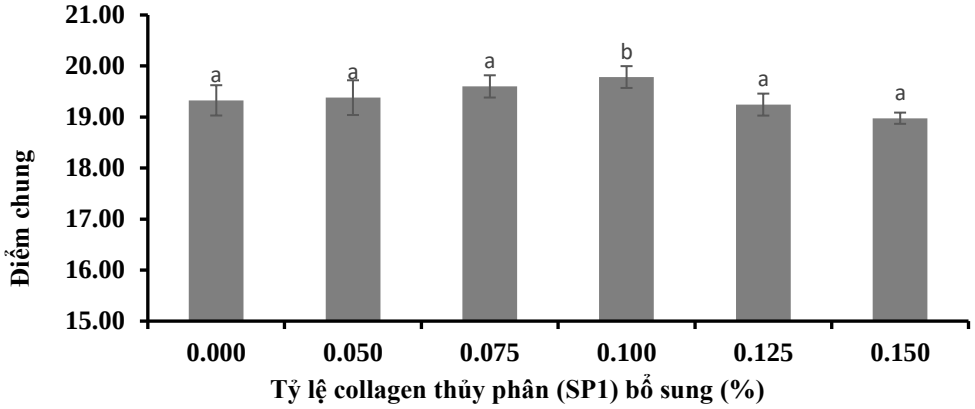


Hình 3.50. Biểu diễn điểm chung của sản phẩm với các tỷ lệ sirô phối trộn

Kết quả trên Hình 3.50, cho thấy mẫu có điểm thấp nhất là mẫu ở tỷ lệ siro 15% với 18,35 điểm. Mẫu có điểm cao nhất là mẫu có tỷ lệ 25% với 19,31 điểm. Sự khác biệt về tổng điểm cho thấy siro bổ sung vào với các tỷ lệ khác nhau có ảnh hưởng nhiều đến trạng thái và màu sắc và mùi vị của sản phẩm Xét về tổng điểm và xếp loại, chọn kết quả tỷ lệ siro bổ sung là 25% so với dịch chanh dây.

d. Xác định tỷ lệ collagen thủy phân bổ sung

Kết quả điểm cảm quan sản phẩm theo tỷ lệ collagen thủy phân bổ sung được thể hiện ở Hình 3.51.



Hình 3. 51. Biểu diễn điểm chung của sản phẩm với các tỷ lệ collagen thủy phân phối trộn

Kết quả trên Hình 3.51, cho thấy mẫu có điểm thấp nhất là mẫu ở nồng độ collagen 0.15% với 19,12 điểm. Mẫu có điểm cao nhất là mẫu có nồng độ collagen 0.1% với 19,78 điểm. Sự khác biệt về tổng điểm cho thấy collagen thủy phân bổ sung vào với các tỷ lệ khác nhau có ảnh hưởng nhiều đến trạng thái và màu sắc của sản phẩm, còn mùi vị không làm ảnh hưởng.

Xét về tổng điểm và xếp loại, chọn kết quả tỷ lệ collagen bổ sung là 0.1% so với dịch chanh dây.

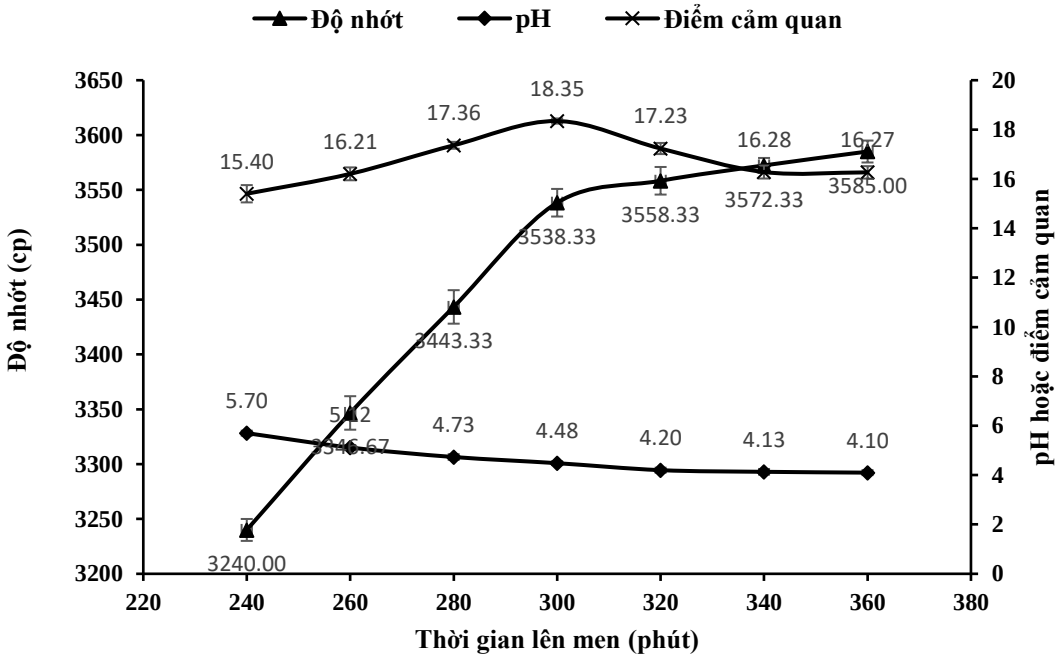
Vậy tỷ lệ thích hợp để sản xuất nước uống chanh dây collagen: 50% nước, 0,15% axit citric, 25% siro (60 °Bx), 0.1% collagen thủy phân và 29,75% nước ép chanh dây nguyên chất sẽ cho điểm cảm quan chung là cao nhất.

3.4.9.2. Ứng dụng phân đoạn (SP2) vào sản xuất sữa chua collagen

a. Xác định thời gian lên men

Các mẫu sữa được lên men với thời gian lần lượt là 240 phút; 260 phút; 280 phút; 300 phút; 320 phút; 340 phút và 360 phút ở nhiệt độ lên men là 45°C. Tỷ lệ collagen thủy phân được bổ sung là 0,1%. Với các chỉ tiêu theo dõi là độ nhớt, pH và điểm cảm quan của sản phẩm. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.52. Khi tăng thời gian lên men từ 240 phút lên 300 phút độ nhớt của sản phẩm sữa chua tăng nhanh từ 3240 centipoise(cp) lên 3538,33 cp, đồng thời pH của sản phẩm giảm từ 5,7 xuống 4,48. Hình 3.52 cho thấy khi tăng thời gian lên men từ 300 phút đến 360 phút thì độ nhớt của sản phẩm chậm và pH giảm từ 4,48 xuống 4,1. Điều này là phù hợp trong quá trình lên men lượng axit lactic sinh ra tăng theo thời gian lên men làm cho pH giảm.

Khi pH giảm làm cho protein trong sữa đông tụ và làm tăng độ nhớt. Nhưng khi lượng axit lactic sinh ra đủ lớn làm ức chế quá trình lên men của vi khuẩn là cho pH giảm chậm và độ nhớt tăng chậm.



Hình 3. 52. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến độ nhớt, pH và điểm cảm quan của sản phẩm sữa chua

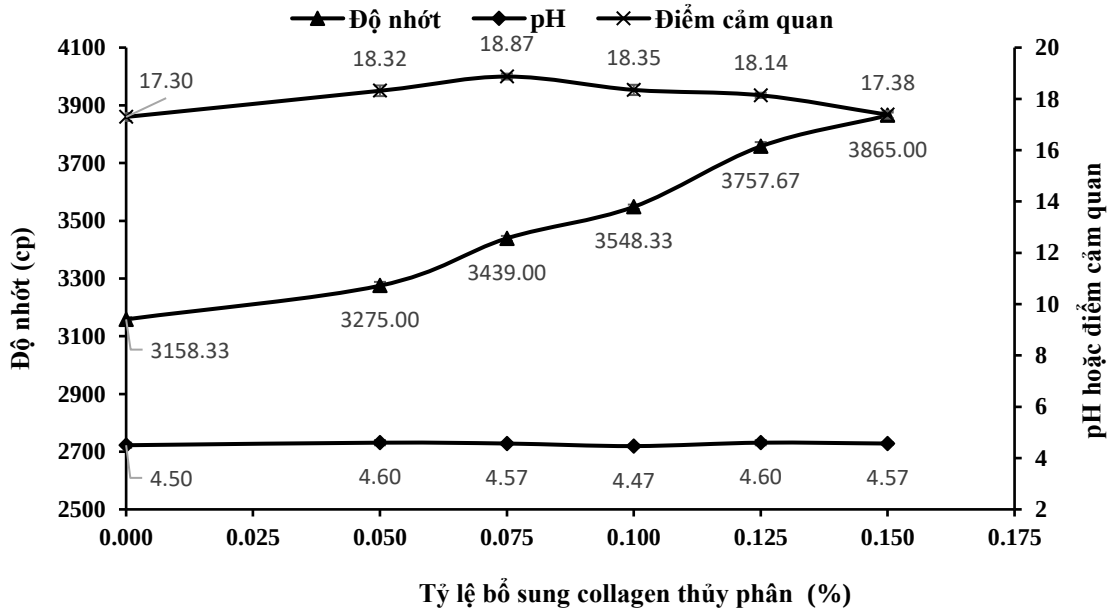
Hình 3.52 cũng cho thấy chất lượng cảm quan của các mẫu sản phẩm sữa chua tăng khi thời gian lên men tăng từ 240 phút lên 300 phút với điểm cảm quan chung tăng từ 15,40 lên 18,35 nhưng nếu tiếp tục tăng thời gian lên men thì điểm cảm quan của sản phẩm giảm. Điều này có thể được giải thích khi thời gian lên men quá dài là cho lượng axit lactic sinh ra nhiều độ chua của sữa chua cao làm giảm giá trị cảm quan.

Vậy thời gian lên men sữa chua trong phạm vi nghiên cứu này được chọn tốt nhất là 300 phút với điểm cảm quan của sản phẩm là 18,35, độ nhớt 3538,33 cp và pH 4,48.

b. Xác định tỷ lệ collagen thủy phân bổ sung

Các mẫu sữa được bổ sung tỷ lệ collagen thủy phân lần lượt là 0,000%; 0,050%; 0,075%; 0,100%; 0,125% và 0,150%, với thời gian lên men 300 phút, ở nhiệt

độ 45°C. Với các chỉ tiêu theo dõi là độ nhớt, pH và điểm cảm quan của sản phẩm. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.53. Khi tăng tỷ lệ bổ sung collagen thủy phân 0,000% lên 0,150% độ nhớt của sản phẩm sữa chua tăng từ 3153,33 cp lên 3865,00 cp, pH của sản phẩm không có sự khác biệt ($p < 0,05$). Độ nhớt tăng chủ yếu là do lượng collagen thủy phân bổ sung. Điểm cảm quan của sản phẩm đạt cao nhất là 18,87 khi tỷ lệ collagen thủy phân bổ sung là 0,075%.



Hình 3.53. Ảnh hưởng tỷ lệ bổ sung collagen thủy phân đến độ nhớt, pH và điểm cảm quan của sản phẩm sữa chua

Vậy tỷ lệ collagen thủy phân (SP2) thích hợp để bổ sung vào sữa chua là 0,075%, thời gian lên men 300 phút và nhiệt độ lên men 45°C thì cho điểm cảm quan chung của sản phẩm là cao nhất.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được điều kiện tối ưu để loại bỏ phi collagen trên da cá ngừ vây vàng bằng phương pháp xử lý kiềm với nồng độ NaOH là 0,93 N, thời gian xử lý là 28 giờ và tỷ lệ dung dịch NaOH trên da cá là 5 : 1 (v/w). Khi đó da cá ngừ vây vàng sau khi xử lý có tỷ lệ hydroxyproline so với protein và lipid còn lại so với chất khô lần lượt là 9,94% và 5,5%. Đây là một trong những bước xử lý quan trọng nhất để sản xuất collagen chất lượng cao và các dẫn xuất của nó từ da cá ngừ vây vàng.

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 phi collagen bằng enzyme alcalase với các thông số như: nồng độ enzyme là 0,034AU/g, nhiệt độ thủy phân 54,7 °C, pH 7,9 và thời gian thủy phân 5,2 giờ với độ thủy phân 24,54% và hiệu suất thu hồi nitrogen là 96,42%. Dịch thủy phân thu được có khối lượng phân tử các peptide ≤ 5 kDa.

Sử dụng phương pháp sắc ký lọc gel để tách các phân đoạn peptide trong dịch collagen thủy phân, nghiên cứu đã tách được 3 phân đoạn collagen thủy phân F1, F2 và F3 từ dịch thủy phân của collagen da cá ngừ vây vàng. Ba phân đoạn này đều có những tính năng công nghệ rất tốt như khả năng hòa tan, khả năng tạo nhũ tương, khả năng tạo bọt, khả năng chống oxy hóa và khả năng chống đông

Nghiên cứu đã sử phương pháp lọc màng để tinh sạch và tách các phân đoạn peptide collagen trong dịch thủy phân bằng màng lọc UFP-1-C-6 của GE (Mỹ) với chất liệu là polysulfone với khối lượng mặt cắt qua màng 1kDa. Nghiên cứu cũng đã xác định được kiều kiện nhiệt độ, áp suất, pH và lưu lượng dòng nhập liệu đến quá trình lọc màng. Kết quả đã tách được hai sản phẩm SP1 và SP2 với tỷ lệ lần lượt là 90% và 10%. Cả hai phân đoạn collagen thủy phân đều có tính tan rất tốt; ở pH dưới 8,0 thì phân đoạn SP1 tan tốt hơn SP2 nhưng đều lớn hơn 96%; còn pH $\geq$ 8,0 thì cả hai phân đoạn đều tan gần như hoàn toàn. Khả năng tạo nhũ, tạo bọt và chống đông của phân đoạn SP2 tốt hơn phân đoạn SP1, trong khi hoạt tính chống oxy hóa của phân đoạn SP1 cao hơn SP2.

Collagen thủy phân đã được phân tích thành phần hóa học và chỉ tiêu vi sinh; kết quả cho thấy chúng có khả năng áp dụng vào trong sản phẩm thực phẩm. Từ đó, nghiên cứu đã thử nghiệm thành công việc bổ sung collagen thủy phân vào hai sản phẩm là nước chanh dây và sữa chua với kết quả điểm cảm quan khá cao, chứng tỏ nguồn collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng rất có triển vọng để bổ sung vào thực phẩm.

Đề xuất

Sử dụng các loại màng khác nhau để tinh sạch và phân đoạn collagen thủy phân nhằm thu được những phân đoạn collagen thủy phân có tính chất mong muốn.

Tiến hành sấy phun và sấy thăng hoa sản phẩm collagen để thuận tiện trong việc bảo quản sản phẩm, đồng thời nghiên cứu tính chất của collagen trong quá trình bảo quản cũng như hạn sử dụng của nó.

Nghiên cứu sản xuất collagen thủy phân ở quy mô công nghiệp, từ đó mở rộng việc ứng dụng collagen thủy phân trong các sản phẩm thực phẩm khác nhau.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

[1] Nguyễn Công Bỉnh và Nguyễn Minh Xuân Hồng (2018) " Tách chiết, tinh sạch và ứng dụng collagen thủy phân từ da cá", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh*, Số *17* (5) trang 114-122.

[2] Binh, N. C., Hong, N. M. X., Kha, N. H. N., & Tuyen, K. C. (2020). Optimization of Treatment Conditions for Non-collagen Removal from Yellowfin Tuna Skin (*Thunnus albacares*). *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences, 19* (3), 548–562.

[3] Binh, N. C., Kha, N. H. N., Tuyen, K. C., & Hong, N. M. X. (2021). Optimization of enzymatic hydrolysis of collagen from yellowfin tuna skin (*Thunnus albacares*). *Journal of Food Processing and Preservation 45* (4)

[4] Binh, N. C., Hong, N. M. X., Kha, N. H. N., & Tuyen, K. C. (2021). Functional properties of yellowfin tuna (Thunnus albacares) skin collagen hydrolysate fraction obtained by ultrafiltration purification. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal 9* (3)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abedin, M. Z., Karim, A. A., Latiff, A. A., Gan, C. Y., Ghazali, F. C., Barzideh, Z., Sarker, M. Z. I. (2014). Biochemical and radical-scavenging properties of sea cucumber (*Stichopus vastus*) collagen hydrolysates. *Natural Product Research*, *28*(16), 1302–1305.

2. Adibzadeh, N., Aminzadeh, S., Jamili, S., Karkhane, A. A., & Farrokhi, N. (2014). Purification and characterization of pepsin-solubilized collagen from skin of sea cucumber Holothuria parva. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *173*(1), 143–154.

3. Alolod, G. A. L., Nuñal, S. N., Nillos, M. G. G., & Peralta, J. P. (2019). Bioactivity and Functionality of Gelatin Hydrolysates from the Skin of Oneknife Unicornfish *(Naso thynnoides*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, *28*(10), 1013–1026.

4. Amin, N. A. S., & Anggoro, D. D. (2004). Optimization of direct conversion of methane to liquid fuels over Cu loaded W/ZSM-5 catalyst. *Fuel*, *83*(4–5), 487–494.

5. Avila Rodríguez, M. I., Rodríguez Barroso, L. G., & Sánchez, M. L. (2018). Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *17*(1), 20–26.

6. Bang, J. K., Jun Hyuck, L., Ravichandran N., M., Sung Gu, L., Hackwon, D., Hye Yeon, K., Hak Jun, K. (2013). Antifreeze peptides and glycopeptides, and their derivatives: Potential uses in biotechnology. *Marine Drugs*, 11(6),2013–2041.

7. Baziwane, D., & He, Q. (2003). Gelatin: The Paramount Food Additive. *Food Reviews International*, *19*(4), 423–435.

8. Bello, A. E., & Oesser, S. (2006). Collagen hydrolysate for the treatment of osteoarthritis and other joint disorders: a review of the literature. *Current Medical Research and Opinion*, *22*(11), 2221–2232.

9. Benjakul, S., Seymour, T. A., Morrissey, M. T., & An, H. (1997). Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. *Journal of Food Science*, *62*(4), 729–733.

10. Benjakul, S., & Sutthipan, N. (2009). Muscle changes in hard and soft shell crabs during frozen storage. LWT - *Food Science and Technology*, 42(3), 723–729.

11. Benjakul, S., Thiansilakul, Y., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Kishimura, H., & 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.

12. Betts, M. J., & Russell, R. B. (2007). Amino-Acid Properties and Consequences

of Substitutions. In Bioinformatics for Geneticists: A Bioinformatics Primer for the Analysis of Genetic Data: Second Edition (pp. 311–342).

13. Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., & Lalitha, R. G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99(2), 335–343.

14. Bilek, S. E., & Bayram, S. K. (2015). Fruit juice drink production containing hydrolyzed collagen. *Journal of Functional Foods*, *14*, 562–569.

15. Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A Rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemical Physiology*, *37*(8), 911–917.

16. Bộ, Đoàn. Mimh, N. H. (2013). Ước tính trữ lượng và dự báo sản lượng khai thác nguồn lợi cá ngừ đại dương năm 2013-2014 ở vùng biển xa bờ miền Trung. *Tạp Chí Khoa Học ĐHQGHN, Các Khoa Học và Trái Đất và Môi Trường*, *29*(2), 70–72.

17. Boonmaleerat K, Wanachewin O, Phitak T, Pothacharoen P, K. P. (2018). Fish Collagen Hydrolysates Modulate Cartilage Metabolism. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *76*(1), 279–292.

18. Boran, G., & Regenstein, J. M. (2009). Optimization of gelatin extraction from silver carp skin. *Journal of Food Science*, *74*(8), 432–441.

19. Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*, *118*(3), 559–565.

20. Buehler, M. J. (2006). Nature designs tough collagen: Explaining the nanostructure of collagen fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(33), 12285–12290.

21. Burns, D. B., & Zydney, A. L. (1999). Effect of solution pH on protein transport through ultrafiltration membranes. *Biotechnology and Bioengineering*, *64*(1), 27–37.

22. Chalamaiah, M., Rao, G. N., Rao, D. G., & Jyothirmayi, T. (2010). Protein hydrolysates from meriga (Cirrhinus mrigala) egg and evaluation of their functional properties. *Food Chemistry*, *120*(3), 652–657.

23. Chen, S., Chen, H., Xie, Q., Hong, B., Chen, J., Hua, F., Wu, H. (2016). Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*). *Food Hydrocolloids*, *52*, 468–477.

24. Chen, X. L., Peng, M., Li, J., Tang, B. L., Shao, X., Zhao, F., Song, X. Y. (2017). Preparation and functional evaluation of collagen oligopeptide-rich hydrolysate from fish skin with the serine collagenolytic protease from Pseudoalteromonas sp. SM9913. *Scientific Reports*.

25. Cheng, Y., Xiong, Y. L., & Chen, J. (2010). Antioxidant and emulsifying properties of potato protein hydrolysate in soybean oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, *120*(1), 101–108.

26. Chi, C. F., Cao, Z. H., Wang, B., Hu, F. Y., Li, Z. R., & Zhang, B. (2014). Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules*, *19*(8), 11211–11230.

27. Chi, C., Hu, F., Li, Z., Wang, B., & Luo, H. (2016). Influence of Different Hydrolysis Processes by Trypsin on the Physicochemical, Antioxidant, and Functional Properties of Collagen Hydrolysates from Sphyrna lewini, Dasyatis akjei, and Raja porosa. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, *25*(5), 616–632.

28. Cho, J. K., Jin, Y. G., Rha, S. J., Kim, S. J., & Hwang, J. H. (2014). Biochemical characteristics of four marine fish skins in Korea. *Food Chemistry*, *159*, 200–207.

29. Cho, S. M., Gu, Y. S., & Kim, S. B. (2005). Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, *19*(2), 221–229.

30. Damodaran, S. (1997). Damodaran. In *Protein-stabilized foams and emulsions* (pp. 57–110). New York: Marcel Dekker.

31. Damodaran, S. (2007). Inhibition of ice crystal growth in ice cream mix by gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(26), 10918–10923.

32. Daneault. A. (2014). Hydrolyzed collagen contributes to osteoblast differentiation in vitro and subsequent bone health in vivo. *Osteoarthritis and Cartilage*, *22*, S131. DOI: 10.1016/j.joca.2014.02.240

33. Di Lullo, G. A., Sweeney, S. M., Körkkö, J., Ala-Kokko, L., & San Antonio, J. D. (2002). Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(6), 4223–4231.

34. Diniz, F. M., & Martin, A. M. (1997). Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *LWT - Food Science and Technology*, *30*(3), 266–272.

35. Djagny, K. B., Wang, Z., & Xu, S. (2001). Gelatin: A valuable protein for food and pharmaceutical industries: Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *41*(6), 481–492.

36. Dos Santos, S. D. A., Martins, V. G., Salas-Mellado, M., & Prentice, C. (2011). Evaluation of Functional Properties in Protein Hydrolysates from Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) Obtained with Different Microbial Enzymes.

Food and Bioprocess Technology, *4*(8), 1399–1460.

37. 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.

38. Dương, T. T. (2001). Một số loài cá thường gặp ở biển Việt Nam. Trung tâm thông tin KHKT & Kinh tế thủy sản.

39. Elam, M. L., Johnson, S. A., Hooshmand, S., Feresin, R. G., Payton, M. E., Gu, J., & Arjmandi, B. H. (2015). A Calcium-Collagen Chelate Dietary Supplement Attenuates Bone Loss in Postmenopausal Women with Osteopenia: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Medicinal Food*, *18*(3), 324–331.

40. Elavarasan, K., Naveen Kumar, V., & Shamasundar, B. A. (2014). Antioxidant and functional properties of (FPH) from fresh water carp (*Catla catla*) as influenced by the nature of enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*, *38*(3), 1207–1214.

41. Fallis, A. . (2013). Cross Flow Filtration Method Handbook. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *53*(9), 1689–1699.

42. Fane, A. G., Fell, C. J. D., & Suki, A. (1983). The effect of ph and ionic environment on the ultrafiltration of protein solutions with retentive membranes. *Journal of Membrane Science*, *16*(C), 195–210.

43. Field, R., & Lipnizki, F. (2017). Membrane separation processes an overview. In and G. V. Robert Field, Erika Bekassy-Molnar, Frank Lipnizki (Ed.), *Engineering Aspects of Membrane Separation and Application in Food Processing* (pp. 3–40). Florida: CRC Press.

44. Fiske, C. H., & Subbarow, Y. (1932). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, *26*(2), 292–297.

45. Foh, M. B. K., Kamara, M. T., Amadou, I., Foh, B. M., & Wenshui, X. (2011). Chemical and physicochemical properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein hydrolysate and concentrate. *International Journal of Biological Chemistry*, *5*(1), 1–15.

46. Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2004). Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of Food Science*, *69*(8), 615–622.

47. Gifuni I, Lavenant L, Pruvost J, Masse A. (2020). Recovery of microalgal protein by three-steps membrane filtration: Advancements and feasibility. *Algal Reseach*, 51:102082. doi:10.1016/j.algal.2020.102082

48. Goodwin, J. F. (1968). The colorimetric estimation of plasma amino nitrogen with DNFB. *Clinical Chemistry*, *14*(11), 1080–1090.

49. Green, A. A., & Hughes, W. L. (1955). Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods in Enzymology*, *1*(C), 67–90.

50. Guillerminet, F., Fabien-Soulé, V., Even, P. C., Tomé, D., Benhamou, C. L., Roux, C., & Blais, A. (2012). Hydrolyzed collagen improves bone status and prevents bone loss in ovariectomized C3H/HeN mice. *Osteoporosis International*, *23*(7), 1909–1919.

51. Guillerminet, Fanny, Beaupied, H., Fabien-Soulé, V., Tomé, D., Benhamou, C. L., Roux, C., & Blais, A. (2010). Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: An in vitro and in vivo study. *Bone*, *46*(3), 827–834.

52. Guo, H., Hong, Z., & Yi, R. (2015). Core-Shell Collagen Peptide Chelated Calcium/Calcium Alginate Nanoparticles from Fish Scales for Calcium Supplementation. *Journal of Food Science*, *80*(7), 1595–1601.

53. Hajfathalian, M., Ghelichi, S., García-Moreno, P. J., Moltke Sørensen, A. D., & Jacobsen, C. (2018). Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58*(18), 3097–3129.

54. Hema, G. S., Joshy, C. G., Shyni, K., Chatterjee, N. S., Ninan, G., & Mathew, S. (2017). 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), 488–496.

55. Hui-Yin, F. (2002). Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of Food Lipid*, *9*(1), 35–43.

56. Hulmes, D. J. S. (2008). Collagen diversity, synthesis and assembly. In *Collagen: Structure and Mechanics* (pp. 15–47). Spinger US.

57. Ichikawa, S., Morifuji, M., Ohara, H., Matsumoto, H., Takeuchi, Y., & Sato, K. (2010). Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *61*(1), 52–60.

58. Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., & Mann, S. (2003). Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of Pagrus major and Oreochromis niloticas. *International Journal of Biological Macromolecules*, *32*(3–5), 199–204.

59. Imjongjirak, C., Amphaiphan, P., Charoensapsri, W., & Amparyup, P. (2017). Characterization and antimicrobial evaluation of Sp PR-AMP1, a proline-rich antimicrobial peptide from the mud crab Scylla paramamosain.

Developmental & Comparative Immunology, *74*, 209–216.

60. Inoue, N., Sugihara, F., & Wang, X. (2016). Ingestion of bioactive collagen hydrolysates enhance facial skin moisture and elasticity and reduce facial ageing signs in a randomised double-blind placebo-controlled clinical study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(12), 4077–4081.

61. Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Ben Slama-Ben Salem, R., Mehiri, M., … Nasri, M. (2014). Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by Bacillus subtilis A26. *Process Biochemistry*, *49*(6), 963–972.

62. Jenkins, C. L., & Raines, R. T. (2002). Insights on the conformational stability of collagen. *Natural Product Reports*, *19*(1), 49–59.

63. Jeong, K. B., Jun Hyuck, L., Ravichandran N, M., Sung Gu, L., Hackwon, D., Hye Yeon, K., Hak Jun, K. (2013). Antifreeze peptides and glycopeptides, and their derivatives: Potential uses in biotechnology. *Marine Drugs*, *11*(6), 2013–2041.

64. Jia, J., Zhou, Y., Lu, J., Chen, A., Li, Y., & Zheng, G. (2010). Enzymatic hydrolysis of alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(4), 635–640.

65. Joseph, J. (2003). *Managing fishing capacity of the world tuna fleet*. *FAO Fisheries Circular No 982*.

66. Kim, E. K., Lee, S. J., Jeon, B. T., Moon, S. H., Kim, B. K., Park, T. K., Park, P. J. (2009). Purification and characterisation of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of venison protein. *Food Chemistry*, *114*(4), 1365–1370.

67. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, *102*(4), 1317–1327.

68. Kodjo Boady Djagny, Z. W. & S. X. (2003). Gelatin: A Valuable Protein for Food and Pharmaceutical Industries: Review. *Food Reviews International*, *41*(6), 481–492.

69. Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(3), 657–666.

70. Langmaier, F., Mokrejs, P., Kolomaznik, K., & Mladek, M. (2008). Biodegradable packing materials from hydrolysates of collagen waste proteins. *Waste Management*, *28*(3), 549–556.

71. Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Aydi, M., Toldrá, F., Aristoy, M. C., … Nasri, M. (2015). Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. *Journal of Proteomics*, *128*, 458–468.

72. Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Jridi, M., Toldrá, F., Aristoy, M. C., Nasri, M. (2015). Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatin hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, *13*, 225–238.

73. Li, Z., Wang, B., Chi, C., Gong, Y., Luo, H., & Ding, G. (2013). Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from Sphyrna lewini, Dasyatis akjei and Raja porosa. *Food Research International*, *51*(1), 283–293.

74. Liu, D., Wei, G., Li, T., Hu, J., Lu, N., Regenstein, J. M., & Zhou, P. (2015). Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, *172*, 836–843.

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

76. Luyến, T. T. (2016). *Sản xuất các chế phẩm kỹ thuật và y dược từ phế liệu thủy sản*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp. Thành phố Hồ Chí Minh.

77. Mari, W. K., Muneshige, S., Shin, K., Yasuki, T., Hideyuki, S., Fumiki, M., … Michio, K. (2010). Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(2), 835–841.

78. Matilla, B., Mauriz, J., Culebras, J., González-Gallego, J., & González, P. (2002). La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. *Nutrición Hospitalaria*, *1*(17), 2–9.

79. McAlindon, T. E., Nuite, M., Krishnan, N., Ruthazer, R., Price, L. L., Burstein, D., Flechsenhar, K. (2011). Change in knee osteoarthritis cartilage detected by delayed gadolinium enhanced magnetic resonance imaging following treatment with collagen hydrolysate: A pilot randomized controlled trial. *Osteoarthritis and Cartilage*, *9*(4), 399–405.

80. Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S. K. (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(3), 581–587.

81. Mutilangi, W. A. M., Panyam, D., & Kilara, A. (1996). Functional properties of

hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. *Journal of Food Science*, *61*(2), 270–303.

82. Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., & Shahidi, F. (2011). Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*, *124*(4), 1354–1362.

83. Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Kishimura, H. (2008). Improvement of gelatin extraction from bigeye snapper skin using pepsin-aided process in combination with protease inhibitor. *Food Hydrocolloids*, *22*(4), 615–622.

84. Ng, K. L., & Mohd Khan, A. (2012). Enzymatic preparation of palm kernel expeller protein hydrolysate (PKEPH). *International Food Research Journal*, *19*(2), 721–725.

85. Nguyen, H. T. M., Sylla, K. S. B., Randriamahatody, Z., Donnay-Moreno, C., Moreau, J., Tran, L. T., & Bergé, J. P. (2011). Enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by-products using protamex protease. *Food Technology and Biotechnology*, *49*(1), 48–55.

86. Nikoo, M., Benjakul, S., & Xu, X. (2015). Antioxidant and cryoprotective effects of Amur sturgeon skin gelatin hydrolysate in unwashed fish mince. *Food Chemistry*, *181*, 295–303.

87. Nurilmala, M., Hizbullah, H. H., Karnia, E., Kusumaningtyas, E., & Ochiai, Y. (2020). Characterization and Antioxidant Activity of Collagen, Gelatin, and the Derived Peptides from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Skin. *Marine Drugs*, *18*(2), 98–110.

88. Ocak B. (2018). Film-forming ability of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes with chitosan. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(5), 4643–4655.

89. Pabby, A. K., Rizvi, S. S. H., & Sastre, A. M. (2015). *Handbook of membrane separations: Chemical, pharmaceutical, food, and biotechnological applications, second edition*. *Handbook of Membrane Separations: Chemical, Pharmaceutical, Food, and Biotechnological Applications, Second Edition*. CRC Press. https://doi.org/10.1201/b18319

90. Pal, G. K., Nidheesh, T., & Suresh, P. V. (2015). Comparative study on characteristics and in vitro fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*). *Food Research International*, *76*(3), 804–812.

91. Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *26*(3), 716–723.

92. Phanat, K., Soottawat, B., Wonnop, V., & Fereidoon, S. (2012). Cryoprotective effect of gelatin hydrolysate from blacktip shark skin on surimi subjected to different freeze-thaw cycles. *LWT - Food Science and Technology*, *47*(2), 437–442.

93. Qian, Z. J., Jung, W. K., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2008). Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, Crassostrea gigas against free radical induced DNA damage. *Bioresource Technology*, *99*(9), 3365–3371.

94. Qiu, Y. T., Wang, Y. M., Yang, X. R., Zhao, Y. Q., Chi, C. F., & Wang, B. (2019). Gelatin and antioxidant peptides from gelatin hydrolysate of skipjack tuna (*katsuwonus pelamis*) scales: Preparation, identification and activity evaluation. *Marine Drugs*, *17*(10), 565–579.

95. Quỳnh, N. Đ., & Đào, N. L. A. (2015). Study on extraction of gelatin from skin of catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) according to new method. *Can Tho University Journal of Science*, *40*(1), 47–52.

96. Raghavan, S., & Kristinsson, H. G. (2009). ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, *117*(4), 582–588.

97. Rawlings, N. D., & Barrett, A. (2013). *Handbook of Proteolytic Enzymes*. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic press.

98. Razali, A. N., Amin, A. M., & Sarbon, N. M. (2015). Antioxidant activity and functional properties of fractionated cobia skin gelatin hydrolysate at different molecular weight. *International Food Research Journal*, *22*(2), 651–660.

99. REBECA, B. D., PEÑA-VERA, M. T., & DÍAZ-CASTAÑEDA, M. (1991). Production of Fish Protein Hydrolysates with Bacterial Proteases; Yield and Nutritional Value. *Journal of Food Science*, *56*(2), 309–314.

100. Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Xue, S. J. (2008). Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, *108*(2), 727–736.

101. Richards, M. P., & Hultin, H. O. (2002). Contributions of blood and blood components to lipid oxidation in fish muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(3), 555–564.

102. Rupley, J. A., Gratton, E., & Careri, G. (1983). Water and globular proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, *8*(1), 18–22.

103. Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, *31*(10), 1949-1956.

104. Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. O., Kubota, E. H., Mazutti, M. A., Kempka, A. P., & Demiate, I. M. (2016). Collagen extraction process. *International Food Research Journal*, *23*(3), 913–922.

105. Scocchi, M., Tossi, A., & Gennaro, R. (2017). Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non–lytic mechanism of action. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *409*(23), 5581–5592.

106. Shahidi, F., Han, X. Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, *53*(3), 285–293.

107. Shigemura, Y., Kubomura, D., Sato, Y., & Sato, K. (2014). Dose-dependent changes in the levels of free and peptide forms of hydroxyproline in human plasma after collagen hydrolysate ingestion. *Food Chemistry*, *159*, 328–332.

108. Shishegaran, A., Boushehri, A. N., & Ismail, A. F. (2020). Gene expression programming for process parameter optimization during ultrafiltration of surfactant wastewater using hydrophilic polyethersulfone membrane. *Journal of Environmental Management*, *264* https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110444

109. Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry*, *78*(1), 929–958.

110. Silvipriya, K. S., Krishna Kumar, K., Bhat, A. R., Dinesh Kumar, B., John, A., & Lakshmanan, P. (2015). Collagen: Animal sources and biomedical application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *5*(3).

111. Sionkowska, A., Skrzyński, S., Śmiechowski, K., & Kołodziejczak, A. (2017). The review of versatile application of collagen. *Polymers for Advanced Technologies*, *28*(1), 4–9.

112. Stocchi, V., Palma, F., Piccoli, G., Biagiarelli, B., Magnani, M., Masat, L., & Cucchiarini, L. (1992). Analysis of amino acids as DABS-derivatives with a sensitivity to the femtomole level using RP-HPLC narrow-bore columns. *Amino Acids*, *3*(3), 303–309.

113. Sun, L., Hou, H., Li, B., & Zhang, Y. (2017). Title: Characterization of acid-and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Characterization of acid-and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus)*. *International Journal of Biological Macromolecules) International Journal of Biological Macromolecules*, *99*, 8–14.

114. Taheri, A., Anvar, S. A. A., Ahari, H., & Fogliano, V. (2013). Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *12*(1), 154–169.

115. Tamilmozhi, S., Veeruraj, A., & Arumugam, M. (2013). Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Research International*, *54*(2), 1499–

1505.

116. Tang, M., Li, T., Gandhi, N. S., Burrage, K., & Gu, Y. T. (2017). Heterogeneous nanomechanical properties of type I collagen in longitudinal direction. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, *16*(3), 1023–1033.

117. Tanuja, S., Viji, P., Zynudheen, A., & Joshy, C. (2012). Composition, functional properties and antioxidative activity of hydrolysates prepared from the frame meat of Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Egyptian Journal of Biology*, *14*(1), 27–35.

118. Thuanthong, M., Sirinupong, N., & Youravong, W. (2016). Triple helical structure of acid-soluble collagen derived from Nile tilapia skin as affected by extraction temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(11), 3795–3800.

119. Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W., & Inouye, K. (2005). Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT - Food Science and Technology*, *38*(3), 255–261.

120. Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein Hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(5), 3148–3161.

121. Vignesh, R., Haq, M. A. B., Devanathan, K., & Srinivasan, M. (2011). Pharmacological potential of fish extracts. *Archives of Applied Science Research*, *3*(5), 52–58.

122. Viji, P., Phannendra, T. S., Jesmi, D., Madhusudana Rao, B., Dhiju Das, P. H., & George, N. (2019). Functional and Antioxidant Properties of Gelatin Hydrolysates Prepared from Skin and Scale of Sole Fish. In *Journal of Aquatic Food Product Technology* (Vol. 28, pp. 976–986).

123. Wang, B., Li, Z. R., Chi, C. F., Zhang, Q. H., & Luo, H. Y. (2012). Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of Sphyrna lewini muscle. *Peptides*, *36*(2), 240–250.

124. Wang, B., Wang, Y. M., Chi, C. F., Luo, H. Y., Deng, S. G., & Ma, J. Y. (2013). Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scales of croceine croaker (Pseudosciaena crocea). *Marine Drugs*, *11*(11).

125. Wang, J., Pei, X., Liu, H., & Zhou, D. (2018). Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, *106*, 544–550.

126. Wingfield, P. T. (2016). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, *2016*, A.3F.1-A.3F.9.

127. Woessner, J. F. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of*

Biochemistry and Biophysics, *93*(2), 440–447.

128. Woo, J. W., Yu, S. J., Cho, S. M., Lee, Y. B., & Kim, S. B. (2008). Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. *Food Hydrocolloids*, *22*(5), 879–887.

129. Wu, R. B., Wu, C. L., Liu, D., Yang, X. H., Huang, J. F., Zhang, J., … He, H. L. (2018). Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease. *Food Chemistry*, *248*, 346–352.

130. Xu, S., Shen, Y., & Li, Y. (2019). Antioxidant activities of sorghum kafirin alcalase hydrolysates and membrane/gel filtrated fractions. *Antioxidants*, *8*(5), 131.

131. Zague, V. (2008). A new view concerning the effects of collagen hydrolysate intake on skin properties. *Archives of Dermatological Research*, *300*(9), 479–483.

132. Zague, V. (2018). Collagen Peptides Modulates the Metabolism of Extracellular Matrix by Human Dermal Fibroblasts Derived from Sun-Protected and Sun-Exposed Body Sites. *Cell Biology International*, *42*, 95–104

133. Zamorano-Apodaca, J. C., García-Sifuentes, C. O., Carvajal-Millán, E., Vallejo-Galland, B., Scheuren-Acevedo, S. M., & Lugo-Sánchez, M. E. (2020). Biological and functional properties of peptide fractions obtained from collagen hydrolysate derived from mixed by-products of different fish species. *Food Chemistry*, *331*, 127–350.

134. Zhao, Q., Selomulya, C., Wang, S., Xiong, H., Chen, X. D., Li, W., … Zhou, Q. (2012). Enhancing the oxidative stability of food emulsions with rice dreg protein hydrolysate. *Food Research International*, *48*(2), 876–884.

135. Zylberberg, L., & Laurin, M. (2011). Analysis of fossil bone organic matrix by transmission electron microscopy. *Comptes Rendus - Palevol*, *10*(5–6), 357–366.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1

Bảng 1.1. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen trong da cá ngừ vây vàng

STT	Nồng độ NaOH (N)	%Lipid còn lại so với chất khô	Hyp/protein (%)	% Protein còn lại so với Protein trong mẫu ban đầu
1	0,1	$10,13^{a}\pm0,15$	$8,65^{a}\pm0,05$	$86,11^{a}\pm0,21$
2	0,2	$9,85^{b}\pm0.10$	$8,72^{a}\pm0,05$	$84,80^{b}\pm0,15$
3	0,4	$8,45^{c}\pm0,11$	$8,90^{b}\pm0,07$	$83,87^{c}\pm0,22$
4	0,6	$7,81^{d}\pm0,14$	$9,11^{c}\pm0,04$	$82,29^{d}\pm0,18$
5	0,8	$6,34^{e}\pm0,09$	$9,20^{d}\pm0,03$	$81,20^{e}\pm0,11$
6	1,0	$6,12^{f}\pm0,10$	$9,45^{e}\pm0,04$	$79,33^{f}\pm0,13$
7	1,2	$6,08^{f}\pm0,08$	$8,80^{b}\pm0,05$	$74,14^{g}\pm0,15$
8	1,4	$6,01^{f}\pm0,07$	$8,50^{f}\pm0,05$	$70,41^{h}\pm0,14$

a, b, c, d, e, f, g, h: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 1.2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen trong da cá ngừ vây vàng

STT	Thời gian xử lý NaOH (giờ)	%Lipid còn lại so với chất khô	Hyp/protein (%)	% Protein còn lại so với Protein trong mẫu ban đầu
1	19	$6,75^{a}\pm0,07$	$9,05^{a}\pm0,05$	$85,42^{a}\pm0,20$
2	21	$6,44^{b}\pm0,05$	$9,40^{b}\pm0,04$	$83,33^{b}\pm0,17$
3	23	$6,24^{c}\pm0,05$	$9,47^{cb}\pm0,06$	$82,36^{c}\pm0,22$
4	25	$6,05^{d}\pm0,05$	$9,60^{c}\pm0,05$	$80,92^{d}\pm0,10$
5	27	$6,03^{d}\pm0,04$	$9,58^{c}\pm0,03$	$80,80^{d}\pm0,20$
6	29	$6,01^{d}\pm0,05$	$9,55^{c}\pm0,05$	$80,35^{e}\pm0,17$
7	31	$6,01^{d}\pm0,06$	$9,30^{cb}\pm0,05$	$78,20^{f}\pm0,19$
8	33	$5,97^{d}\pm0,04$	$9,00^{d}\pm0,04$	$77,40^{g}\pm0,10$

a, b, c, d, e, f, g: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 1.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá đến quá trình loại bỏ phi collagen

STT	Tỷ lệ dung dịch NaOH/nguyên liệu(v/w)	%Lipid còn lại so với chất khô	Hyp/protein (%)	% Protein còn lại so với Protein trong mẫu ban đầu
1	2/1	$6,57^{a}\pm0,07$	$9,11^{a}\pm0,02$	$84,74^{a}\pm0,25$
2	3/1	$6,28^{b}\pm0,05$	$9,32^{b}\pm0,01$	$83,75^{b}\pm0,19$
3	4/1	$5,76^{c}\pm0,02$	$9,6^{c}\pm0,02$	$83,59^{c}\pm0,24$
4	5/1	$5,68^{d}\pm0,04$	$9,73^{d}\pm0,02$	$82,80^{d}\pm0,12$
5	6/1	$5,76^{c}\pm0,05$	$9,71^{d}\pm0,03$	$82,73^{d}\pm0,12$
6	7/1	$5,80^{c}\pm0,03$	$9,69^{cd}\pm0,03$	$82,68^{d}\pm0,1$
7	8/1	$5,81^{c}\pm0,05$	$9,68^{cd}\pm0,01$	$81,60^{e}\pm0,13$
8	9/1	$5,81^{c}\pm0,02$	$9,40^{f}\pm0,02$	$80,46^{f}\pm0,12$
9	10/1	$5,85^{ec}\pm0,05$	$9,30^{g}\pm0,01$	$79,05^{g}\pm0,18$

a, b, c, d, e, f, g: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Phụ lục 2

Bảng 2.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme pepsin đến DH và NR

Nồng độ enzyme (UI/g)	20	25	30	35	40
DH (%)	$14,27^{a}\pm0,15$	$15,15^{b}\pm0,20$	$15,53^{c}\pm0,25$	$15,53^{c}\pm0,16$	$15,53^{c}\pm0,19$
NR (%)	$62,44^{a}\pm1,51$	$66,57^{b}\pm1,93$	$69,88^{c}\pm1,55$	$69,89^{c}\pm1,35$	$69,91^{c}\pm1,55$

a, b, c, d: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến DH và NR của enzyme pepsin

Nhiệt độ (°C)	30	35	40	45	50
DH (%)	$12,05^{a}\pm0,20$	$14,81^{b}\pm0,25$	$15,53^{c}\pm0,28$	$14,06^{b}\pm0,22$	$10,45^{d}\pm0,30$
NR (%)	$48,80^{a}\pm2,32$	$64,05^{b}\pm2,46$	$69,87^{c}\pm2,00$	$63,54^{b}\pm2,39$	$46,21^{a}\pm2,15$

a, b, c, d: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 2.3. Ảnh hưởng của pH đến DH và NR của enzyme pepsin

pH	1,5	2,0	2,5	3,0
DH (%)	$13,21^{a}$±0,33	$15,52^{b}$±0,40	$15,04^{b}$±0,25	$11,43^{c}$±0,41
NR (%)	$56,15^{a}$±2,40	$69,88^{b}$±2,17	$66,26^{c}$±1,91	$46,28^{d}$±1,84

a, b, c, d: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 2.4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến DH và NR của enzyme pepsin

Thời gian (giờ)	1	2	3	4	5
DH (%)	$9,73^{a}$±0,35	$12,56^{b}$±0,15	$14,54^{c}$±0,20	$15,87^{d}$±0,20	$15,93^{d}$±0,22
NR (%)	$27,55^{a}$±1,33	$48,12^{b}$±1,35	$62,61^{c}$±1,90	$71,31^{d}$±1,89	$71,41^{d}$±1,79

a, b, c, d: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 2.5. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme flavourzyme đến DH và NR

Nồng độ enzyme (LAPU/g)	10	20	30	40	50
DH (%)	$14,52^{a}$±0,15	$16,37^{b}$±0,17	$17,49^{c}$±0,15	$17,50^{c}$±0,13	$17,51^{c}$±0,15
NR (%)	$64,11^{a}$±1,72	$74,55^{b}$±1,37	$79,89^{c}$±1,31	$80,15^{c}$±1,68	$80,20^{c}$±1,28

a, b, c: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 2.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến DH và NR của enzyme flavourzyme

Nhiệt độ (°C)	30	35	40	45	50	55	60
DH (%)	$5,22^{a}$ ±0,35	$11,08^{b}$ ±0,42	$15,06^{c}$ ±0,51	$17,16^{d}$ ±0,20	$17,59^{e}$ ±0,16	$15,74^{c}$ ±0,45	$12,52^{b}$ ±0,22
NR (%)	$11,31^{a}$ ±1,30	$43,13^{b}$ ±1,73	$65,17^{c}$ ±2,17	$77,45^{d}$ ±1,75	$79,92^{e}$ ±1,58	$72,78^{f}$ ±2,02	$55,80^{g}$ ±1,91

a, b, c, d, e, f, g: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 2.7. Ảnh hưởng của pH đến DH và NR của enzyme flavourzyme

pH	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
DH (%)	14,27^{a} ±0,35	16,46^{b} ±0,50	17,39^{c} ±0,37	18,08^{c} ±0,44	15,49^{d} ±0,24	12,66^{e} ±0,31	8,50^{f} ±0,25
NR (%)	63,28^{a} ±2,25	75,05^{b} ±2,10	80,01^{c} ±2,35	78,24^{c} ±1,26	69,76^{a} ±2,15	55,53^{d} ±1,95	40,57^{e} ±2,00

a, b, c, d, e, f: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 2.8. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến DH và NR của enzyme flavourzyme

Thời gian (giờ)	2	3	4	5	6	7	8
DH (%)	15,17^{a} ±0,36	16,40^{b} ±0,28	17,48^{c} ±0,20	17,49^{c} ±0,40	17,50^{c} ±0,20	17,50^{c} ±0,38	17,41^{c} ±0,36
NR (%)	70,32^{a} ±2,36	73,94^{a} ±2,11	79,17^{b} ±2,02	79,37^{b} ±1,41	79,45^{b} ±1,76	79,45^{b} ±2,30	79,50^{b} ±1,40

a, b, c: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 2.9. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme alcalase đến DH và NR

Nồng độ enzyme (AU/g)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
DH (%)	12,52^{a}±0,15	13,95^{b}±0,17	14,55^{c}±0,16	14,56^{c}±0,20	14,57^{c}±1,71
NR (%)	47,46^{a}±1,36	55,46^{b}±2,07	61,05^{c}±1,75	61,46^{c}±1,46	61,71^{c}±1,71

a, b, c: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 2.10. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến DH và NR của enzyme alcalase

Nhiệt độ (°C)	45	50	55	60	65
DH (%)	17,04^{a}±0,30	18,43^{b}±0,20	19,04^{c}±0,24	18,59^{c}±0,30	16,48^{d}±0,40
NR (%)	76,50^{a}±2,50	80,43^{b}±2,40	85,66^{c}±2,20	81,93^{c}±2,07	74,00^{a}±2,20

a, b, c, d: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 2.11. Ảnh hưởng của pH đến DH và NR của enzyme alcalase

pH	6	7	8	9
DH (%)	$17,29^{a}\pm0,45$	$18,75^{b}\pm0,40$	$20,71^{c}\pm0,31$	$18,61^{b}\pm0,45$
NR (%)	$78,32^{a}\pm1,87$	$84,16^{b}\pm2,08$	$87,80^{c}\pm1,65$	$83,98^{b}\pm1,98$

a, b, c: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 2.12. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến DH và NR của enzyme alcalase

Thời gian (giờ)	3	4	5	6	7
DH (%)	$18,48^{a}\pm0,35$	$20,58^{b}\pm0,15$	$23,92^{c}\pm0,36$	$23,97^{c}\pm0,23$	$23,94^{c}\pm0,21$
NR (%)	$81,01^{a}\pm2,50$	$86,01^{b}\pm2,00$	$92,56^{c}\pm1,61$	$92,65^{c}\pm2,30$	$92,64^{c}\pm1,90$

a, b, c: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Phụ lục 3

Bảng 3.1. Khả năng hòa tan của các phân đoạn collagen (F1, F2, F3)

STT	pH	F1	F2	F3
1	4	$98,69^{e}\pm0,09$	$98,45^{f}\pm0,16$	$97,52^{h}\pm0,01$
2	4,5	$98,93^{d}\pm0,07$	$98,50^{f}\pm0,15$	$97,55^{h}\pm0,05$
3	5,0	$99,26^{c}\pm0,05$	$99,00^{d}\pm0,05$	$97,63^{h}\pm0,09$
4	5,5	$99,97^{a}\pm0,03$	$99,79^{b}\pm0,17$	$97,93^{g}\pm0,07$
5	6,0	$99,98^{a}\pm0,02$	$99,98^{a}\pm0,03$	$98,26^{f}\pm0,05$
6	6,5	$99,98^{a}\pm0,03$	$99,98^{a}\pm0,03$	$98,96^{d}\pm0,01$
7	7,0	$99,99^{a}\pm0,01$	$99,99^{a}\pm0,01$	$98,98^{d}\pm0,03$
8	7,5	$100,00^{a}\pm0,01$	$100,00^{a}\pm0,01$	$98,97^{d}\pm0,02$
9	8,0	$99,98^{a}\pm0,02$	$99,98^{a}\pm0,03$	$99,95^{d}\pm0,05$
10	8,5	$99,99^{a}\pm0,01$	$99,99^{a}\pm0,01$	$99,98^{a}\pm0,03$
11	9,0	$99,98^{a}\pm0,02$	$99,98^{a}\pm0,01$	$99,98^{a}\pm0,02$

a, b, c, d, e, f, g, h: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 3.2. Khả năng tạo nhũ tương của các phân đoạn collagen (F1, F2, F3)

STT	pH	F1		F2		F3	
		EAI(g/m^2)	ESI(Phút)	EAI(g/m^2)	ESI(Phút)	EAI(g/m^2)	ESI(Phút)
1	4	$37,00^{a}\pm1,73$	$5,17^{a}\pm0,04$	$38,40^{a}\pm0,36$	$6,50^{a}\pm0,50$	$50,00^{a}\pm2,65$	$8,17^{a}\pm0,21$
2	4,5	$48,00^{b}\pm2,00$	$6,78^{b}\pm0,11$	$51,30^{b}\pm1,54$	$7,87^{b}\pm0,23$	$60,00^{b}\pm2,65$	$9,20^{b}\pm0,17$
3	5,0	$57,33^{c}\pm1,53$	$7,80^{c}\pm0,35$	$60,00^{c}\pm1,73$	$8,80^{c}\pm0,35$	$68,33^{c}\pm0,58$	$10,24^{c}\pm0,25$
4	5,5	$66,67^{d}\pm2,08$	$9,20^{d}\pm0,06$	$68,70^{d}\pm1,13$	$10,50^{d}\pm0,50$	$80,33^{d}\pm2,52$	$12,17^{d}\pm0,15$
5	6,0	$76,10^{e}\pm0,85$	$10,73^{e}\pm0,09$	$80,10^{e}\pm0,85$	$11,60^{e}\pm0,53$	$88,67^{e}\pm2,08$	$13,85^{e}\pm0,27$
6	6,5	$81,93^{f}\pm0,90$	$11,83^{f}\pm0,10$	$84,00^{f}\pm0,30$	$12,50^{f}\pm0,50$	$94,00^{f}\pm1,00$	$15,20^{f}\pm0,10$
7	7,0	$85,83^{g}\pm0,76$	$13,50^{g}\pm0,30$	$88,70^{g}\pm0,61$	$14,70^{g}\pm0,52$	$99,00^{g}\pm1,41$	$16,89^{g}\pm0,19$
8	7,5	$88,50^{h}\pm0,71$	$15,87^{h}\pm0,32$	$92,00^{h}\pm1,00$	$16,50^{h}\pm0,87$	$106,67^{h}\pm1,53$	$18,73^{h}\pm0,32$
9	8,0	$91,97^{i}\pm0,95$	$16,61^{i}\pm0,32$	$94,83^{i}\pm0,95$	$17,40^{i}\pm0,26$	$110,33^{i}\pm0,58$	$19,98^{i}\pm0,35$
10	8,5	$92,13^{i}\pm0,23$	$16,90^{i}\pm0,36$	$95,08^{i}\pm1,00$	$17,62^{i}\pm0,15$	$110,60^{i}\pm0,58$	$20,30^{i}\pm0,35$
11	9,0	$92,10^{i}\pm0,11$	$17,00^{i}\pm0,05$	$95,12^{i}\pm0,21$	$17,80^{i}\pm0,17$	$110,70^{i}\pm1,00$	$20,57^{i}\pm0,40$

a, b, c, d, e, f, g, h, i: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 3.3. Khả năng tạo bọt của các phân đoạn collagen (F1, F2, F3)

STT	pH	F1		F2		F3	
		FC (%)	FS (%)	FC (%)	FS (%)	FC (%)	FS (%)
1	4	$55,00^{a}\pm2,65$	$31,47^{a}\pm1,29$	$60,00^{a}\pm2,65$	$32,70^{a}\pm0,44$	$69,30^{a}\pm0,52$	$33,80^{a}\pm0,72$
2	4,5	$65,80^{b}\pm2,75$	$35,33^{b}\pm1,53$	$71,82^{b}\pm2,75$	$36,33^{b}\pm1,53$	$80,60^{b}\pm1.15$	$38,00^{b}\pm1,00$
3	5,0	$76,30^{c}\pm2,52$	$38,73^{c}\pm0,64$	$81,13^{c}\pm1,04$	$40,05^{c}\pm0,95$	$86,30^{c}\pm1,18$	$44,20^{c}\pm0,35$
4	5,5	$84,00^{d}\pm1,00$	$42,20^{d}\pm0,72$	$86,00^{d}\pm1,00$	$43,50^{d}\pm0,50$	$94,10^{d}\pm0,85$	$48,30^{d}\pm1,47$
5	6,0	$89,60^{e}\pm1,25$	$44,33^{e}\pm1,15$	$93,57^{e}\pm1,25$	$47,80^{e}\pm0,35$	$100,20^{e}\pm1,59$	$52,60^{e}\pm0,69$
6	6,5	$96,00^{f}\pm2,00$	$48,00^{f}\pm1,00$	$100,00^{f}\pm2,00$	$52,80^{f}\pm0,35$	$110,30^{f}\pm0,89$	$60,00^{f}\pm1,00$
7	7,0	$105,70^{g}\pm1,53$	$51,93^{g}\pm0,90$	$109,40^{g}\pm1,22$	$55,30^{g}\pm1,13$	$119,50^{g}\pm1,23$	$63,00^{g}\pm0,50$
8	7,5	$108,00^{h}\pm1,00$	$55,00^{h}\pm1,00$	$112,00^{h}\pm1,00$	$57,20^{h}\pm0,72$	$125,20^{h}\pm0,35$	$70,30^{h}\pm1,47$
9	8,0	$115,50^{i}\pm1,32$	$58,70^{i}\pm1,15$	$119,43^{i}\pm1,32$	$59,54^{i}\pm1,15$	$130,05^{i}\pm0,85$	$73,50^{i}\pm0,50$
10	8,5	$115,30^{i}\pm1,10$	$58,83^{i}\pm0,76$	$119,27^{i}\pm1,10$	$59,80^{i}\pm0,72$	$130,30^{i}\pm0,61$	$73,40^{i}\pm1.04$
11	9,0	$115,30^{i}\pm1,42$	$58,80^{i}\pm0,52$	$119,27^{i}\pm1,42$	$59,80^{i}\pm0,52$	$130,30^{i}\pm1,15$	$73,40^{i}\pm1,04$

a, b, c, d, e, f, g, h, i: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 3.4. Khả năng khử gốc tự do DPPH của các phân đoạn collagen (F1, F2, F3)

Nồng độ collagen thủy phân µg/ml		**25**	**50**	**75**	**100**	**125**	**150**
Khả năng khử gốc tự do DPPH (%)	**F1**	48,99 ±1,78	55,85 ±1,25	63,76 ±1,05	70,08 ±2,15	78,04 ±2,22	84,64 ±1,76
	F2	45,54 ±1,00	52,41 ±2,00	60,25 ±1,50	65,32 ±1,20	71,78 ±2,00	79,39 ±3,00
	F3	36,54 ±1,57	43,41 ±1,25	48,25 ±2,05	55,32 ±2,00	63,78 ±2,62	69,39 ±2,15

Bảng 3.5. Năng lực khử tổng của các phân đoạn collagen (F1, F2, F3)

Nồng độ collagen thủy phân µg/ml		**20**	**40**	**60**	**80**
Năng lực khử tổng (%)	**F1**	52,94±2,25	68,02±2,55	81,54±2,00	90,73±2,37
	F2	49,94±2,00	65,02±2,49	78,54±2,96	87,73±2,01
	F3	30,94±2,05	41,02±2,28	51,54±2,55	63,73±1,95

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ collagen đến khả năng ức chế oxy hóa dầu trong mô hình dầu-nước

(Chỉ tiêu theo dõi là chỉ số peroxit POV (mili đương lượng oxy hoạt tính/kg) theo thời gian bảo quản ở 50°C)

Ngày	Nồng độ collagen (mg/ml)			
	Mẫu trắng	25	50	100
0	1,00±0,10	1,00±0,10	1,00±0,05	1,00±0,04
1	1,25±0,13	1,25±0,13	1,00±0,05	1,00±0,06
2	1,50±0,12	1,25±0,11	1,00±0,11	1,00±0,10
3	1,75±0,10	1,35±0,12	1,25±0,10	1,00±0,11
4	2,75±0,15	2,00±0,16	1,25±0,14	1,25±0,15
5	3,75±0,31	2,85±0,20	1,25±0,15	1,30±0,16
6	5,25±0,13	3,75±0,11	1,30±0,14	1,40±0,12
7	6,50±0,27	4,50±0,13	2,00±0,25	1,80±0,13
8	8,50±0,13	5,50±0,25	2,25±0,13	2,25±0,14
9	9,25±0,15	7,25±0,15	2,75±0,20	2,50±0,20
10	9,75±0,20	7,75±0,20	3,00±0,11	2,80±0,13

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của các phân đoạn collagen đến khả năng ức chế oxy hóa dầu trong mô hình dầu-nước

(Chỉ tiêu theo dõi là chỉ số peroxit POV (mili đương lượng oxy hoạt tính/kg) theo thời gian bảo quản ở 50°C)

Ngày	Phân đoạn collagen			
	Mẫu trắng	F1	F2	F3
0	1,00±0,10	1,00±0,05	1,00±0,05	1,00±0,10
1	1,25±0,13	1,00±0,05	1,00±0,10	1,25±0,10
2	1,50±0,12	1,00±0,10	1,00±0,12	1,25±0,14
3	1,75±0,10	1,00±0,10	1,15±0,14	1,50±0,12
4	2,75±0,15	1,15±0,15	1,25±0,15	1,80±0,16
5	3,75±0,30	1,20±0,15	1,25±0,11	2,10±0,20
6	5,25±0,12	1,30±0,12	1,30±0,13	2,50±0,15
7	6,50±0,27	1,50±0,13	2,00±0,21	3,30±0,13
8	8,50±0,13	1,85±0,13	2,35±0,12	3,89±0,25
9	9,25±0,15	2,20±0,20	2,75±0,22	4,44±0,12
10	9,75±0,20	2,50±0,11	3,15±0,14	4,90±0,20

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của nồng độ collagen thủy phân đến khả năng chống đông

Số lần tái đông	Nồng độ collagen thủy phân		
	Mẫu trắng	5%	10%
2	$36,32^{f}$±2,50	$65,16^{b}$±3,00	$80,05^{a}$±2,00
4	$31,18^{g}$±1,70	$53,92^{d}$±1,50	$65,13^{b}$±3,50
6	$27,28^{h}$±1,80	$48,73^{e}$±2,10	$56,24^{c}$±1,70
8	$21,17^{k}$±2,00	$24,94^{j}$±3,50	$36,43^{f}$±2,00
10	$19,55^{k}$±1,00	$22,75^{i}$±2,70	$32,08^{g}$±2,50

a, b, c, d, e, f, g, h, k: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của các phân đoạn collagen thủy phân đến khả năng chống đông

Số lần tái đông	Phân đoạn collagen thủy phân			
	Mẫu trắng	F1	F2	F3
2	$36,32^{h}\pm2,50$	$49,16^{d}\pm3,00$	$50,16^{d}\pm1,50$	$83,05^{a}\pm2,00$
4	$30,18^{j}\pm1,70$	$42,92^{e}\pm1,50$	$43,92^{e}\pm1,50$	$63,13^{b}\pm3,50$
6	$27,28^{k}\pm1,80$	$37,73^{f}\pm2,10$	$38,73^{f}\pm2,10$	$56,24^{c}\pm1,70$
8	$20,17^{i}\pm2,00$	$20,94^{l}\pm3,50$	$21,94^{l}\pm2,50$	$39,43^{e}\pm2,00$
10	$19,55^{l}\pm1,00$	$19,75^{l}\pm2,70$	$20,75^{l}\pm1,70$	$30,08^{g}\pm2,50$

a, b, c, d, e, f, g, h, k: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Phụ lục 4

Bảng 4.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình lọc màng

STT	Nhiệt độ (^{0}C)	Độ phân riêng (%)	Thông lượng qua màng (L/m^2.h)	Hiệu suất thu hồi nitrogen (%)
1	5	$35,23^{a}\pm0,52$	$1,66^{a}\pm0,07$	$40,42^{a}\pm1,05$
2	10	$34,17^{b}\pm0,71$	$1,96^{b}\pm0,06$	$48,36^{b}\pm1.11$
3	15	$33,26^{c}\pm0,23$	$2,17^{c}\pm0,05$	$54,72^{c}\pm0,97$
4	20	$32,12^{d}\pm0,35$	$2,52^{d}\pm0,03$	$59,02^{d}\pm1,04$
5	25	$31,16^{e}\pm0,27$	$2,83^{e}\pm0,07$	$69,43^{e}\pm1,17$
6	30	$31,81^{e}\pm0,42$	$2,80^{e}\pm0,04$	$62,29^{e}\pm1,25$
7	35	$32,02^{e}\pm0,36$	$2,75^{e}\pm0,03$	$60,97^{e}\pm0,87$

a, b, c, d, e: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 4.2. Ảnh hưởng của áp suất đến quá trình lọc màng

STT	Áp suất (psi)	Độ phân riêng (%)	Thông lượng qua màng (L/m^2.h)	Hiệu suất thu hồi nitrogen (%)
1	6	$35,02^{a}\pm0,71$	$1,76^{a}\pm0,06$	$45,25^{a}\pm0,87$
2	8	$32,33^{b}\pm0,23$	$2,48^{b}\pm0,05$	$58,57^{b}\pm1.11$
3	10	$30,05^{c}\pm0,35$	$2,91^{c}\pm0,03$	$68,59^{c}\pm0,97$
4	12	$29,56^{d}\pm0,27$	$3,02^{d}\pm0,07$	$73.96^{d}\pm1,04$
5	14	$30,77^{c}\pm0,42$	$2,87^{c}\pm0,04$	$70,85^{c}\pm1,17$

a, b, c, d: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 4.3. Ảnh hưởng của pH đến quá trình lọc màng

STT	pH	Độ phân riêng (%)	Thông lượng qua màng (L/m^2.h)	Hiệu suất thu hồi nitrogen (%)
1	6,0	29,43^a±0,23	3,07^a±0,05	74,89^a±0,97
2	6,5	27,45^b±0,35	3,40^b±0,03	80,81^b±1,04
3	7,0	28,15^c±0,27	3,23^c±0,07	75,96^a±1,17
4	7,5	30,79^d±0,42	2,85^d±0,04	70,59^c±1,25
5	8,0	31,25^d±0,36	2,54^e±0,02	67,71^d±0,87

a, b, c, d: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 4.4. Ảnh hưởng của lưu lượng dòng nhập liệu đến quá trình lọc màng

STT	Lưu lượng dòng nhập liệu (Lít/phút)	Độ phân riêng (%)	Thông lượng qua màng (L/m^2.h)	Hiệu suất thu hồi nitrogen (%)
1	0,5	27,87^a±0,23	3,38^a±0,02	77,89^a±0,97
2	1,0	27,54^a±0,35	3,49^b±0,02	80,82^b±1,04
3	1,5	27,02^c±0,27	3,53^c±0,01	82,38^c±1,17
4	2,0	27,15^c±0,42	3,54^d±0,02	82,40^c±1,25
5	2,5	27,20^c±0,36	3,55^d±0,01	82,42^c±0,87

a, b, c, d: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Phụ lục 5

Bảng 5.1. Khả năng hòa tan của SP1 và SP2

STT	pH	SP1	SP2
1	4	98,63^d±0,09	96,62^i±0,09
2	4,5	98,93^c±0,07	97,30^h±0,06
3	5,0	99,26^b±0,05	97,63^g±0,09
4	5,5	99,97^a±0,03	97,93^f±0,07
5	6,0	99,98^a±0,03	98,26^e±0,05
6	6,5	99,98^a±0,03	98,96^c±0,01
7	7,0	99,99^a±0,01	98,98^c±0,03
8	7,5	100,00^a±0,01	98,97^c±0,02
9	8,0	99,98^a±0,03	99,95^a±0,05
10	8,5	99,99^a±0,01	99,98^a±0,03
11	9,0	99,98^a±0,02	99,97^a±0,02

a, b, c, d, e, f, g, h, i: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 5.2. Khả năng tạo nhũ tương của SP1 và SP2

STT	pH	SP1		SP2	
		EAI(g/m^2)	ESI(Phút)	EAI(g/m^2)	ESI(Phút)
1	4	$41,00^{a}\pm1,73$	$7,17^{a}\pm0,29$	$53,00^{a}\pm2,65$	$8,17^{a}\pm0,21$
2	4,5	$52,00^{b}\pm2,00$	$7,87^{b}\pm0,23$	$63,00^{b}\pm2,65$	$9,10^{b}\pm0,17$
3	5,0	$61,33^{c}\pm1,53$	$8,80^{c}\pm0,35$	$70,33^{c}\pm1,53$	$10,23^{c}\pm0,25$
4	5,5	$70,67^{d}\pm2,08$	$11,20^{d}\pm0,72$	$82,33^{d}\pm2,52$	$12,17^{d}\pm0,15$
5	6,0	$80,10^{e}\pm0,85$	$12,73^{e}\pm0,46$	$90,67^{e}\pm2,08$	$14,33^{e}\pm0,42$
6	6,5	$85,93^{f}\pm0,90$	$13,83^{f}\pm0,29$	$96,00^{f}\pm1,00$	$15,20^{f}\pm0,10$
7	7,0	$89,83^{g}\pm0,76$	$15,50^{g}\pm0,50$	$101,00^{g}\pm1,41$	$17,33^{g}\pm0,15$
8	7,5	$92,90^{h}\pm0,85$	$108,67^{h}\pm1,53$	$108,67^{h}\pm1,53$	$20,43^{h}\pm0,21$
9	8,0	$95,97^{i}\pm0,95$	$19,23^{i}\pm0,40$	$112,33^{i}\pm0,58$	$24,17^{i}\pm0,29$
10	8,5	$97,80^{i}\pm0,72$	$19,37^{i}\pm0,32$	$112,33^{i}\pm0,58$	$24,20^{i}\pm0,20$
11	9,0	$98,00^{i}\pm1,00$	$19,43^{i}\pm0,38$	$112,00^{i}\pm1,00$	$24,27^{i}\pm0,38$

a, b, c, d,e, f, g, h, i: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 5.3. Khả năng tạo bọt của SP1 và SP2

STT	pH	SP1		SP2	
		FC (%)	FS (%)	FC (%)	FS (%)
1	4	$61,00^{a}\pm2,65$	$31,47^{a}\pm1,29$	$70,23^{a}\pm1,73$	$35,90^{a}\pm0,85$
2	4,5	$71,83^{b}\pm2,75$	$35,33^{b}\pm1,53$	$81,67^{b}\pm1,53$	$40,00^{b}\pm1,00$
3	5,0	$82,33^{c}\pm2,52$	$38,73^{c}\pm0,64$	$87,20^{c}\pm1,31$	$46,23^{c}\pm0,95$
4	5,5	$90,00^{d}\pm1,00$	$42,20^{d}\pm0,72$	$95,00^{d}\pm1,00$	$50,33^{d}\pm1,53$
5	6,0	$95,57^{e}\pm1,25$	$44,33^{e}\pm1,15$	$101,00^{e}\pm1,73$	$54,33^{e}\pm1,15$
6	6,5	$102,00^{f}\pm2,00$	$48,00^{f}\pm1,00$	$111,10^{f}\pm1,15$	$60,67^{f}\pm2,08$
7	7,0	$111,67^{g}\pm1,53$	$51,93^{g}\pm0,90$	$120,30^{g}\pm1,47$	$65,17^{g}\pm1,26$
8	7,5	$114,00^{h}\pm1,00$	$55,00^{h}\pm1,00$	$123,33^{h}\pm1,53$	$71,33^{h}\pm1,53$
9	8,0	$121,50^{i}\pm1,32$	$60,70^{i}\pm1,15$	$131,30^{i}\pm1,42$	$74,30^{i}\pm0,64$
10	8,5	$121,27^{i}\pm1,10$	$60,83^{i}\pm0,76$	$131,00^{i}\pm1,00$	$74,50^{i}\pm1,32$
11	9,0	$121,27^{i}\pm1,42$	$60,80^{i}\pm0,52$	$131,33^{i}\pm1,15$	$74,33^{i}\pm1,15$

a, b, c, d, e, f, g, h, i: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 5.4. Khả năng khử gốc tự do DPPH của SP1 và SP2 theo nồng độ

Nồng độ collagen thủy phân µg/ml		**25**	**50**	**75**	**100**	**125**	**150**
Khả năng khử gốc tự do DPPH (%)	**SP1**	42,98 ±1,78	49,86 ±1,25	57,75 ±2,05	67,09 ±3,15	75,05 ±2,62	81,63 ±1,76
	SP2	19,99 ±1,57	25,85 ±1,25	32,76 ±2,04	38,08 ±2,75	44,84 ±2,61	52,64 ±2,15
	Dịch thủy phân	36,54 ±1,00	43,41 ±2,00	48,25 ±1,50	55,32 ±1,20	63,78 ±2,00	69,39 ±3,00

Bảng 5.5. Năng lực khử tổng của SP1 và SP2 theo nồng độ

Nồng độ collagen thủy phân µg/ml		**20**	**40**	**60**	**80**
Năng lực khử tổng (%)	**SP1**	48,94±2.25	64,02±2,55	77,54±2,00	86,73±2,37
	SP2	15,93±1,55	34,03±1,78	44,55±2,05	55,74±1,45
	Dịch thủy phân	39,05±2,00	54,42±2,50	63,36±3,00	72,87±2,00

Bảng 5.6. Ảnh hưởng của các phân đoạn collagen đến khả năng ức chế oxy hóa dầu trong mô hình dầu-nước

(Chỉ tiêu theo dõi là chỉ số peroxit POV (mili đương lượng oxy hoạt tính/kg) theo thời gian bảo quản ở 50°C)

Ngày	Phân đoạn collagen		
	Mẫu trắng	SP1	SP2
0	1,00±0,10	1,00±0,05	1,00±0,05
1	1,25±0,13	1,00±0,05	1,25±0,10
2	1,50±0,12	1,00±0,10	1,25±0,13
3	1,75±0,10	1,00±0,10	1,30±0,11
4	2,75±0,15	1,25±0,15	1,60±0,16
5	3,75±0,30	1,30±0,15	1,90±0,20
6	5,25±0,12	1,40±0,12	2,30±0,15
7	6,50±0,27	1,80±0,13	3,10±0,13
8	8,50±0,13	2,25±0,13	4,00±0,25
9	9,25±0,15	2,50±0,20	4,55±0,15
10	9,75±0,20	2,80±0,11	5,01±0,20

Bảng 5.7. Ảnh hưởng của các phân đoạn collagen thủy phân đến khả năng chống đông

Số lần tái đông	Phân đoạn collagen thủy phân		
	Mẫu trắng	SP1	SP2
2	36,32±2,50	52,16±3,00	87,05±2,00
4	30,18±1,70	45,92±1,50	67,13±3,50
6	27,28±1,80	40,73±2,10	59,24±1,70
8	20,17±2,00	22,94±3,50	42,43±2,00
10	19,55±1,00	20,75±2,70	30,08±2,50

Phụ lục 6

Bảng 6.1. Kết quả cho điểm cảm quan xác định tỷ lệ nước bổ sung

Tỷ lệ nước (%) so với dịch quả chanh dây	Điểm trung bình có trọng lượng			Điểm chung	Xếp loại
	Trạng thái	Màu sắc	Mùi- vị		
30	3,42±0,31	3,60±0,20	6,73±0,39	$13,75^{a}$±0,30	Trung bình
35	3,49±0,26	3,93±0,40	8,00±0,48	$15,42^{b}$±0,38	Khá
40	3,56±0,36	4,15±0,32	8,18±0,46	$15,89^{b}$±0,38	Khá
45	3,56±0,56	4,91±0,34	8,36±0,42	$16,84^{c}$±0,44	Khá
50	3,78±0,26	5,35±0,19	9,09±0,18	$18,22^{d}$±0,21	Khá
55	3,56±0,50	5,24±0,46	8,18±0,63	$16,98^{c}$±0,53	Khá

a, b, c, d: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 6.2. Kết quả cho điểm cảm quan xác định tỷ lệ axit citric bổ sung

Tỷ lệ axit citric (%) so với dịch quả chanh dây	Điểm cảm quan có nhân hệ số trọng lượng			Điểm chung	Xếp loại
	Trạng thái	Màu sắc	Mùi- vị		
0,10	3,48±0,32	5,05±0,27	9,05±0,22	$17,58^{a}$±0,27	Khá
0,15	3,85±0,30	5,24±0,24	9,64±0,42	$18,73^{b}$±0,32	Tốt
0,20	3,56±0,48	5,35±0,18	9,27±0,28	$18,18^{ab}$±0,28	Khá
0,25	3,56±0,58	5,13±0,56	7,82±0,42	$16,51^{c}$±0,52	Khá
0,30	3,20±0,35	4,69±0.33	7,82±0,49	$15,71^{d}$±0,39	Khá

a, b, c, d: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 6.3. Kết quả cho điểm cảm quan xác định tỷ lệ siro bổ sung

Tỷ lệ siro (%) so với dịch quả chanh dây	Điểm cảm quan có nhân hệ số trọng lượng			Tổng điểm	Xếp loại
	Trạng thái	Màu sắc	Mùi- vị		
15	3,63±0,24	5,13±0,22	9,59±0,32	$18,35^{a}$±0,26	Khá
20	3,63±0,28	5,23±0,38	9,60±0,48	$18,46^{a}$±0,38	Khá
25	3,85±0,42	5,46±0,24	10,00±0,30	$19,31^{b}$±0,32	Tốt
30	3,93±0,33	5,56±0,21	9,27±0,39	$18,76^{ab}$±0,31	Tốt
35	3,93±0,28	5,45±0,32	9,09±0,45	$18,47^{ab}$±0,35	Khá

a, b: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 6.4. Kết quả cho điểm cảm quan xác định tỷ lệ collagen bổ sung

Tỷ lệ collagen thủy phân (%) so với dịch quả chanh dây	Điểm cảm quan có nhân hệ số trọng lượng			Điểm chung	Xếp loại
	Trạng thái	Màu sắc	Mùi- vị		
0,000	3,91±0,28	5,42±0,22	10,00±0,40	19,33^{a}±0,30	Tốt
0,050	3,93±0,15	5,45±0,21	10,00±0,24	19,38^{a}±0,20	Tốt
0,075	3,83±0,15	5,57±0,29	10,00±0,22	19,40^{a}±0,22	Tốt
0,100	4,00±0,15	5,78±0,12	10,00±0,18	19,78^{b}±0,15	Tốt
0,125	3,77±0,30	5,47±0,22	10,00±0,14	19,24^{a}±0,22	Tốt
0,150	3,82±0,11	5,65±0,08	9,65±0,14	19,12^{a}±0,11	Tốt

a, b, c: trên cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 6.5. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến độ nhớt, pH và điểm cảm quan của sản phẩm sữa chua.

Thời gian lên men (phút)	240	260	280	300	320	340	360
Độ nhớt (cp)	3240,00^{a} ±10,00	3346,67^{b} ±15,28	3443,33^{c} ±15,28	3538,33^{d} ±12,58	3558,33^{ed} ±12,58	3572,33^{fed} ±6,81	3585,00^{gfed} ±10,00
pH	5,70^{a}±0,10	5,12^{b}±0.10	4,73^{c}±0,12	4,48^{d}±0,08	4,20^{e}±0,10	4,13^{e}±0,12	4,10^{e}±0,10
Điểm cảm quan	15,40^{a}±0,35	16,21^{b}±0,26	17,36^{c}±0,14	18,35^{d}±0,11	17,23^{ec}±0,23	16,28^{b}±0,26	16,27^{b}±0,25

a, b, c, d, e, f, g: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Bảng 6.6. Ảnh hưởng tỷ lệ bổ sung collagen thủy phân đến độ nhớt, pH và điểm cảm quan của sản phẩm sữa chua

Tỷ lệ collagen thủy phân bổ sung (%)	0.000	0.050	0.075	0.100	0.125	0.150
Độ nhớt (cp)	3158,33^{a} ±7,64	3275,00^{b} ±13,23	3439,00^{c} ±8,54	3548,33^{d} ±7,64	3757,67^{e} ±14,84	3865,00^{f} ±10,00
pH	4,50^{a}±0,10	4,60^{a}±0,10	4,57^{a}±0,06	4,47^{a}±0,06	4,60^{a}±0,10	4,57^{a}±0,06
Điểm cảm quan	17,30^{a}±0,16	18,32^{b}±0,21	18,87^{c}±0,12	18,35^{b}±0,20	18,14^{b}±0,10	17,38^{a}±0,15

a, b, c, d, e, f: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

Phụ lục 7

7.1 Phân tích axit amin

Cân chính xác khoảng 0,1 gam mẫu vào ống COD, thêm vào 5ml HCl 6N và đem ủ ở nhiệt độ 110 ^{o}C trong 24 giờ bằng thiết bị phá mẫu ECO8 (VELP, Ý). Mẫu sau khi thủy phân được trung hòa bằng NaOH 6N và NaOH 0,1N. Dùng nước cất 2 lần để định mức đến 25 ml, ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ phần chất không tan. Dịch sau khi ly tâm được lọc qua màng syringe 0,45 µm, dịch qua màng đem đi tạo dẫn xuất với 4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulphonyl chloride (DABS-C1) (Stocchi và ctv, 1992) và phân tích HPLC.

Khi thủy phân mẫu bằng axit thì axit amin tryptophan và tyrosine bị mất, vì vậy, để xác định 2 axit amin này thì phải thủy phân mẫu trong môi trường kiềm.

Cân chính xác khoảng 0,1 gam mẫu vào ống COD, thêm vào 5ml NaOH 4N và sụt khí Argon (Ar) trong 3 phút với tốc độ 10ml/phút sau đó đem ủ ở nhiệt độ 120 ^{o}C trong 18 giờ bằng thiết bị phá mẫu ECO8 (VELP, Ý). Mẫu sau khi thủy phân được axit hóa đến pH 6,5 bằng HCl 4N và HCl 0,1N. Mẫu sau khi axit hóa đem ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút, lấy phần dịch ly tâm được đem kiềm hóa đến pH 12, lọc và định mức dịch lọc trong bình định mức 25ml bằng NaOH 0,01N, lọc qua màng syringe 0,45 µm. Dịch lọc qua màng đem đi tạo dẫn xuất với 4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulphonyl chloride (DABS-C1) (Stocchi và ctv, 1992) và phân tích HPLC

Chương trình sắc ký: Hệ thống HPLC Agilent 1100, cột ACE C18 (4,6 × 250 mm), đầu dò UV 250 nm, tốc độ dòng pha động là 1 ml/phút tại nhiệt độ 40 ^{o}C. Pha động 20% acetonitril (ACN): 80% đệm 0,1% axit trifluroacetic.

7.2. Xác định hàm lượng collagen

Xác định collagen thông qua xác định hydroxyproline (Woessner, 1961). Hàm lượng collagen được tính theo công thức: $x = m.k$

Trong đó: x: Khối lượng collagen; m: khối lượng của hydroxyproline (Hyp); k: hệ số phụ thuộc vào hàm lượng hydroxyproline $k = \frac{100}{a}$ (Boran & Regenstein, 2009);

a: phần trăm của hydroxyproline so với tổng các axit amin của da cá khi đã xử lý phi collagen sao cho tỷ lệ hydroxyproline/protein là lớn nhất.

Xác định hydroxyproline bằng HPLC (Stocchi và ctv, 1992):

Cân chính xác khoảng 0,1 gam mẫu vào ống COD, thêm vào 5 ml HCl 6N và đem ủ 110 ^{o}C trong 24 giờ bằng thiết bị phá mẫu ECO8 (VELP, Ý). Mẫu sau khi thủy phân được trung hòa bằng NaOH 6N và NaOH 0,1N. Dùng nước cất 2 lần để định mức đến 25 ml, ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ phần chất không tan. Dịch sau khi ly tâm pha loãng 25 lần và lọc qua màng syringe 0,45 µm, dịch qua màng đem đi tạo dẫn xuất với 4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulphonyl chloride (DABS-C1) (Stocchi và ctv., 1992) và phân tích HPLC. Chương trình chạy sắc ký: hệ thống HPLC Agilent 1100, cột ACE C18 (4,6 × 250 mm), đầu dò UV 465 nm, tốc độ dòng pha động là 1 ml/phút tại nhiệt độ 40 ^{o}C. Chạy đẳng dòng, pha động đệm acetate/ACN (75/25).

7.3. Xác định độ thủy phân

Độ thủy phân của collagen được xác định phần trăm các liên kết peptide bị cắt so với tổng liên kết peptide trong collagen. Nó được tính dựa vào nhóm amin tự do trong dung dịch sau khi thủy phân (mol/l) theo phương pháp của Goodwin (1968) và Nielsen và ctv, (2001) với đường chuẩn glycine.

Collagen thủy phân được ly tâm ở 4 ^{o}C với tốc độ 10000 vòng/ phút trong 20 phút và tách lấy phần dịch trong pha loãng 100 lần bằng nước cất. Cho vào mỗi ống nghiệm 1 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 ủ 60 °C trong 10 phút sau đó được 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 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)

Phương trình đường chuẩn glycine: y = 1422.6x - 0.0176 (R^2 = 0.9992) (1)

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

$$\text{Độ thủy phân (DH, \%)} = \frac{h}{h_{tot}} x100 = \frac{A \times d}{P \times 11.1} x100 \quad (2)$$

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).

7.4. Xác định sự phân bố trọng lượng phân tử peptide của collagen thủy phân

Sự phân bố trọng 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 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 (Spellman và ctv, 2009**).**

7.5. Độ phân riêng

Độ phân riêng là đại lượng đặt trưng cho khả năng tách các cấu tử có phân tử lượng khác nhau cùng hòa tan trong một pha lỏng hoặc các cấu tử rắn có kích thước nhỏ ra khỏi pha lỏng hoặc pha khí (Field & Lipnizki, 2017). Độ phân riêng được xác định theo phương pháp của Shishegaran và ctv, 2020.

Công thức tính độ phân riêng

$$R = \left(1 - \frac{C_p}{C_f}\right) x100(\%)$$

Trong đó: R là độ phân riêng của cấu tử, tính bằng (%)

C_p là nồng độ cấu tử trong dòng qua màng (permeate) (g/l)

C_f là nồng độ cấu tử trong dòng nhập liệu (g/l)

7.6. Thông lượng qua màng

Thông lượng qua màng là thể tích dòng thấm qua màng (permeate) trong một đơn vị thời gian qua một đơn vị diện tích màng lọc (Field & Lipnizki, 2017). Thông lượng qua màng được xác định theo phương pháp của Shishegaran và ctv, 2020.

Công thức tính thông lượng qua màng

$$J = \frac{V}{Axt}$$

Trong đó: J là thông lượng dòng qua màng, tính bằng $l/m^2.h$

t là thời gian lọc, tính bằng giờ

V là thể tích dòng qua màng thu được trong thời gian t, tính bằng lít

A diện tích bề mặt lọc của màng, tính bằng m^2

7.7. Hiệu suất thu hồi

Hiệu suất thu hồi là phần trăm khối lượng cấu tử thu được của dòng qua màng (permeate) so với khối lượng cấu tử trong dịch nhập liệu (ban đầu) (Field & Lipnizki, 2017). Hiệu suất thu hồi được xác định theo phương pháp của Gifuni và ctv, 2020

Công thức tính hiệu suất thu hồi

$$H = \frac{C_1.V_1.100}{C_0.V_0} \ (\%)$$

Trong đó: H là hiệu suất thu hồi, tính bằng (%)

C_0 là nồng độ cấu tử trong dịch ban đầu, tính bằng (g/l)

C_1 là nồng độ cấu tử trong dịch thu được qua màng, tính bằng (g/l)

V_0 là thể tích của dịch ban đầu, tính bằng (lít)

V_1 là thể tích của dịch qua màng, tính bằng (lít)

7.8. Độ hòa tan

Độ hòa tan của các phân đoạn collagen thủy phân được xác định dựa trên phương pháp được mô tả bởi Tsumura và ctv (2005) với một số điều chỉnh. Lấy 200 mg mẫu đã đông khô hòa tan trong 20 ml nước cất và điều chỉnh pH từ 4,0 đến 9,0 bằng HCl (1 M) hoặc NaOH (1 M). Sau đó, hỗn hợp được khuấy trong 30 phút ở 25 ± 1° C và ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 15 phút. Hàm lượng protein của dung dịch bên trên sau ly tâm và tổng protein trong dung dịch được xác định dựa trên phương

pháp của Lowry với chất chuẩn là albumin huyết thanh bò (BSA). Độ hòa tan của protein được tính bằng phần trăm sự phân bố của của dung dịch bên trên sau ly tâm so với tổng lượng protein trong dung dịch.

7.9. Xác định khả năng tạo nhũ của collagen thủy phân

Tính chất tạo nhũ gồm hoạt tính tạo nhũ (EAI:Emulsifying activity index) và độ bền nhũ (ESI: Emulsifying stability index) được tính toán dựa trên phương pháp của Pearce và Kinsella (Pearce & Kinsella, 1978; Zamorano-Apodaca và ctv, 2020) . Dầu đậu nành (10 ml) và dung dịch mẫu (30 ml, 0,1%) được đồng hóa với tốc độ 20.000 vòng/ phút. Lấy 50 µl nhũ tương (được hút từ đáy dụng cụ chứa nhũ trương ở 0 và 10 phút sau khi đồng nhất và pha loãng 100 lần bằng dung dịch SDS 0,1% (SDS: sodium dodecyl sulfate). Độ hấp thụ của dung dịch pha loãng ở bước sóng 500 nm. Độ hấp thụ, được xác định ngay lập tức (A0) và 10 phút (A10) sau khi tạo nhũ tương. Khả năng tạo nhũ và độ bền nhũ được tính toán theo công thức sau:

EAI (m^2/g) = (2 × 2.303 × A0 x DF)/(0.25 × nồng độ collagen thủy phân)

ESI (phút) = A0 × $\triangle t/\triangle A$

Trong đó: $\triangle A = A0 - A10$, $\triangle t = 10$ phút

DF: Độ pha loãng

Dung dịch mẫu được điều chỉnh pH 4,0 – 9,0 bằng HCl (1 M) hoặc NaOH (1 M)

7.10. Xác định khả năng tạo bọt của của collagen thủy phân

Khả năng tạo bọt (FC: Foaming capacity và độ bền bọt (FS: Foaming stability) được xác định dựa trên phương pháp của Shahidi và ctv.(Shahidi và ctv, 1995; Zamorano-Apodaca và ctv, 2020) có một vài điều chỉnh nhỏ. Dung dịch mẫu (20 ml, 0,5%) được đồng hóa ở tốc độ 16.000 vòng/ phút trong 2 phút sau đó nhanh chóng chuyển vào ống đong để xác định thể tích bọt. Tổng thể tích được xác định ở 0 và 10 phút sau khi chuyển vào ống đong. FC được định nghĩa là độ giãn nở của bọt ở 0 phút, và FS được định nghĩa là độ giãn nở của bọt trong 10 phút. Độ giãn nở của bọt được tính toán dựa trên công thức sau:

Độ giãn nở của bọt (%) = [(A - B) / B] × 100%

Trong đó A là thể tích sau khi đồng hóa (ml) tại các thời điểm khác nhau và B là thể tích trước khi đồng hóa (ml). Dung dịch mẫu được điều chỉnh pH 4,0 – 9,0 bằng HCl (1 M) hoặc NaOH (1 M)

7.11. Xác định khả năng chống oxy hóa

+ Khả năng khử gốc tự do

Khả năng khử gốc tự do DPPH được xác định theo phương pháp (Hui-Yin, 2002). Collagen thủy phân được pha nồng độ 1mg/ml. Lấy vào mỗi ống nghiệm collagen thủy phân có nồng độ 1mg/ml với các thể tích lần lượt là: 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl, 500 µl và 600 µl và thêm nước cất để đạt tổng thể tích 3 ml sau đó thêm vào mỗi ống nghiệm 1 ml dung dịch DPPH 0.2 mM, lắc đề và để yên trong bóng tối 30 phút. Độ hấp thu quang học được đo ở bước sóng 517 nm ((Spectrophotometer, LAMOMED 2550, Mỹ). Mẫu trắng là thay mẫu thử bằng nước cất. Mẫu đối chứng dương là vitamin C nồng độ 200 µg/ml.

Khả năng khử gốc tự do DPPH được xác định theo công thức sau:

$$\mathrm{DPPH}(\%) = \frac{\mathrm{A_{CT}} - \mathrm{A_{SP}}}{\mathrm{A_{CT}}} \mathrm{X100}$$

Trong đó: A_{CT}: Độ hấp thu quang học của mẫu trắng

A_{SP}: Độ hấp thu quang học của mẫu có chứa dịch thử

Kết quả xác định bởi giá trị IC_{50} là nồng độ của mẫu thử khử được 50% gốc tự do DPPH ở điều kiện xác định. Giá trị IC_{50} thấp thì hoạt tính khử gốc tự do DPPH cao. Có thể so sánh với giá trị IC_{50} của Axit ascorbic (sigma).

+ Năng lực khử

Năng lực khử được xác định theo phương pháp pháp của Wang và ctv (2012). Collagen thủy phân được pha thành nồng độ 1mg/ml rồi lấy vào các ống nghiệm với thể tích lần lượt là 120 µl, 240 µl, 360 µl và 480 µl, 600 µl và 720 µl, thêm nước cất để đạt tổng thể tích 3 ml. Thêm lần vào mỗi ống nghiệm 1ml dung dịch $FeSO_4$ 2mM, 1ml dung dịch 1,10-phenanthroline 2mM, hỗn hợp được trộn đều bằng máy vortex. Thời gian phản ứng bắt đầu tính khi cho thêm 1ml H_2O_2(0,03%) và ủ ở 37 °C trong

60 phút, đo độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 536 nm (LAMOMED 2550, Mỹ). Một mẫu có tất cả các chất mà không có collagen thủy phân gọi là đối chứng âm, mẫu có tất cả các chất mà không có H_2O_2 gọi là mẫu trắng. Năng lực khử HRSA (hydroxyl radical scavenging activity) được tính theo công thức:

$$\text{HRSA (\%)} = \frac{(\text{As} - \text{An})\text{x}100}{\text{Ab} - \text{An}}$$

Trong đó:

As: Độ hấp thụ của mẫu

An: Độ hấp thụ của đối chứng âm

Ab: Độ hấp thụ của mẫu trắng

+ Xác định khả năng chống oxy hóa trên môi trường dầu-nước.

Hệ nhũ tương dầu-nước được chuẩn bị theo phương pháp của Zhao và ctv (2012) gồm: 10ml dầu Olive, 0,5ml Tween 40 và 85ml nước. Hỗn hợp được đồng hóa ở tốc độ 10.000 rpm trong 5 phút (IKA, T18B, Ultra - Turax, Germany). Hút chính xác 2 ml dung dịch collagen thủy phân nồng độ 100 µg/ml được trộn đều với 10 ml hệ nhũ tương dầu-nước chứa trong ống nhựa 50 ml có nắp đậy, đặt trong tủ ổn nhiệt ở 50 °C, quá trình oxy hóa chất béo được quan sát hàng ngày. Hàm lượng hydroperoxide được xác định theo phương pháp của Richards & Hultin, 2002. Hàm lượng hydroperoxide được xác định trên dịch chiết chất béo theo phương pháp của Bligh & Dyer (1959. Kết quả tính toán hàm lượng hydroperoxide từ đường chuẩn Cumene hydroperoxide (HPO) nồng độ từ 0 – 120 nmol/ml.

7.12. Phương pháp xác định khả năng chống đông

Myoglobulin được hào tan trong dung dịch KCl 1,2M (pH 7,0) với tỷ lệ 1:5(w/v) và khuấy trong 30 phút ở 2 °C. Dung dịch myoglobulin bảo quản ở 4 °C và được sử dụng trong vòng 12 giờ.

Mỗi phân đoạn collagen thủy phân được hòa tan trong nước với nồng độ 10% sau đó trộn với dung dịch myoglobin đã pha ở trên với tỷ lệ 1:1 (v/v). Dung dịch sau khi trộn được làm đông ở nhiệt độ -20 °C trong 20 phút. Mẫu sau khi đông đem tan

băng ở 37 °C trong bể nước trong thời gian 10 phút. Thực hiện tái đông dung dịch này 0, 3, 6, 9 lần. Mẫu sau khi tan băng được giữ trong nước đá cho đến khi phân tích. Mẫu trắng là mẫu thay thế dung dịch collagen bằng nước cất (Wu và ctv, 2018).

Xác định hoạt tính của Ca^{2+}- ATPase của myoglobulin theo phương pháp (Benjakul & ctv, 1997). Trộn 25 µL dung dịch đi làm đông với 15 µl dung dịch Tris-maleate 0.5M (pH 7,0), 25 µl dung dịch $CaCl_2$ 0,1M và 172,5 µl nước cất. Hỗn hợp được trộn đều trên máy vortex. Thêm 12,5 µl ATP 20mM và đem ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó thêm 125 µl (100 mg/ml, 4 °C) đem ly tâm 5000 rpm trong 5 phút. Lượng phosphate vô cơ được giải phóng ra được xác định theo phương pháp của Fiske & Subbarow (1925). Lấy 50 µl phần dung dịch lớp trên, thêm vào 80 µl amonium molybdate 2,5%, 20µl stannous chloride 1% (santanous chloride được pha từ hỗn hợp $SnCl_2$: HCl: H_2SO_4 1N với tỷ lệ 1:10:25) và 900 µl nước cất, trộn đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau khi ủ lắc đều mẫu và đo độ hấp thụ ở bước sóng 720 nm. Mẫu trắng được chuẩn bị bằng cách thêm TCA trước khi thêm ATP. Phần trăm hoạt tính còn lại Ca^{2+}-ATPase của myoglobulin sau khi tái đông 3,6 và 9 lần so với mẫu không trichloroacetic axit tái đông.

Phụ lục 8

Bảng 8.1. Thang điểm cảm quan của sản phẩm nước ép trái cây đóng hộp

Tên chỉ tiêu	Điểm chưa có trọng lượng	Yêu cầu
Màu sắc	5	Màu sắc đặc trưng của sản phẩm.
	4	Màu sắc bình thường của sản phẩm.
	3	Ít đặt trưng.
	2	Không đặc trưng.
	1	Biến màu.
	0	Biến màu của sản phẩm hư hỏng.
Mùi vị	5	Mùi vị rất đặc trưng.
	4	Mùi vị của sản phẩm bình thường.

	3	Ít đặc trưng.
	2	Không đặc trưng.
	1	Có mùi vị lạ.
	0	Mùi vị của sản phẩm hư hỏng
Hình thái	5	Có lẫn bột qủa khi lắc phân tán đều.
	4	Vón nhẹ, khi lắc thì tan
	3	Vón nhẹ, lắc ít tan.
	2	Vón lắc không tan.
	1	Vón cục có tạp chất.
	0	Vón cục lớn, có tạp chất.

Bảng 8.2. Chỉ tiêu cảm quan và hệ số quan trọng của sản phẩm nước ép trái cây đóng hộp

Tên chỉ tiêu	**Hệ số quan trọng**	
	%	**Quy về 4**
1. Màu sắc	30	1,2
2. Mùi vị	50	2,0
3. Hình thái	20	0,8

Bảng 8.3. Thang điểm cảm quan của sản phẩm sữa chua

Tên chỉ tiêu	**Điểm chưa có trọng lượng**	**Yêu cầu**
Trạng thái	5	Sữa đông thành khối thống nhất, mịn màng không tách nước.
	4	Sữa đông thành khối ít mịn, không tách nước.

	3	Sữa và nước tách ra một phần nhỏ.
	2	Sữa không mịn, tách nước.
	1	Sữa và nước tách ra nhiều hoặc quá khô.
	0	Sữa không đông, không mịn.
Mùi	5	Mùi vị rất đặc trưng của sữa chua.
	4	Mùi thơm nhẹ đặc trưng của sữa chua.
	3	Mùi thơm nhẹ không đặc trưng của sữa chua.
	2	Mùi thơm nhẹ của sữa chua.
	1	Khó nhận biết được mùi sữa chua
	0	Có mùi lạ, nồng mùi đường
Vị	5	Chua vừa, ngọt vừa, vị đặc trưng của sữa chua
	4	Chua vừa, ngọt vừa
	3	Chua vừa, ngọt nhẹ hoặc chua nhẹ, ngọt vừa
	2	Chua, ít ngọt hoặc ít chua, ngọt
	1	Quá chua, ít ngọt hoặc ít chua, quá ngọt
	0	Không chua, quá ngọt
Màu sắc	5	Màu trắng sữa, sáng, mịn
	4	Màu trắng sữa, ít sáng, mịn
	3	Màu trắng sữa, ít sáng, ít mịn
	2	Màu trắng ngà, không sáng, không mịn
	1	Màu trắng ngà, ít đồng nhất
	0	Màu trắng ngà, không đồng nhất

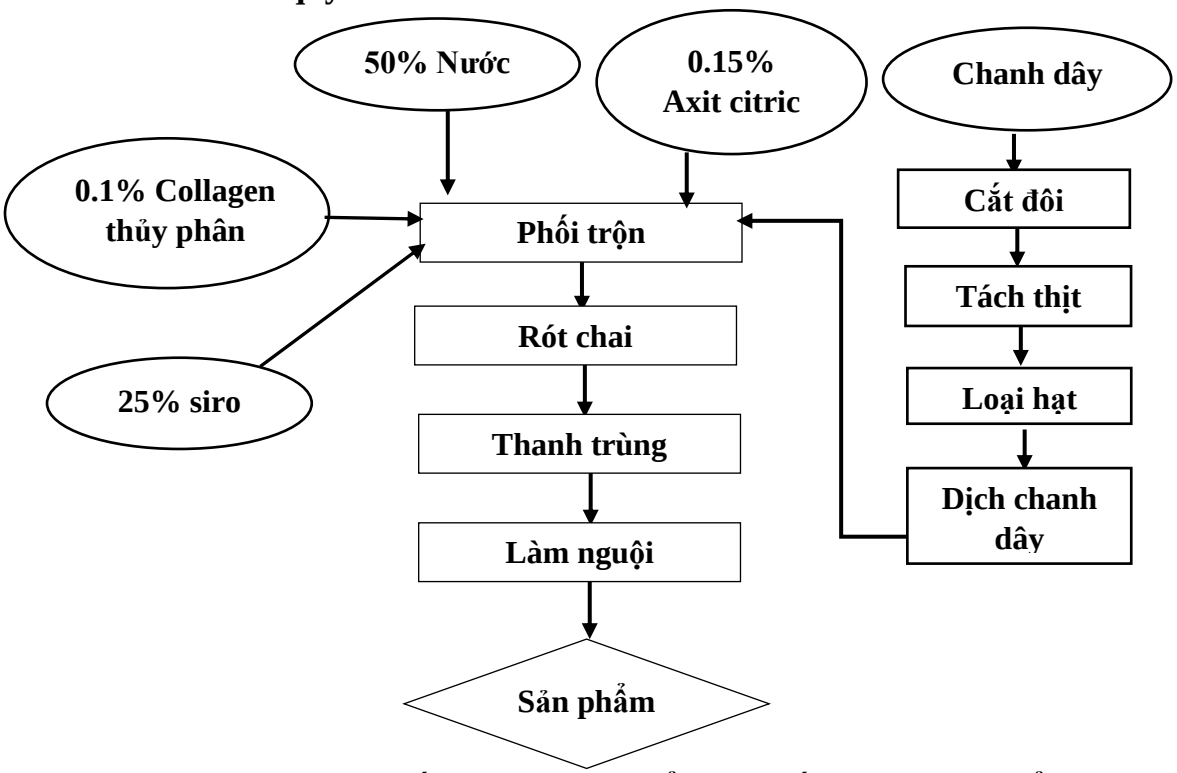
Bảng 8.4. Chỉ tiêu cảm quan và hệ số quan trọng của sản phẩm sữa chua

Tên chỉ tiêu	Hệ số quan trọng	
	%	Quy về 4
1. Trạng thái	40	1,6
2. Mùi	20	0,8
3. Vị	30	1,2
4. Màu sắc	10	0,4

Phụ lục 9

9.1. Quy trình sản xuất hoàn thiện sản phẩm nước uống chanh dây có bổ sung collagen

- **Sơ đồ quy trình**



Hình 9. 1. Quy trình sản xuất hoàn thiện sản phẩm nước uống chanh dây có bổ sung collagen

- **Thuyết minh quy trình**

+ Nguyên liệu chanh dây

Mục đích: Lựa chọn nguyên liệu chanh dây có chất lượng phù hợp để đảm bảo chất lượng của sản phẩm sau cùng, góp phần nâng cao hiệu quả sử dụng và giá trị kinh tế của nguyên liệu.

Thao tác: Lựa chọn những trái chanh dây ngắn quả (dáng tròn bầu) thì sẽ có nhiều thịt chanh dây hơn quả dài (dáng ống dài).

Chọn quả chanh dây tươi tốt. Tiến hành ngửi mùi ở phần cuối của trái, chọn những trái có mùi thơm ngọt và tươi (nếu tỏa mùi quá ít hoặc không có mùi là do trái chưa chín, ngược lại những trái chanh dây quá chín sẽ có mùi hơi chua kiểu lên men, tựa như mùi giấm hoặc mùi quá ngọt).

Lựa chọn những trái chanh dây mà vỏ không quá cứng cũng không quá mềm, khi dùng ngón tay ấn vào vỏ chanh dây, vỏ không bị lõm vào.

Yêu cầu: Nguyên liệu phải có chất lượng cảm quan tốt, độ chín phù hợp, không dập nát, hư hỏng.

+ Cắt đôi

Mục đích: Tách đôi quả chanh dây, tạo điều kiện thuận lợi cho công đoạn tiếp theo.

Thao tác: Tiến hành rửa sạch chanh dây, loại bỏ bụi bẩn. Dùng dao cắt đôi quả chanh dây theo chiều ngang, vết cắt phải dứt khoát

Yêu cầu: Không làm dịch quả chảy ra.

+ Tách thịt quả

Mục đích: Tách phần thịt quả ra khỏi phần vỏ.

Thao tác: Dùng dao cạo lấy hết phần thịt quả bên trong và chứa vảo thau

Yêu cầu: Lấy hết dịch quả, không cạo phạm phần vỏ quả vào phần dịch.

+ Loại hạt

Mục đích: Tách hạt ra khỏi phần dịch quả

Thao tác: cho toàn bộ dịch quả vừa tách ra chào vào rây có đường lỗ là 1x1mm. Thu phần dịch và loại bỏ phần hạt

Yêu cầu: Loại bỏ hết hạt trong dịch quả và không để sót cơm quả trong hạt.

+ Phối trộn

Mục đích: Tạo ra sản phẩm có chất lượng cảm quan và chất lượng tốt.

Thao tác: Tiến hành cho 50% nước, 0,15% axit citric, 25% siro và 0.1% collagen thủy phân tất cả tính theo dịch quả chanh dây và được khuấy đều.

Yêu cầu: Phối trộn theo đúng tỷ lệ.

+ Rót chai

Mục đích: Tạo ra các đơn vị sản phẩm.

Thao tác: Chai thủy tinh 250ml được rửa sạch, sấy khô, rót dung dịch nước chanh dây đã phối trộn và đun nóng ở 90 ^{o}C và để nguội đến 50 ^{o}C sau đó rót vào chai.

Yêu cầu: Để lại khoảng không trên đỉnh chai 10% thể tích chai

+ Thanh trùng

Mục đích: Nhằm tiêu diệt những vi sinh vật không mong muốn có trong sản phẩm, giúp kéo dài thời gian bảo quản sản phẩm.

Thao tác: Chuẩn bị nồi hấp, xếp chai lên xửng hấp của nồi, đậy kín nắp nồi và bật bếp. Thanh trùng ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 20 phút.

Yêu cầu: Thực hiện đúng thao tác khi thanh trùng.

+ Làm nguội

Mục đích: Ổn định giá trị dinh dưỡng và cảm quan của của sản phẩm.

Thao tác: Để sản phẩm nguội hẳn trước khi cho vào tủ lạnh.

Yêu cầu: Bảo quản sản phẩm nơi thoáng mát.

+ Đánh giá sản phẩm

Mẫu được phân tích thành phần dinh dưỡng và các chỉ tiêu vi sinh vật (Bảng 3.23; Bảng 3.24)

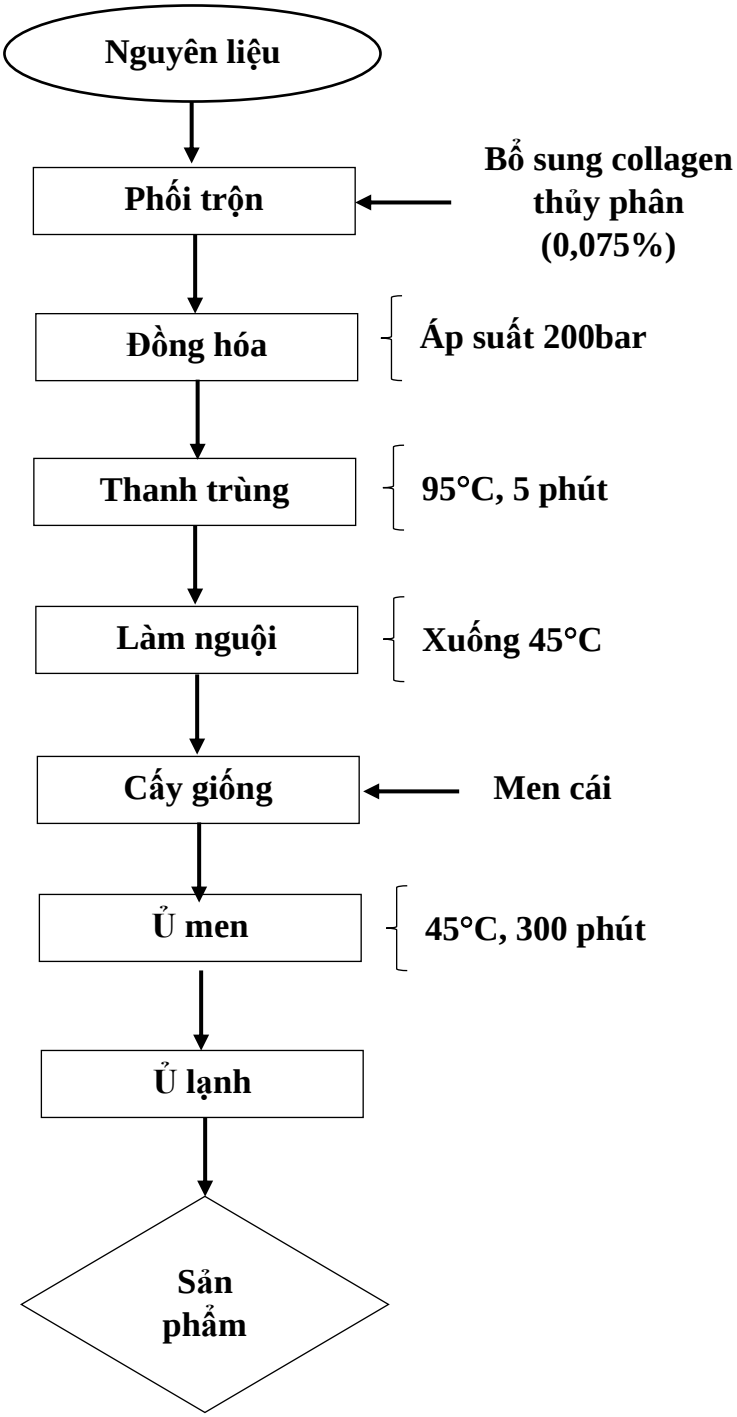
Bảng 9.1. Kết quả thành phần dinh dưỡng nước uống chanh dây có bổ sung collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng

STT	Chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả	Phương pháp thử
01	Protein	gN/100ml	**1,24**	Ref. AOAC 991.20
02	Lipid	g/100ml	**KPH (LOD=0,1)**	Ref.AOAC 948.22
03	Cacbohydrat	g/100ml	**16,3**	TCVN 4594:1988

Bảng 9.2. Kết quả chỉ tiêu vi sinh nước uống từ chanh dây có bổ sung collagen thủy phân

STT	Chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả	Phương pháp thử
01	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	CFU/ml	**Không phát hiện**	ISO 4833-1:2013
02	Tổng số vi sinh vật yếm khí	CFU/ml	**Không phát hiện**	TK ISO 15213:2003
03	*Coliforms*	CFU/ml	**Không phát hiện**	ISO 4832:2006
04	*Escherichia Coli*	MPN/ml	**0**	ISO 16649-3:2015

9.2. Quy trình chế biến sữa chua bổ sung collagen thủy phân



Hình 9.2. Sơ đồ quy trình chế biến sữa chua bổ sung collagen

Phụ lục 10

HÌNH ẢNH THIẾT BỊ DÙNG TRONG THÍ NGHIỆM



Máy chưng cất đạm



Tủ sấy



Kho đông



Bể ổn nhiệt lạnh Alpha RA24



Bể ổn nhiệt



Lò nung



Cân điện tử 2 số



bộ chiết chất béo Soxhlet SER148/6(Velp, Italia)



Cân điện tử 4 số



Máy đo pH



Máy ly tâm



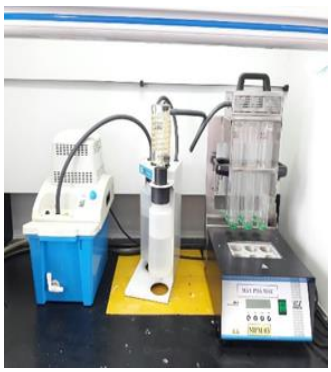
Thiết bị đồng hóa (PT 1300D



Hệ thống sắc ký lọc gel HPLC Agilent 1100



Hệ thống sắc ký HPLC Agilent 1200



Thiết bị phá mẫu



Hệ thống lọc màng QuixStand Benchtop System