

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



NGUYỄN CÔNG BÌNH

TÓM TẮT LUẬN ÁN
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 BÌNH

TÓM TẮT LUẬN ÁN

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

A. PHẦN MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Ngành công nghiệp chế biến thủy sản ở Việt Nam đang phát triển mạnh mẽ dẫn đến lượng phụ phẩm thải ra từ ngành công nghiệp này rất lớn. Trong quy trình sản xuất cá fillet, lượng phụ phẩm chiếm khoảng 50 - 70%, bao gồm da, xương, đầu, vây, vảy 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 quy trình sản xuất collagen thủy phân, công đoạn loại bỏ phi collagen, thủy phân cũng như tinh sạch và phân đoạn các peptide collagen là những công đoạn quan trọng ảnh hưởng quyết định đến hiệu suất thu hồi và chất lượng collagen thủy phân. Đến nay, việc loại bỏ phần phi collagen trên nguyên liệu, dung dịch kiềm thường được sử dụng nhưng vẫn thiếu thông tin về tỷ lệ phi collagen đã loại bỏ. Việc lựa chọn enzyme và tối ưu các điều kiện thủy phân collagen từ da cá ngừ vây vàng còn rất hạn chế. Bên cạnh đó để tinh sạch và phân đoạn collagen thủy phân từ dịch trích thô, kỹ thuật siêu lọc có nhiều ưu điểm nổi bật như ít tốn chi phí năng lượng, thân thiện với môi trường và tính chất của các peptide collagen thu được có hoạt tính tốt hơn khi so sánh với những kỹ thuật tinh sạch khác.

Từ những cơ sở trên, luận án này sẽ nghiên cứu qui luật ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ trong quá trình xử lý phi collagen, lựa chọn enzyme cũng như điều kiện tối ưu các thông số trong quá trình thủy phân collagen bằng enzyme đến độ thủy phân và hiệu suất thu hồi collagen. Các phân đoạn collagen thủy phân trong dịch thủy phân được phân tách và khảo sát tính chất của nó. Bên cạnh đó, kỹ thuật tinh sạch dịch collagen thủy phân từ da cá ngừ vây vàng bằng kỹ thuật siêu lọc cũng được khảo sát. Các phân đoạn collagen thủy phân sẽ được đem xác định các tính chất công nghệ và thử nghiệm ứng dụng trong sản xuất thực phẩm.

2. Mục tiêu của luận án

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.

3. Những đóng góp của luận án

Nghiên cứu đã xác định được 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.

Nghiên cứu đã 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 fillet.

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.

4. Bố cục của luận án

Luận án có 146 trang, 22 bảng, 53 hình và 138 tài liệu tham khảo, bao gồm phần mở đầu; Chương 1: Tổng quan; Chương 2: Phương pháp nghiên cứu; Chương 3: Kết quả và thảo luận.

B. PHẦN NỘI DUNG

1. Tổng quan

Phần tổng quan của luận án đã trình bày tóm tắt về :Tình hình khai thác và chế biến cá ngừ vây vàng; Collagen và collagen thủy phân; Tính chất và ứng dụng của collagen thủy phân; Các phương pháp tách chiết và tinh sạch collagen thủy phân; Các yếu tố ảnh hưởng trong công nghệ lọc màng; Những vấn đề tồn tại trong nghiên cứu về thu nhận và tính chất của collagen thủy phân; Hướng nghiên cứu và nội dung nghiên cứu của luận án.

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 fillet đông lạnh tại công ty TNHH J.K.FISH Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa. Da cá được thu nhận và vận chuyển theo sơ đồ hình Hình 2.1, xử lý và bảo quản theo sơ đồ Hình 2.2. Nguyên liệu chanh dây (*Passiflora 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 vẹn, 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

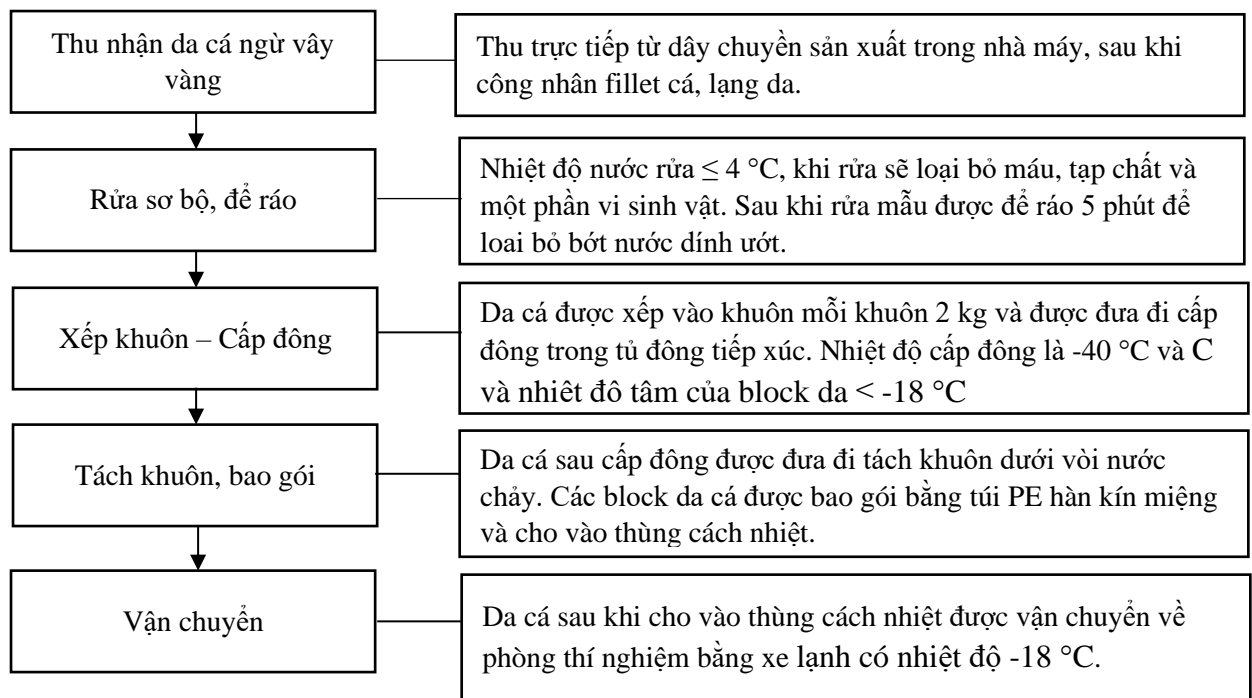
Thiết bị sử dụng cho nghiên cứu

Đề tài đã sử dụng các thiết bị sau: Máy cắt 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 (Mettler, 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); nhót kế rotor (SHEN, Anh); máy ly tâm lạnh (MERMLE, Đức); Tủ sấy (Mettler, 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, diện tích màng lọc 0,48 m².

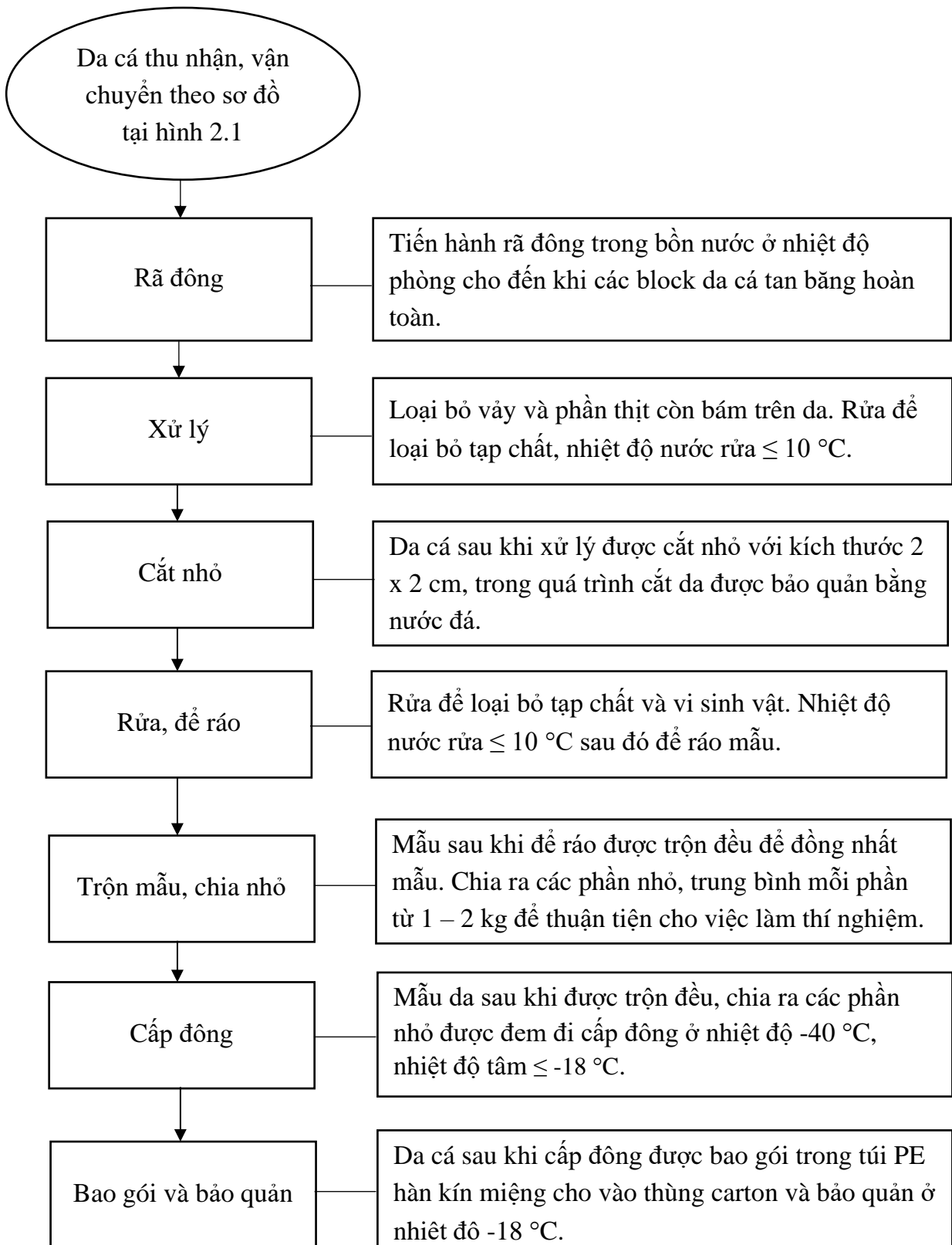
Hóa chất sử dụng cho nghiên cứu

Các enzyme sử dụng bao gồm alcalase (2.5L PF), flavourzyme (500MG) (Novozymes, Đan Mạch) và enzyme pepsin (RM712,10.000 NF U/mg) (Himedia, Ấn Độ).

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 (H₃BO₃) (Merck, Đức); axit amin chuẩn, hydroxyproline chuẩn, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), axit ascorbic, sắt (II) sunfat (FeSO₄), 1,10-phenanthroline, H₂O₂, 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.



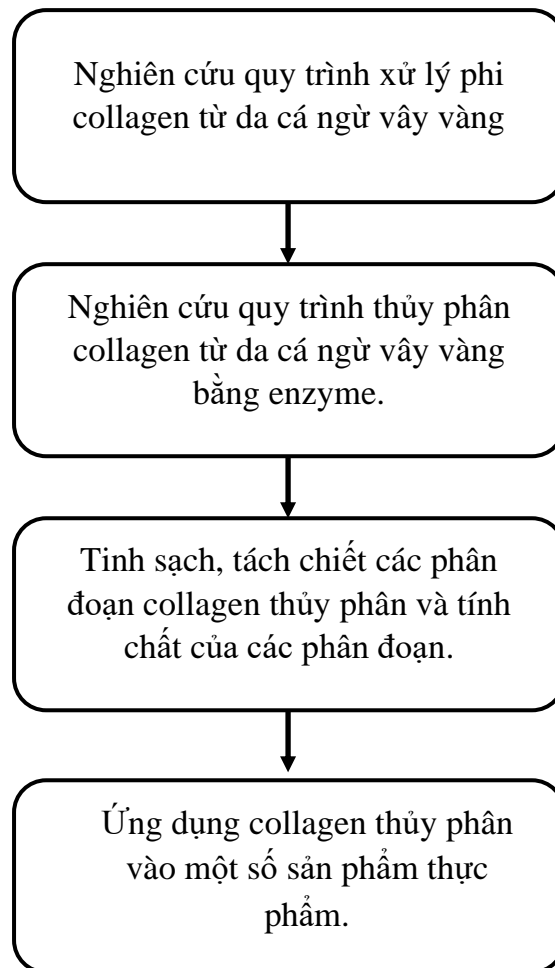
Hình 2.1. Sơ đồ thu nhận, vận chuyển da cá ngừ vây vàng



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

2.3. Phương pháp bố trí thí nghiệm

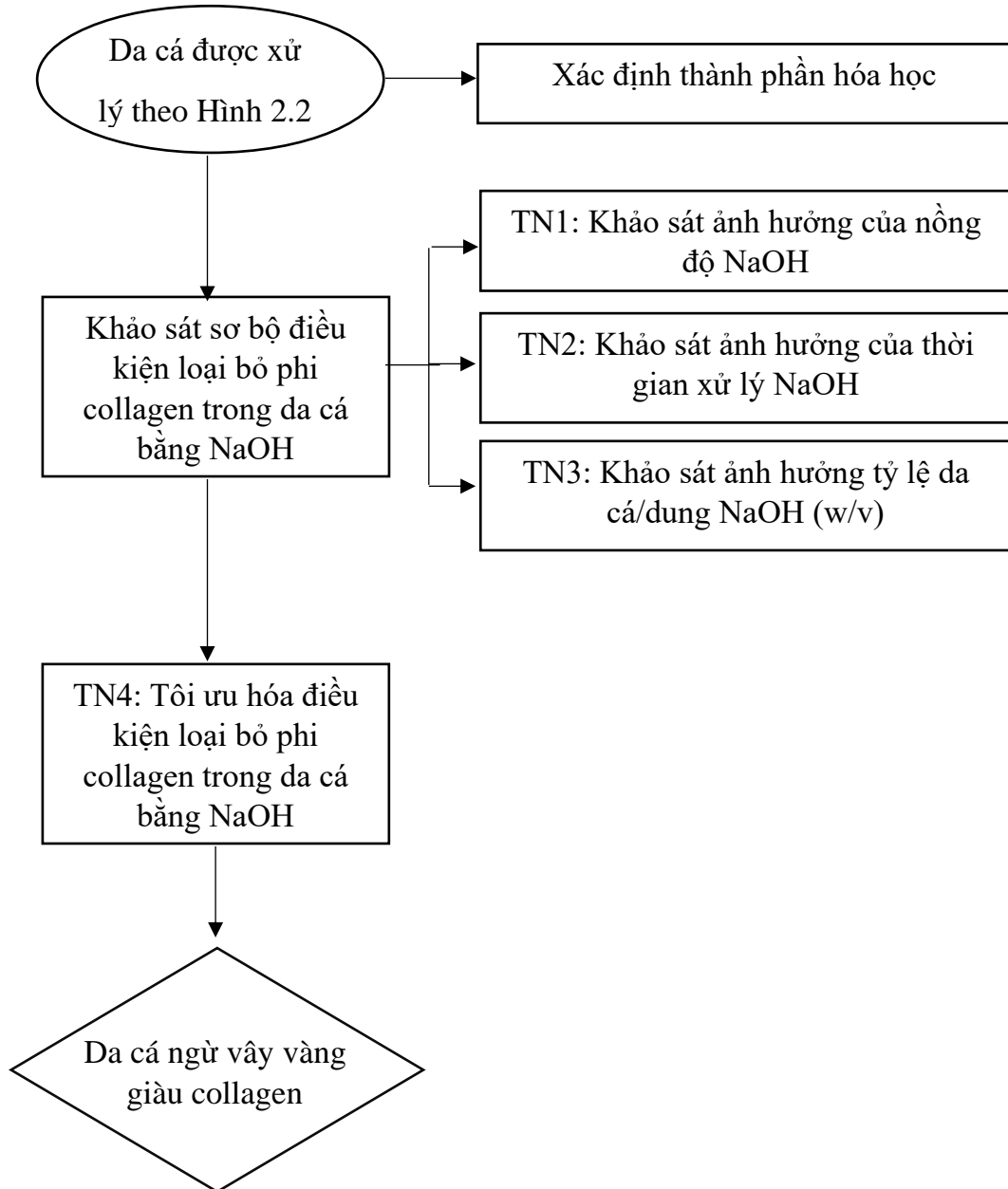
Sơ đồ tổng quát nội dung nghiên cứu của đề tài được trình bày trong Hình 2.3.



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 2.3.

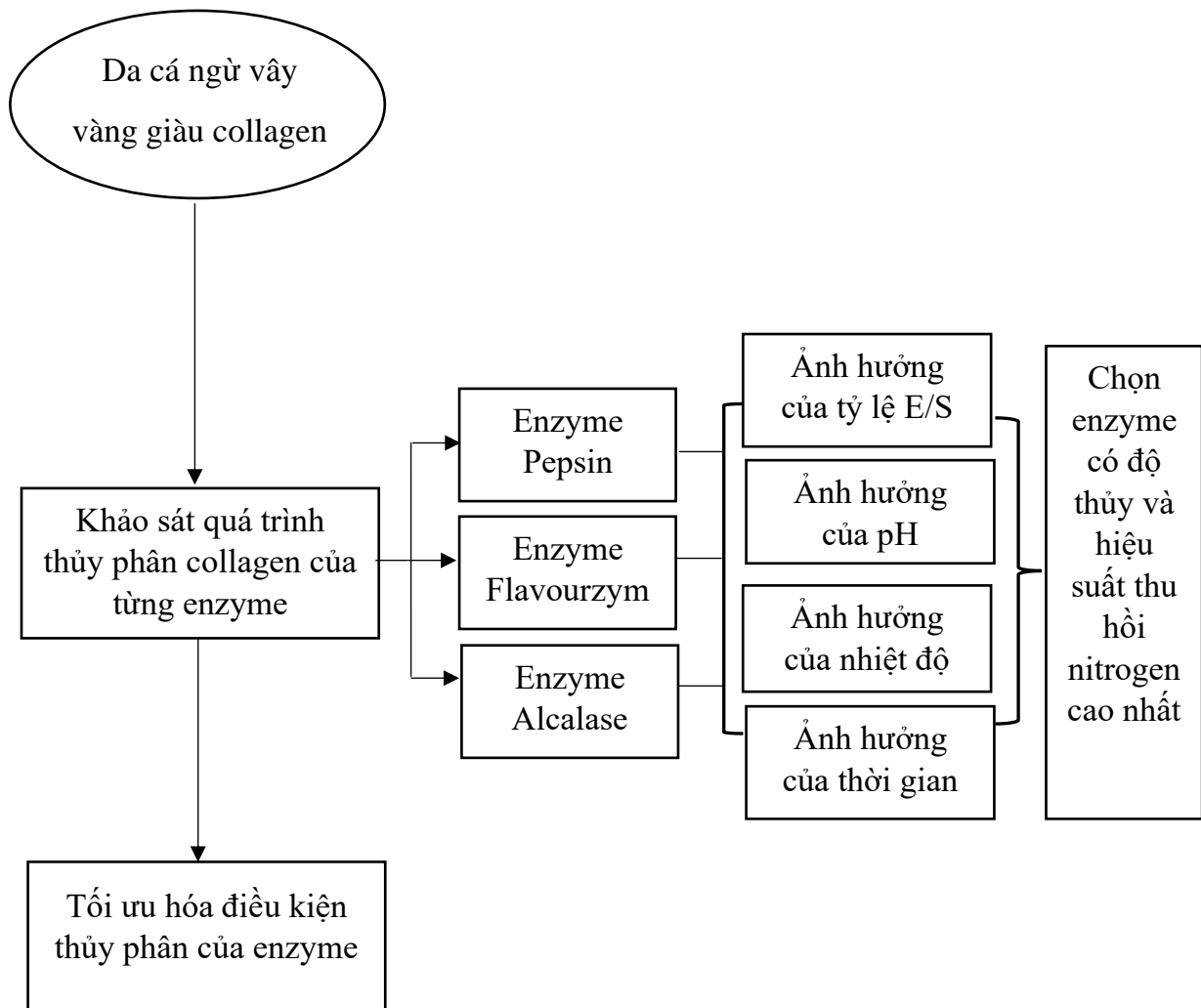


Hình 2.4. Sơ đồ nghiên cứu quy trình xử lý phi collagen từ da cá ngừ vây vàng

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 sơ đồ Hình 2.3, được xay nhỏ bằng máy xay trực vít, kích thước lỗ xay 0,5 cm, sau đó chia thành từng túi nhỏ và trữ đông trước khi sử dụng.

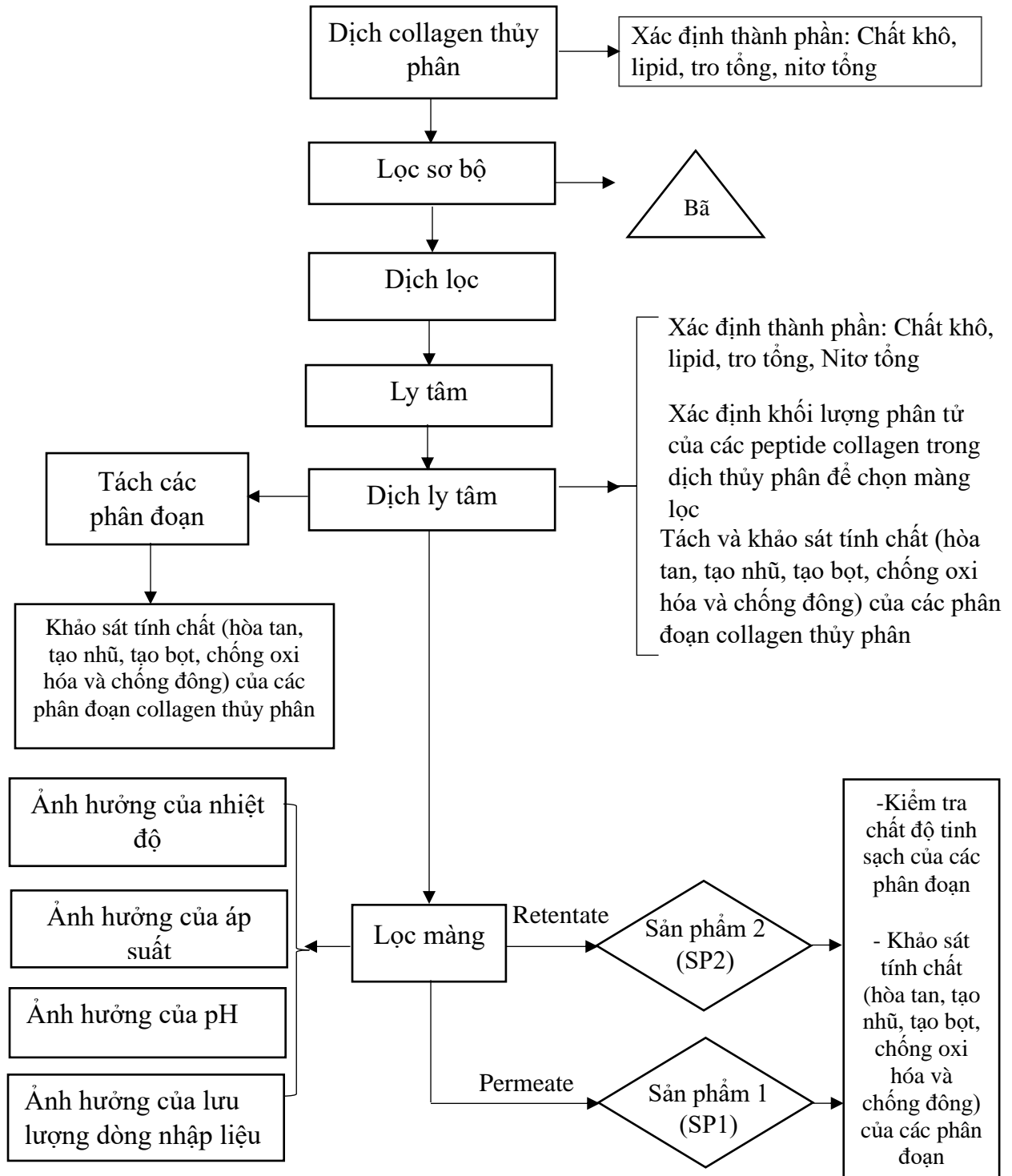
Mẫu sau khi đem tan băng và tiến hành thí nghiệm theo Hình 2.4 để xác định điều kiện thủy phân theo từng enzyme với hàm mục tiêu là độ thủy phân (DH) và hiệu suất thu hồi nitrogen (NR)



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

2.3.3. Tinh sạch và phân đoạn collagen thủy phân

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



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

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

Xác định các tỷ lệ phối trộn như nước, dịch ép chanh dây, axit citric, dịch siro và collagen thủy phân để thu được nước uống chanh dây có điểm cảm quan chung cao nhất.

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

Xác định thời gian lên men và tỷ lệ bổ sung collagen thủy phân với chỉ tiêu cần theo dõi là 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 (Woessner, 1961; 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

$$\text{Hiệu suất thu hồi nitrogen (NR, \%)} = \frac{N_1}{N_2} \times 100$$

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. 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.

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 vây 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 nhận thấy hàm lượng collagen chiếm 69,6% trên tổng chất khô và có đến 7% lượng protein không phải là collagen. Bảng 3.1 cho thấy việc xử lý phi collagen từ da cá ngừ chủ yếu là loại bỏ lipid và các protein không phải là collagen.

3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH, tỷ lệ dung dịch NaOH/ da cá (v/w), thời gian ngâm NaOH đến quá trình loại bỏ phi collagen trong da cá ngừ vây vàng.

Từ kết quả khảo sát từng yếu tố ảnh hưởng cho thấy điều kiện tốt nhất để xử lý phi collagen từ da cá ngừ vây vàng bằng dung dịch NaOH là: Nồng độ dung dịch NaOH 1,0N, thời gian xử lý là 25 giờ và tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá 5/1 (v/w) sẽ cho tỷ lệ hyp/protein là cao nhất và tỷ lệ lipid là thấp nhất.

Tối ưu hóa điều kiện xử lý phi collagen từ da cá ngừ vây vàng bằng dung dịch NaOH theo phương pháp bề mặt đáp ứng với các yếu tố ảnh hưởng X_1 (Nồng độ NaOH), X_2 (Thời gian thủy phân) và X_3 (Tỷ lệ dung dịch NaOH/da cá) với hai hàm mục tiêu phần trăm của hydroxyproline/protein (Y_1) và phần trăm của lipid còn lại/chất khô (Y_2). Kết quả điều kiện tối ưu quá trình xử lý phi collagen trên da cá ngừ vây vàng bằng dung dịch NaOH là: $X_1 = 0,93N$; $X_2 = 28$ giờ và $X_3 = 5/1$ (v/w) với $Y_1 = 9,94\%$ và $Y_2 = 5,5\%$.

Thành phần của da cá ban đầu và da cá sau khi xử lý cũng được phân tích và so sánh (Bảng 3.6). Kết quả chỉ ra rằng hàm lượng protein, collagen và loại bỏ lipid trong da cá được xử lý ở điều kiện tối ưu cao hơn đáng kể so với trong da cá ban đầu.

Bảng 3. 6. 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 ± 0,78	87,94 ^a ± 0,12	69,68 ^a ± 0,07	11,07 ^a ± 0,05	0,99 ^a ± 0,02
Sau	77,69 ^b ± 0,02	92,54 ^b ± 0,03	85,58 ^b ± 0,06	5,50 ^b ± 0,02	1,6 ^b ± 0,07

Độ lệch chuẩn ± SD; (a-b) là những chỉ số thể hiện sự khác nhau ở mức ý nghĩa ($P < 0.05$)

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

Tối ưu hóa điều kiện thủy phân của enzyme alcalase

Tối ưu hóa điều kiện thủy phân collagen từ da cá ngừ vây vàng bằng enzyme alcalase theo phương pháp bề mặt đáp ứng với các yếu tố ảnh hưởng X_1 (Nhiệt độ), X_2 (pH), X_3 (Nồng độ enzyme) và X_4 (Thời gian thủy phân) với hai hàm mục tiêu Y_1 (Độ thủy phân: DH) và Y_2 (Hiệu suất thu hồi nitrogen: NR). Kết quả điều kiện tối ưu quá trình thủy phân collagen trên da cá ngừ vây vàng bằng enzyme alcalase là: $X_1 = 54,7$ °C; $X_2 = 7,9$; $X_3 = 0,034\%$ và $X_4 = 5,2$ giờ với $Y_1 = 24,54\%$ và $Y_2 = 96,42\%$. Kết quả này cho thấy enzyme alcalase thủy phân collagen da cá ngừ vây vàng rất hiệu quả với độ thủy phân cao. Vì vậy có thể thu nhận các peptide collagen có phân tử lượng nhỏ, đáp ứng tiêu chuẩn collagen thủy phân.

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

Dịch thủy phân collagen từ da cá ngừ vây vàng bằng enzyme alcalase sau khi được tinh sạch bằng cách lọc chân không, sau đó ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 30 phút. Kết quả thành phần hóa học của được trình bày trong Bảng 3.16.

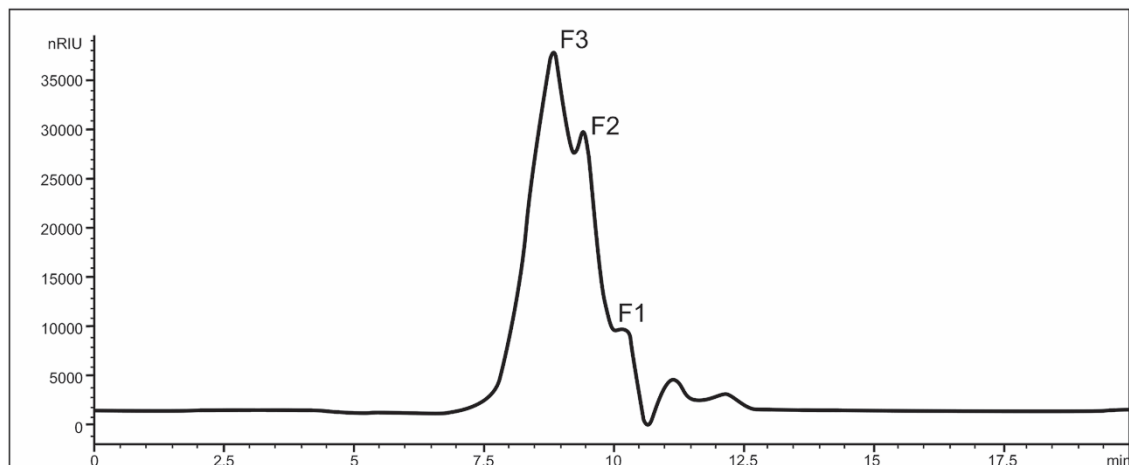
Bảng 3.16. Bảng thành phần hóa học của dịch collagen sau thủy phân và làm sạch sơ bộ

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

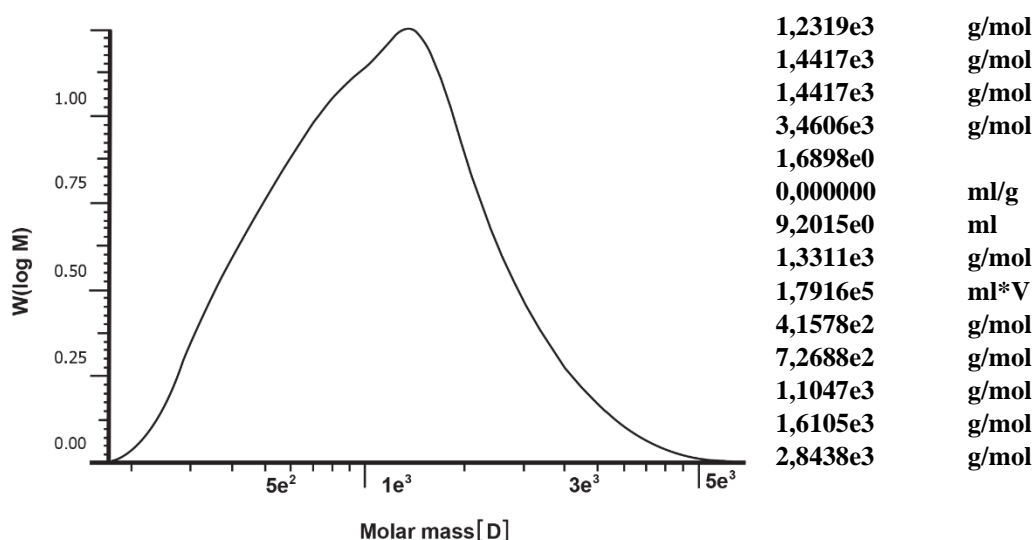
a, b, c: trên cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở 95%

3.3.2. Phân bố khối lượng phân tử peptide collagen trong dịch thủy phân sau khi ly tâm

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 (Hình 3.17). 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 3.18)



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



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

3.3.3. Kết quả tách các phân đoạn collagen thủy phân bằng sắc ký GPC (còn gọi là sắc ký lọc gel)

Dựa vào sắc ký đồ khi chạy sắc ký dịch thủy phân collagen từ da cá ngừ vây vàng (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.

3.3.4. Tính chất của các phân đoạn collagen thủy phân

Các phân đoạn collagen thủy phân (F₁, F₂ và F₃) được khảo sát các tính chất và hoạt tính chức năng. Kết quả trong Bảng 3.17 cho thấy phân đoạn F₁ và F₂ khả năng hòa tan và khả năng chống oxi hóa cao hơn phân đoạn F₃. Ngược lại phân đoạn F₃ có khả năng tạo bọt, tạo nhũ và chống đông tốt hơn F₁ và F₂.

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.

Đề tài sử dụng màng lọc UFP-1-C-6 của GE (Mỹ) với chất liệu là polysulfone với khối lượng mặt cắt qua màng 1kDa để tách collagen thủy phân thành hai phân đoạn $SP1 \leq 3kDa$ và $3kDa \leq SP2 \leq 5kDa$ với tỷ lệ SP1 và SP2 lần lượt là 90% và 10%. Thành phần hóa học của các sản phẩm được trình bày trong Bảng 3.18. Các tính chất như độ hòa tan, khả năng tạo nhũ hóa, khả năng tạo bọt, khả năng chống oxy hóa và khả năng chống đông của SP1 và SP2 được trình bày trong Bảng 3.19

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

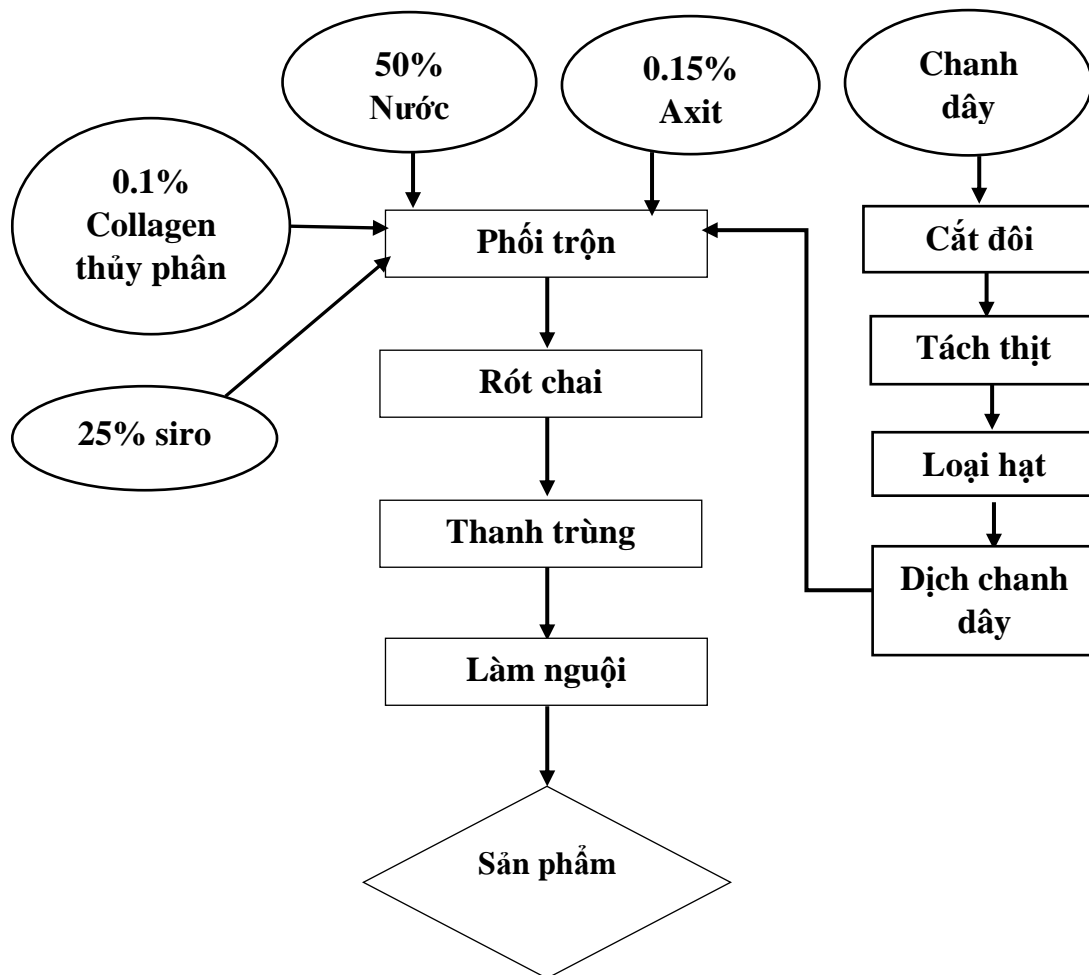
Chỉ tiêu	SP1	SP2
Đạm (gN/L)	14,14 ^b ±0,40	18,63 ^c ±0,35
Lipid (%)	0,05 ^c ±0,01	0,40 ^d ±0,04
Tro (%)	0,175 ^b ±0,02	0,139 ^c ±0,02
Chất khô (%)	9,04 ^b ±0,33	15,41 ^c ±0,26
Hiệu suất thu hồi nitrogen (%)	71,33 ^c ±1,13	7,97 ^d ±1,06
Hiệu suất thu hồi collagen (%)	86,01 ^c ±0,43	8,51 ^d ±0,52

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

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

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

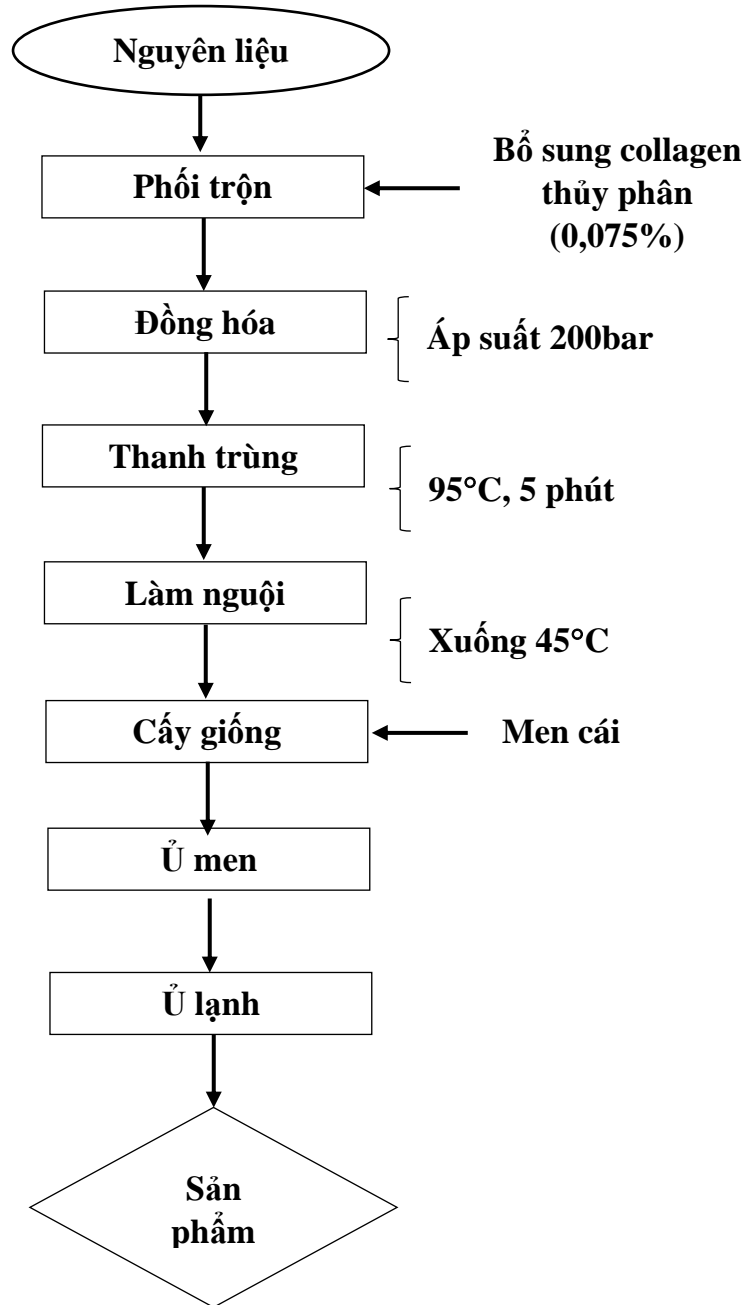


Hình 3. 52. Quy trình sản xuất hoàn thiện sản phẩm nước uống chanh dây có bổ sung collagen

Kết quả cho thấy khi sản xuất thử nghiệm nước uống chanh dây có bổ sung collagen thủy phân với các thành phần như: axit citric 0,15%, nước 50%, siro 25%, collagen 0,1% phần còn lại là dịch chanh dây thì cho chất lượng cảm quan của sản phẩm là cao nhất và khả năng giữ màu của nước ép chanh dây rất tốt.

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

3.8.2.3. Quy trình chế biến sữa chua bổ sung collagen thủy phân



Hình 3.55. Sơ đồ quy trình chế biến sữa chua bổ sung collagen

Kết quả cho thấy khi sản xuất thử nghiệm sữa chua có bổ sung collagen thủy phân với hàm lượng 0,075% với men giống vi khuẩn lactic của Vinamilk và thời gian lên men 300 phút cho chất lượng cảm quan của sản phẩm tốt nhất. Sản phẩm mềm và mịn, có pH 4,57 và độ nhớt 3439 cp.

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 dụng 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 điều 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 Bình, 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)