

## LOẠI BỎ PHI COLLAGEN TRÊN DA CÁ NGỪ VÂY VÀNG BẰNG DUNG DỊCH NaOH

Nguyễn Công Bình\*, Trần Phương Kiều

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

\*Email: binhnc@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 10/7/2019; Ngày chấp nhận đăng: 06/9/2019

### TÓM TẮT

Da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*) được lấy từ quy trình chế biến cá ngừ fillet đông lạnh làm nguyên liệu để sản xuất collagen. Để tách chiết collagen từ da cá thì việc loại bỏ phần phi collagen là rất quan trọng. Trong nghiên cứu này, phi collagen trên da cá ngừ vây vàng được loại bỏ bằng dung dịch NaOH với các điều kiện là nồng độ NaOH 1N, thời gian xử lý NaOH 28 giờ, tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) 5/1. Tỷ lệ hydroxyproline/protein (hyp/protein) là 9,73% và hàm lượng chất béo còn lại là 5,7% so với chất khô.

*Từ khóa:* Collagen, phi collagen, hydroxyproline, da cá ngừ vây vàng.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

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 [1]. Có hơn 29 loại collagen đã được xác định trong các mô khác nhau; mỗi loại có trình tự amino axit và tính chất sinh lý khác nhau. Trong số 29 loại này, collagen loại I là dạng phổ biến nhất [2]. Collagen là chất giàu hydroxyproline, gồm ba chuỗi polypeptide xoắn vào nhau có đường kính khoảng 1,5 nm và chiều dài 300 nm [3].

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 hydroxyproline [4]. 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 [5].

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. Trong những năm gần đây, sự bùng nổ về các bệnh bò điên, lở mồm long móng và cúm da 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, collagen thu nhận từ lợn và một số động vật khác không được giết mổ theo quy định của một vài tôn giáo thì không được sử dụng trong các 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 vẩy, 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 cho các sản phẩm có giá trị thấp 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 [6].

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. Gelatin chế biến từ da cá được sử dụng đối với các sản phẩm thực phẩm cần tăng khả năng tạo gel, độ kết dính, tính ổn định, tạo màng, thay thế chất béo hoặc tạo bột xốp như kẹo dẻo, kẹo marshmallow [7].

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 xử lý khác nhau. Dung dịch NaOH loãng hoặc kết hợp giữa NaOH và một số dung môi không phân cực như alcohol, n-hexan thường được dùng để loại bỏ chất béo.

Cơ sở để lựa chọn dung dịch NaOH xử lý phi collagen trên da cá ngừ vây vàng là dung dịch NaOH có khả năng loại bỏ các protein không phải là collagen, lipid và khoáng trên da cá. Tuy nhiên, tùy thuộc vào thành phần hóa học và tính chất của da cá khác nhau mà chọn nồng độ NaOH, thời gian ngâm và tỷ lệ dung dịch ngâm so với da cá khác nhau. Đối với da cá bơn ô liu (olive flounder), black rockfish, sea bass, red sea bream thì xử lý bằng NaOH 0,1N, thời gian ngâm là 24 giờ, nhiệt độ ngâm 5 °C và tỷ lệ dung dịch ngâm so với nguyên liệu 20 lần (v/w) [8]. Da cá tạp thì sử dụng nồng độ NaOH 0,1N, tỷ lệ dung dịch ngâm là 10:1 (v/w), thời gian ngâm 3 ngày và nhiệt độ ngâm là 4 °C [9]. Da cá tra Việt Nam thì da được xử lý với NaOH 0,2N, tỷ lệ dung dịch ngâm 1/10 (w/v), thời gian ngâm 20 giờ [10]. Theo Cho *et al.* (2005), 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 °C, sau đó trích ly gelatin bằng nước ở nhiệt độ 58,15 °C [11]. Nhưng theo Woo *et al.* (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 °C [12]. Theo Liu *et al.* (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 [6].

Hiện nay, hầu hết các nghiên cứu về tách chiết collagen trên da cá đều sử dụng NaOH để loại bỏ protein không phải là collagen. 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 [13, 14]. Nhưng thành phần lipid còn lại trên da cá rất dễ loại bỏ ra khỏi dịch collagen thủy phân bằng các phương pháp như làm lạnh, ly tâm hoặc lọc, còn thành phần protein không phải là collagen rất khó loại bỏ ra khỏi collagen. Các nghiên cứu về tách chiết collagen hiện nay chỉ nêu ra điều kiện xử lý NaOH sau đó dùng axit hoặc enzyme để thủy phân, dịch thủy phân thu được đem ly tâm, sau đó kết tủa protein trong dịch ly tâm và xác định collagen trong kết tủa thu được. Điều này chưa nói lên được thành phần phi collagen mà chủ yếu là protein không phải là collagen đã loại bỏ khi xử lý bằng NaOH và trong phần kết tủa có sự hiện diện của protein không phải là collagen. Vì vậy, nghiên cứu này cho thấy khả năng loại bỏ thành phần phi collagen trên da cá ngừ vây vàng đặc biệt là thành phần protein không phải là collagen.

## **2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Nguyên liệu**

Da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*) được lấy từ phụ phẩm của quy trình sản xuất cá ngừ fillet đông lạnh tại công ty TNHH J.K.FISH Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa. Da cá được cấp đông ở nhiệt độ -40 °C sau đó được bảo quản trong thùng cách nhiệt để chuyển về phòng thí nghiệm. Tại phòng thí nghiệm, da cá được rã đông, rửa, loại bỏ vây, phần thịt còn dính trên da và cắt thành từng miếng với kích thước 1 × 1 cm. Da sau khi cắt nhỏ được rửa sạch bằng nước lạnh 10 °C, sau đó trộn đều, đóng gói trong túi PE hàn kín miệng, đem cấp đông ở nhiệt độ -40 °C trong 30 phút, tiếp đó bảo quản ở nhiệt độ -20 °C. Axit amin chuẩn và hydroxyproline chuẩn (sigma-Aldrich), các hóa chất khác đủ tiêu chuẩn phân tích. Thí

nghiệm được thực hiện tại Trung tâm Thí nghiệm Thực hành - Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh từ tháng 11/2018 đến 6/2019.

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### *2.2.1. 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.

### *2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen trong da cá ngừ vây vàng*

Khối lượng da cá trong mỗi mẫu thí nghiệm là 5 g. 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 0,1N; 0,2N; 0,4N; 0,6N; 0,8N; 1,0N; 1,2N và 1,4N. 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 °C. 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.

### *2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen trong da cá ngừ vây vàng*

Khối lượng da cá trong mỗi mẫu thí nghiệm là 5 g. 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 nồng độ NaOH được xác định ở mục 2.2.2. Thời gian ngâm NaOH lần lượt là 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 và 32 giờ. Các yếu tố cố định là: tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá 10/1 (v/w) và nhiệt độ ngâm là 4 °C. Chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm: Tỷ lệ hyp/protein (%) lớn nhất và hàm lượng lipid (%) tính theo chất khô là nhỏ nhất.

### *2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/nguyên liệu đến quá trình loại bỏ phi collagen trong da cá ngừ vây vàng*

Khối lượng da cá trong mỗi mẫu thí nghiệm là 5 g. 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 nồng độ NaOH và thời gian ngâm NaOH được xác định ở mục 2.2.2 và 2.2.3. 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 và nhiệt độ ngâm là 4 °C. 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. Phương pháp phân tích**

### *2.3.1. Phân tích hợp chất cơ bản*

Độ ẩm được xác định bằng phương pháp sấy ở 100-105 °C [15], xác định lipid bằng phương pháp Soxhlet [16], hàm lượng protein thô được xác định thông qua nitrogen tổng bằng phương pháp Kjeldahl ( $N \times 6.25$ ) và xác định tro tổng số bằng phương pháp nung ở nhiệt độ 550-600 °C [17].

### *2.3.2. Phân tích amino axit*

Cân chính xác khoảng 0,1 gam mẫu vào ống COD, thêm vào 5 mL HCl 6N và đem ủ ở nhiệt độ 110 °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 25mL, 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  $\mu\text{m}$ , dịch qua màng đem đi tạo dẫn xuất với 4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulphonyl chloride (DABS-C1) [18] 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 5 mL NaOH 4N và sục khí Argon (Ar) trong 3 phút với tốc độ 10 mL/phút sau đó đem ủ ở nhiệt độ 120 °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 25 mL bằng NaOH 0,01N, lọc qua màng syringe 0,45  $\mu\text{m}$ . Dịch lọc qua màng đem đi tạo dẫn xuất với 4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulphonyl chloride (DABS-C1) [18] và phân tích HPLC

Chương trình chạy sắc ký: Hệ thống HPLC Agilent 1100, cột ACE C18 (4,6  $\times$  250 mm), đầu dò UV 250 nm, tốc độ dòng pha động là 1 mL/phút tại nhiệt độ 40 °C. Pha động 20% Acetonitril (ACN): 80% đệm 0,1% axit trifluoroacetic.

### 2.3.3. Xác định hàm lượng collagen

Xác định collagen thông qua xác định hydroxyproline [19]. Hàm lượng collagen được tính theo công thức

$$x = m \cdot k$$

Trong đó:  $x$ : Khối lượng collagen;  $m$ : khối lượng của hydroxyproline;  $k$ : hệ số phụ thuộc vào hàm lượng hydroxyproline  $k = \frac{100}{a}$  [20];  $a$ : 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 [18]

Cân chính xác khoảng 0,1 gam mẫu vào ống COD, thêm vào 5 mL HCl 6N và đem ủ 110 °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  $\mu\text{m}$ , dịch qua màng đem đi tạo dẫn xuất với 4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulphonyl chloride (DABS-C1) [18] và phân tích HPLC. Chương trình chạy sắc ký: hệ thống HPLC Agilent 1100, cột ACE C18 (4,6  $\times$  250 mm), đầu dò UV 465 nm, tốc độ dòng pha động là 1 mL/phút tại nhiệt độ 40 °C. Chạy đẳng dòng, pha động đệm acetate/ACN (75/25).

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

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 18 với mức ý nghĩa  $p < 0,05$ . Vẽ đồ thị bằng phần mềm Microsoft excel 2013.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. 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 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 [21].

Bảng 1. Bảng thành phần hóa học của da cá ngừ vây vàng

Độ ẩm (%)	Protein* (%)	Collagen* (%)	Lipid* (%)	Tro* (%)
63,59 ± 0,78	87,94 ± 0,12	69,68 ± 0,07	11,07 ± 0,05	0,99 ± 0,02

\* Tính theo hàm lượng chất khô.

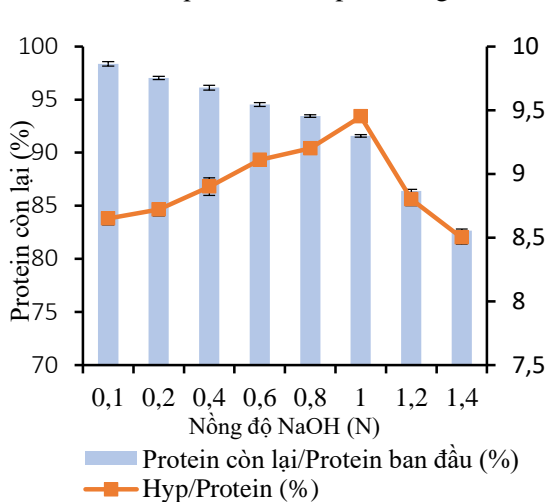
Hàm lượng tro trong da cá ngừ vây vàng rất thấp ( $0,36\% \pm 0,02\%$ ) vì trong lúc xử lý mẫu đã loại hết phần vẩy cá. Hàm lượng lipid thấp ( $4,03\% \pm 0,05\%$ ) vì cá ngừ vây vàng là cá sống ở tầng nổi, di chuyển nhiều. So sánh hàm lượng protein tổng và hàm lượng collagen nhận thấy hàm lượng collagen 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 protein không phải là collagen và lipid. Theo nghiên cứu của Cho *et al.* (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 về độ ẩm và chất đạm không có sự khác biệt quá lớn. Tuy nhiên, hàm lượng lipid có sự khác biệt bởi nguyên liệu trong nghiên cứu thì cá ngừ vây vàng trong thí nghiệm được đánh bắt ở vùng biển Việt Nam, ẩm hơn so với vùng biển của Hàn Quốc, nên cá hoạt động nhiều và ít tích mỡ hơn, vì vậy lượng lipid trong da cá ngừ vây vàng ít hơn. Ngoài ra, hàm lượng tro tổng của da cá trong nghiên cứu của Cho *et al.* (2005) cao hơn, sự khác biệt này là do không loại bỏ phần vẩy khi xử lý nguyên liệu [11].

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

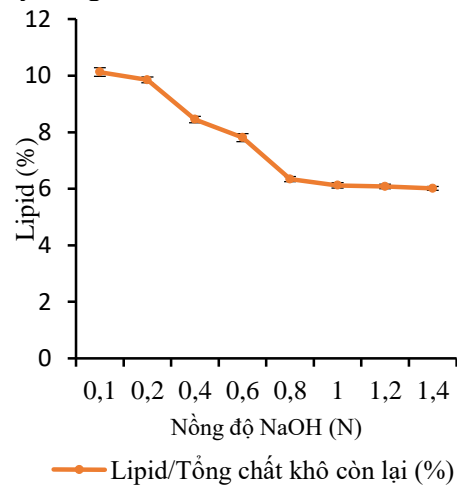
### 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen trong da cá ngừ vây vàng

Kiểm 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 bỏ phi collagen được trình bày trong Hình 1 và 2.



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến quá trình loại bỏ lipid

Từ Hình 1 và 2 cho thấy khi nồng độ NaOH thay đổi từ 0,1N đến 1,0N thì tỷ lệ hyp/protein càng tăng và tỷ lệ lipid càng giảm. Tỷ lệ hyp/protein tăng từ 8,65% đến 9,45%; trong khi đó, tỷ lệ lipid giảm từ 10,13% xuống còn 6,12%. Khi tiếp tục tăng nồng độ NaOH từ 1,0N đến 1,4N thì tỷ lệ hyp/protein giảm xuống 8,5% và tỷ lệ lipid tiếp tục có xu hướng 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 tỷ lệ lipid đạt mức thấp nhất ở nồng độ NaOH là 1,0N. Kết quả xử lý số liệu cho thấy nếu tăng nồng độ NaOH từ 1,0N đến 1,4N là không có ý nghĩa ở cả tỷ lệ hyp/protein và tỷ lệ lipid/chất khô còn lại.

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  $\text{Na}^+$  tạo thành muối và trong điều kiện có nước, nước có thể tác dụng với nhóm gốc có mang điện trong kết cấu protide và do sự có mặt của ion  $\text{Na}^+$  hình thành tác dụng hợp nước phụ của collagen 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 [22]. Dung dịch NaOH có khả năng khử các hợp chất nitơ phi protein vì collagen có tính lưỡng tính.

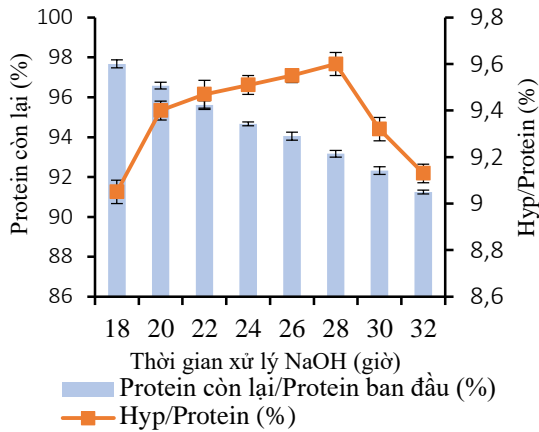
Dưới tác dụng NaOH, collagen bị cắt đứt các liên kết peptit làm phá vỡ liên kết trong collagen, ngoài ra NaOH khử đi các protein yếu, mucopolysaccharide và một số sắc tố trong nguyên liệu dẫn đến hàm lượng protein giảm dần và cho tỷ lệ hyp/protein tăng dần. Khi ngâm da cá trong dung dịch NaOH, thì có 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 hấp 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 [23].

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 1,2N và 1,4N 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) [18] trích ly gelatine từ da cá tra và kết quả nghiên cứu của Phanat *et al.* (2005) [24] khi trích ly collagen từ da và xương cá hồng. Theo Liu *et al.* (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 [13].

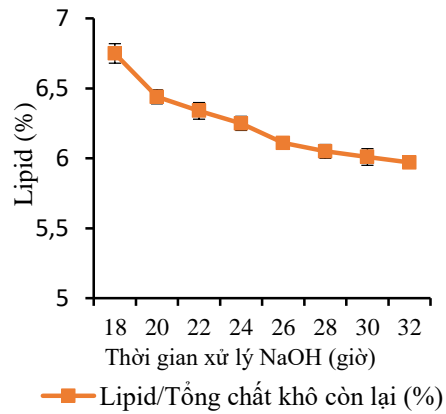
Chính vì vậy, khi sử dụng NaOH xử lý da cá làm cho các protein phi collagen bị thủy phân và sau khi chúng bị loại bỏ sẽ thu được chế phẩm da cá giàu collagen. Từ kết quả trên, nhóm tác giả chọn dung dịch NaOH ở mức nồng độ là 1,0N sẽ cho tỷ lệ hyp/protein là cao nhất và tỷ lệ lipid là thấp nhất, chứng tỏ độ tinh sạch phi collagen cho da cá là tốt nhất.

### **3.3. 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 chế phẩm còn nhiều tạp chất. Do vậy phải thực hiện khảo sát thời gian ngâm cần thiết để chế phẩm có lượng tạp chất là thấp nhất. Kết quả khảo sát thời gian ngâm NaOH được thể hiện ở Hình 3 và 4.



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian xử lý NaOH đến quá trình loại bỏ lipid

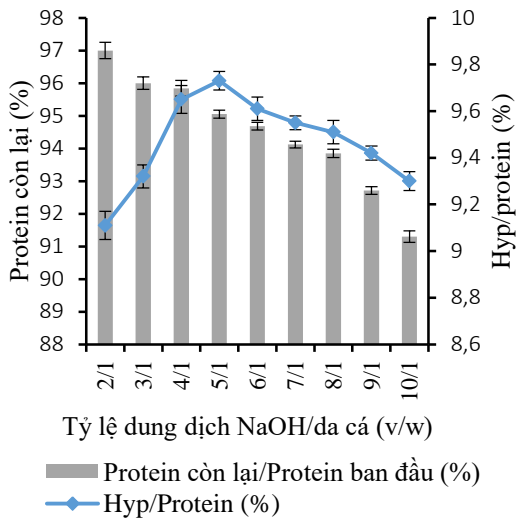
Từ Hình 3 và 4 cho thấy thời gian xử lý càng dài thì hiệu suất khử tạp chất càng lớn. Tuy nhiên, nếu ngâm thời gian quá dài thì lượng collagen trong da cá lại giảm đáng kể. Cụ thể, thời gian xử lý NaOH từ 18 giờ đến 28 giờ thì tỷ lệ hyp/protein có xu hướng tăng lên đến 9,6%, hàm lượng lipid giảm đến 6,05%. Khi tiếp tục tăng thời gian ngâm trong dung dịch kiềm lên đến 32 giờ thì tỷ lệ hyp/protein lại giảm xuống còn 8,8% và tỷ lệ 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 28 giờ đến 34 giờ là không có ý nghĩa. Lý do của việc tăng hay giảm hàm lượng collagen là do thời gian ngâm càng lâu thì dung dịch kiềm sẽ bị 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 [8]. Theo Cho *et al.* (2005), điều kiện tối ưu để xử lý da cá ngừ vây vàng ở Hàn Quốc với thời gian xử lý 2,87 ngày [11]. Tuy nhiên, theo Woo *et al.* (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 [12].

Từ Hình 2 cho thấy nếu xử lý bằng dung dịch NaOH ở mức thời gian là 28 giờ sẽ cho tỷ lệ hyp/protein cao nhất và tỷ lệ lipid thấp nhất. Vì vậy, nhóm tác giả chọn thời gian xử lý bằng NaOH ở mức 28 giờ sẽ cho độ tinh sạch phi collagen trong da cá là tốt nhất.

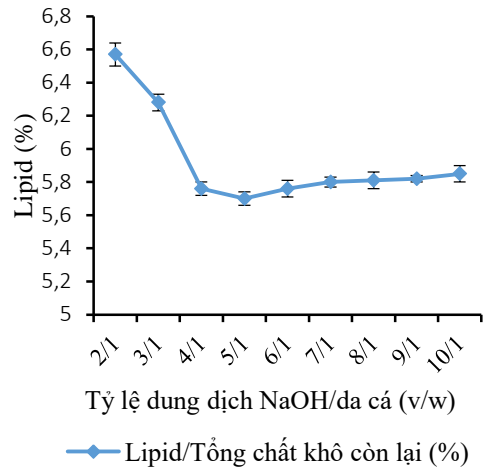
### 3.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá đến quá trình loại bỏ phi collagen

Tỷ lệ nguyên liệu so với dung dịch kiềm cũng là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình loại bỏ 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 5 và 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. Tỷ lệ 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 với khoảng tin cậy 95%.



Hình 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w)



Hình 6. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) đến lipid

Tỷ lệ dung dịch NaOH/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. Ở tỷ lệ dung dịch kiềm thấp hơn 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, nếu lượng dung dịch kiềm quá cao sẽ thủy phân cả collagen làm giảm hiệu quả mong muốn.

Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Woo *et al.* (2008) [25], da ngừ vây vàng Hàn Quốc được xử lý với dung dịch NaOH có nồng độ 0,5N đến 1,3N, với tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch NaOH là 1/5 (w/v) ở 9 °C; phù hợp với kết quả nghiên cứu của Cho *et al.* (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 °C [11].

Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Woo *et al.* (2008) [25], 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 °C [12]. Từ những nhận định nêu trên, nhóm tác giả chọn tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá là 5/1. Thành phần axit amin và thành phần hóa học của da cá ngừ vây vàng (*Thunnus albacares*) sau khi loại bỏ phi collagen được trình bày ở Bảng 2 và 3.

Kết quả trong Bảng 1 và 3 cho thấy hàm lượng protein trong da cá nguyên liệu trước và sau khi xử lý lần lượt là 87,94% và 92,54%. Hàm lượng chất béo đã giảm đi đáng kể từ 11,07% xuống còn 5,76%. Hàm lượng tro tăng lên từ 0,99% lên 1,6%. Hàm lượng collagen tăng đáng kể từ 69,68% lên 85,58%. Điều này có thể giải thích là khi xử lý da cá ngừ vây vàng bằng dung dịch NaOH thì hàm lượng lipid, một số chất màu và protein không phải là collagen bị loại bỏ đáng kể nhưng hàm lượng khoáng tăng lên là do hàm lượng chất khô bị mất. Kết quả này cho thấy, khi xử lý da cá ngừ vây vàng bằng NaOH thì collagen không bị hòa tan. Vì vậy collagen không bị mất đi trong quá trình xử lý.



Bảng 2. Bảng phân tích axit amin trên da cá ngừ vây vàng đã xử lý phi collagen

STT	Axit amin	Tỷ lệ (%)	STT	Axit amin	Tỷ lệ (%)
1	Arginine	1,6	12	Tryptophane	0,1
2	Serine	1,0	13	Valine	0,1
3	Axit aspartic	1,7	14	Phenylalanine	1,8
4	Axit glutamic	2,1	15	Cysteine	0,9
5	Hydroxyproline	10,3	16	Tyrosine	2,7
6	Glycine	23,4	17	Isoleucine	0,5
7	Threonine	0,3	18	Leucine	2,2
8	Alanine	5,1	19	Ornithine	0,0
9	Axit aminobutyric	0,5	20	Lysine	0,1
10	Proline	20,3	21	Histidine	0,2
11	Methionine	25,2			

Bảng 3. Thành phần hóa học của da cá sau khi xử lý NaOH

Độ ẩm (%)	Protein* (%)	Collagen* (%)	Lipid* (%)	Tro* (%)
77,69 ± 0,02	92,54 ± 0,03	85,58 ± 0,06	5,76 ± 0,05	1,6 ± 0,07

\* Tính theo hàm lượng chất khô.

Kết quả Bảng 2 cho thấy, trong collagen của da cá ngừ vây vàng, hàm lượng của các axit amin như hydroxyproline, glycine, proline và methionine chiếm phần lớn. Điều này là phù hợp với cấu trúc collagen type I như đã nêu ở phần đặt vấn đề. Điều này cũng chứng minh được rằng việc loại bỏ phi collagen bằng dung dịch NaOH thì rất ít ảnh hưởng đến hàm lượng collagen.

#### 4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, phi collagen trên da cá ngừ vây vàng được loại bỏ bằng dung dịch NaOH với các điều kiện là nồng độ NaOH 1N, thời gian xử lý NaOH 28 giờ, tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá (v/w) 5/1. Tỷ lệ hydroxyproline/protein là 9,73% và hàm lượng chất béo còn lại là 5,7% so với chất khô.

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy sử dụng dung dịch NaOH để loại bỏ phi collagen trên da cá ngừ vây vàng là phương pháp hiệu quả. Từ kết quả này, có thể nghiên cứu xử lý phi collagen trên các loại da khác nhau để sản xuất collagen và collagen thủy phân.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này do Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 82/HĐ-DCT.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Di Lullo G.A., Sweeney S. M., Körkkö J., Ala-Kokko L., San Antonio J.D. - 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) (2002) 4223-4231.

2. Hulmes D.J.S. - Collagen diversity, synthesis and assembly, Springer (2008) 15-47
3. Jenkins C.L., Raines R.T. - Insights on the conformational stability of collagen, *Natural Product Reports* **19** (1) (2002) 49-59.
4. Silvipriya K.S., Krishna Kumar K., Bhat A.R., Dinesh Kumar B., John A., Lakshmanan P. - Collagen: Animal sources and biomedical application, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **5** (3) (2015) 123-127.
5. Buehler M.J. - Nature designs tough collagen: Explaining the nanostructure of collagen fibrils, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** (33) (2006) 12285-12290.
6. Liu D., Zhang X., Li T., Yang H., Regenstein J.M., Zhou P. - Extraction and characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), *Food Bioscience* **9** (2015) 68-74.
7. Baziwane D., He, Q. - Gelatin: The Paramount Food Additive Gelatin, *Food Reviews International* **19** (4) (2003) 423-435.
8. Cho J.K., Jin Y.G., Rha S.J., Kim S.J., Hwang J.H. - Biochemical characteristics of four marine fish skins in Korea, *Food Chemistry* **159** (2014) 200-207.
9. Muralidharan N., Jeya Shakila R., Sukumar D., Jeyasekaran G. - Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization, *Journal of Food Science and Technology* **50** (6) (2013) 1106-1113.
10. Huyen T.T., Tuan, N.A. - Isolation collagen from catfish skin (*Pangasius hypophthalmus*) by chemical methods, *Journal of Fisheries Science and Technology* **2** (2012) 31-36.
11. Cho S.M., Gu Y.S., Kim S.B. - Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins, *Food Hydrocolloids* **19** (2) (2005) 221-229.
12. Woo J.W., Yu S.J., Cho S.M., Lee Y.B., Kim S.B. - Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin, *Food Hydrocolloids* **22** (5) (2008) 879-887.
13. Liu D., Wei G., Li T., Hu J., Lu N., Regenstein J.M., Zhou P. - Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin, *Food Chemistry* **172** (2015) 836-843.
14. Wang J., Pei X., Liu H., Zhou D. - Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), *International Journal of Biological Macromolecules* **106** (2018) 544-550.
15. AOAC, official method 950.46. Moisture in Raw and Processed Meats, in: *Official methods of analysis of AOAC international*, AOAC international Gaibersburg, MD, USA, 2000.
16. AOAC, official method 960.39. Fat (crude) or ether extract in meat, in: *Official methods of analysis of AOAC international*, 19<sup>th</sup> ed., AOAC international Gaibersburg, MD, USA, 2012.
17. AOAC, official method 920.153. Ash in meat and meat product, in: *Official methods of analysis of AOAC international*, AOAC international Gaibersburg, MD, USA, 2007.

18. Stocchi V., Palma F., Piccoli G., Biagiarelli B., Magnani M., Masat L., Cucchiaroni L. - Analysis of amino acids as DABS-derivatives with a sensitivity to the femtomole level using RP-HPLC narrow-bore columns, *Amino Acids* **3** (3) (1992) 303–309.
19. Woessner J.F. - The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **93** (2) (1961) 440-447.
20. Boran G., Regenstein J.M. - Optimization of gelatin extraction from silver carp skin, *Journal of Food Science* **74** (8) (2009) 432-441.
21. Quỳnh N.Đ., Đào N.L.A. - Study on extraction of gelatin from skin of catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) according to new method, *Can Tho University Journal of Science* **40** (2015) 47-52.
22. Shoulders M.D., Raines R.T. - Collagen structure and stability, *Annual Review of Biochemistry* **78** (1) (2009) 929-958.
23. Avila Rodríguez M.I., Rodríguez Barroso L.G., Sánchez M.L. - Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications, *Journal of Cosmetic Dermatology* **17** (1) (2018) 20-26.
24. Phanat K., Soottawat B., Wonnop V., Hideki K. and Fereidoon S. - Isolation and characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*), *Food Chemistry* **119** (2010) 1519–1526.
25. Woo J. W., Yu S. J., Cho S. M., Lee Y. B. & Kim S. B. - Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin, *Food Hydrocoll* **22** (2008) 879–887.

#### ABSTRACT

##### THE REMOVAL OF NON-COLLAGEN COMPOSITION IN YELLOWFIN TUNA SKIN BY NaOH SOLUTION

Nguyen Cong Binh\*, Tran Phuong Kieu  
*Ho Chi Minh City University of Food Industry*  
\*Email: binhnc@hufi.edu.vn

Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin, a by-product from the processing of frozen tuna fillet, can be used as raw material for collagen production. The removal of non-collagen composition in fish skin is very important in the extraction process of collagen. In this study, non-collagen on yellowfin tuna skin was removed with NaOH solution under the conditions of 1N NaOH concentration, 28-hours NaOH treatment time, NaOH/fish skin ratio (v/w) 5/1. The ratio of hydroxyproline/protein in the obtained collagen was 9.86%. The remaining fat content was 5.6% compared to dry matter.

*Keywords:* Collagen, non-collagen, hydroxyproline, yellowfin tuna skin.