

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu đề tài, chúng tôi đã tìm hiểu và tiếp thu được rất nhiều kiến thức bổ ích. Kết quả đó có được là nhờ sự chỉ bảo, hướng dẫn, giúp đỡ tận tình của quý thầy cô và các bạn. Chúng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến:

Th.S Lê Thị Thu Hương đã trực tiếp chỉ bảo tận tình, hướng dẫn và giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi trong suốt quá trình nghiên cứu.

Các thầy, cô Trường Đại Học Lạc Hồng và Khoa CNSH – Môi Trường đã giảng dạy, truyền đạt kiến thức, góp ý động viên chúng tôi trong suốt quá trình học tập.

Các bạn sinh viên trong lớp 06SH đã giúp đỡ, góp ý, động viên chúng tôi trong suốt quá trình học tập cũng như thực hiện đề tài này.

Bố, mẹ, anh chị em trong gia đình đã luôn động viên, khuyến khích và tạo điều kiện tốt nhất trong quá trình học tập.

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sâu sắc đến tất cả mọi người và gửi lời chúc sức khỏe, thành công trong công việc và cuộc sống!

Xin chân thành cảm ơn.

MỤC LỤC

Trang phụ bìa

LỜI CẢM ƠN

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC BẢNG

DANH MỤC CÁC HÌNH

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1.....	4
CƠ SỞ LÝ THUYẾT CỦA ĐỀ TÀI.....	4
1 Giới thiệu tổng quan về cá tra và tình hình phát triển cá tra ở Việt Nam:...	4
1.1 Tổng quan về cá tra ở Việt Nam [12], [13]:	4
1.2 Tình hình phát triển cá tra ở Việt Nam [12], [13]:.....	6
2 Thành phần hóa học của cá [1]:	8
3 Tìm hiểu về collagen [9], [10], [11]:.....	10
3.1 Collagen là gì?.....	10
3.2 Thành phần cấu tạo và cấu trúc của collagen [8]:	10
3.2.1 Cấu tạo của collagen:	10
3.2.2 Tính chất của collagen [3], [4], [5], [6]:.....	15
3.3 Phân loại collagen [9]	16
3.4 Chức năng của collagen [10], [11], [12]:.....	16
3.5 Ứng dụng của collagen:.....	17
3.5.1 Ứng dụng collagen trong thực phẩm	17
3.5.2 Ứng dụng collagen trong y học và dược phẩm.....	19
3.5.3 Ứng dụng collagen trong mỹ phẩm [10], [11], [12], [15]:	19

3.6 Các yếu tố ảnh hưởng tới collagen [2], [3], [4], [5], [6]:	21
3.6.1 Ảnh hưởng của pH:	21
3.6.2 Ảnh hưởng của nồng độ muối:	21
3.6.3 Ảnh hưởng của dung môi:	22
3.6.4 Ảnh hưởng của không khí:	22
3.6.5 Ảnh hưởng của nước:	22
3.6.6 Ảnh hưởng của nhiệt độ:	22
4 Các phương pháp tách chiết Collagen [2], [3], [4], [6]:	23
4.1 Khái niệm:	23
4.2 Các biện pháp cần thiết để nhận protein nguyên thể:	23
4.2.1 Nồng độ proton (pH):	23
4.2.2 Tác nhân hóa học:	24
4.3 Phá vỡ tế bào và chiết rút protein:	25
4.3.1 Phá vỡ tế bào:	25
4.3.2 Chiết rút protein:	25
4.4 Tinh sạch protein:	25
4.4.1 Loại các tạp chất:	25
4.4.2 Các kỹ thuật thông thường trong tinh sạch protein:	26
4.4.2.1 Ly tâm:	26
4.4.2.2 Thẩm tích:	27
4.4.2.3 Sắc ký lọc gel:	28
4.4.2.4 Phương pháp sắc ký trao đổi ion:	30
4.4.2.5 Phương pháp dùng chất hấp phụ đặc hiệu sinh học hay là phương pháp sắc ký ái lực (affinity Chromatography):	30
4.4.2.6 Làm khô và bảo quản chế phẩm protein:	31

5 Các phương pháp phân tích đặc tính lý – hoá của nguyên liệu và collagen [2],[5]:	32
5.1 Các phương pháp xác định hàm lượng protein	32
5.2 Đánh giá tính đồng thể của protein:	34
5.3 Phương pháp phân tích hàm lượng lipid bằng bộ chiết Soxhlet:	35
5.4 Phương pháp phân tích hàm ẩm:	36
5.6 Phương pháp xác định phân tử lượng của collagen bằng phương pháp điện di:	37
5.7 Phương pháp xác định độ nhớt dung dịch theo phương pháp nhớt kế Ubellog:	37
5.7.1 Nguyên tắc	37
5.7.2 Tiến hành:	38
5.7.3 Cách tính độ nhớt	38
5.8 Phương pháp xác định nhiệt độ biến tính của collagen:	38
6 Lịch sử nghiên cứu và tách chiết collagen:	39
CHƯƠNG 2	40
NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	40
2.1 Nguyên liệu nghiên cứu:	40
2.2 Phương pháp nghiên cứu:	40
2.3 Quy trình tách chiết Collagen:	40
2.3.1 Nguyên liệu:	42
2.3.2 Ngâm NaOH	42
2.3.3 Ngâm với H_2O_2:	42
2.3.4 Cắt nhỏ:	43
2.3.5 Chiết collagen	43

2.4 Sơ đồ bố trí nghiệm thức cho công đoạn ngâm với xút và H_2O_2 như sau:	43
2.4.1 Sơ đồ bố trí thí nghiệm với xút	43
2.4.2 Sơ đồ bố trí thí nghiệm với H_2O_2 :	44
Chương 3 KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN	46
3.1 Phân tích thành phần nguyên liệu:	46
3.2 Xử lý da cá bằng $NaOH$	46
3.3 Xử lý da cá bằng H_2O_2	50
3.4 Chiết collagen bằng acid acetic:	53
3.5 Chiết collagen bằng enzyme pepsin:	58
3.6 Chiết collagen bằng enzyme pepsin kết hợp với acid acetic:	58
3.7 Xác định đặc tính lý hoá của collagen thu được:	62
Chương 4: KẾT LUẬN – KIẾN NGHỊ	64
4.1 Kết luận:	64
PHỤ LỤC	66
MỘT SỐ HÌNH ẢNH TRONG QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT COLLAGEN	66
TÀI LIỆU THAM KHẢO	67

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1	8
Bảng 1.2	9
Bảng 1.3	9
Bảng 1.4	14
Bảng 2.1	44
Bảng 2.2	45
Bảng 3.1	46
Bảng 3.2	47
Bảng 3.3	48
Bảng 3.4	49
Bảng 3.5	51
Bảng 3.6	51
Bảng 3.7	52
Bảng 3.8	54
Bảng 3.9	55
Bảng 3.10	56
Bảng 3.11	57
Bảng 3.12	58

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1	10
Hình 1.2	18
Hình 1.3	18
Hình 1.4	20
Hình 1.5	28
Hình 3.1	48
Hình 3.2	49
Hình 3.3	52
Hình 3.4	53
Hình 3.5	55
Hình 3.6	56
Hình 3.7	57
Hình 3.8	67
Hình 3.9	60
Hình 3.10	60
Hình 3.11	60
Hình 3.12	61
Hình 3.13	61
Hình 3.14	62

MỞ ĐẦU

Thủy sản là một trong những ngành kinh tế quan trọng nhất của nước ta, Việt Nam có đường bờ biển dài hơn 3200 km. Cùng với sự phát triển mạnh mẽ của ngành nuôi trồng và chế biến thủy sản xuất khẩu ở nước ta, một lượng lớn các phế phụ phẩm bị thải ra như đầu, da, xương... lượng phế phụ phẩm này chưa được xử lý thích hợp dẫn đến ô nhiễm môi trường và gây lãng phí. Trong khi các phế phẩm ấy chính là nguyên liệu cho nhiều ngành sản xuất khác. Theo hướng này, chất thải thủy sản có thể được dùng để làm phân bón, chế biến thức ăn gia súc, làm bao bì sinh học, làm môi trường nuôi cấy tổng hợp các chế phẩm sinh học, là nguồn nguyên liệu để tách chiết các chất cần thiết cho ngành công nghệ thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm,...

Hiện nay collagen được coi như là một loại dược liệu quý để kéo dài tuổi thanh xuân cho con người. Việc nghiên cứu và sản xuất collagen có nhiều ý nghĩa đối với ngành sản xuất thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm, ...

- + Trong ngành thực phẩm: collagen được ứng dụng để làm vỏ bao xúc xích, kẹo, và các ứng dụng của nó dưới dạng gelatin.

- + Trong y học: collagen được ứng dụng trong việc chế tạo da nhân tạo để điều trị vết bỏng, ứng dụng trong phẫu thuật chỉnh hình, làm vỏ bọc thuốc, ...

- + Trong mỹ phẩm: collagen có vai trò chống nhăn, giữ cho da mềm và sáng, hơn nữa collagen còn là nguyên liệu để sản xuất các sản phẩm như: mặt nạ, kem dưỡng da, dầu gội, ...

Việc nghiên cứu ứng dụng collagen vào mỹ phẩm đã tiến hành vào năm 1930 bởi người Đức; thời kì đó, người ta tách chiết collagen chủ yếu từ da và xương của trâu, bò, lợn. Tuy nhiên, đến năm 1990 bắt đầu một hướng chuyển biến mới: bắt đầu “tách chiết collagen từ da cá”, phát minh này của các nhà khoa học thuộc Viện Hóa học Gdansk (Ba Lan) đã gây tiếng vang mạnh mẽ trên toàn cầu. Trong những năm gần đây nhiều quốc gia như: Mỹ, Pháp, Đức, Ba Lan, Nhật Bản, Hàn Quốc đã đầu tư hàng triệu đôla vào nghiên cứu thu nhận collagen để làm nguyên liệu sản xuất da

nhân tạo, chỉ tự tiêu, thuốc mỡ điều trị bỏng và các sản phẩm làm đẹp như mặt nạ, kem dưỡng da, dầu dưỡng tóc, ...

Nhận thấy nhu cầu rất lớn về collagen ở trên Thế Giới cũng như ở Việt Nam trong những năm gần đây, thêm vào đó nguồn nguyên liệu da và xương cá để sản xuất collagen ở nước ta khá dồi dào, ổn định, giá rẻ và có tiềm năng phát triển nên chúng tôi chọn đề tài ***“Tách chiết collagen từ da cá tra bằng phương pháp hoá sinh”*** với mong muốn góp phần nâng cao hiệu quả kinh tế cho các ngư dân và nhà sản xuất cá; đồng thời cũng góp phần vào việc giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

*** Mục tiêu:**

- Xây dựng được quy trình sản xuất collagen từ da cá tra bằng enzyme pepsin kết hợp với acid acetic.
- Thu được collagen thô ở dạng dịch chiết.

*** Phương pháp nghiên cứu:**

- Tổng hợp tài liệu.
- Phương pháp phân tích vật lý.
- Phương pháp phân tích hoá lý.
- Phương pháp cảm quan.
- Phương pháp phân tích định lượng.

*** Nội dung nghiên cứu:**

- Thu thập tài liệu, tìm hiểu về cấu tạo, tính chất, lợi ích của collagen.
- Phân tích nguyên liệu (da cá tra) và sản phẩm collagen thô : xác định độ ẩm, tro, lipid, hàm lượng collagen.
- Xử lý da cá và chiết collagen từ da cá tra :
 - Xử lý da cá bằng NaOH.
 - Xử lý da cá bằng H₂O₂.

- Chiết collagen bằng acid acetic.
 - Chiết collagen bằng enzyme pepsin kết hợp với acid acetic.
- * **Sản phẩm của đề tài :** Collagen ở dạng thô.

CHƯƠNG 1

CƠ SỞ LÝ THUYẾT CỦA ĐỀ TÀI

1 Giới thiệu tổng quan về cá tra và tình hình phát triển cá tra ở Việt Nam:

1.1 Tổng quan về cá tra ở Việt Nam [12], [13]:

- Phân loại:

Cá tra (theo từ điển tiếng Việt, Nhà xuất bản Khoa học Xã hội, 1977) là loài cá nước ngọt, không vảy, giống cá trê nhưng không ngạnh.

Cá tra thuộc bộ cá nheo *Siluriformes*.

Giống cá tra dầu *Pangasianodon*.

Loài cá tra *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878).

Họ *Pangasiidae* theo IT IS có 3 chi:

- Chi *Sinopangasius* (1 loài).
- Chi *Helicophagus* (3 loài).
- Chi *Pangasius* (27 loài).

- Đặc điểm sinh học:

Cá tra là cá da trơn (không vảy), thân dài, lưng xám đen, bụng hơi bạc, miệng rộng, có hai đôi râu dài. Cá tra sống chủ yếu trong nước ngọt, có thể sống được ở vùng nước hơi lợ (nồng độ muối 7- 10‰, có thể chịu đựng được nước phèn với pH>5, dễ chết ở nhiệt độ thấp dưới 15°C, nhưng chịu nóng tới 39°C. Cá tra có số lượng hồng cầu trong máu nhiều hơn các loài khác. Cá có cơ quan hô hấp phụ và còn có thể hô hấp bằng bóng khí và da nên chịu đựng được môi trường nước thiếu oxy hòa tan. Tiêu hao oxy và ngưỡng oxy của cá tra thấp hơn 3 lần so với cá mè trắng.

- Đặc điểm sinh trưởng:

Cá tra có tốc độ tăng trưởng tương đối nhanh, lúc nhỏ cá tăng nhanh về chiều dài. Cá ương trong ao sau 2 tháng đạt chiều dài 10-12cm (14-15gam). Từ khoảng 2,5kg trở đi mức tăng trọng lượng nhanh hơn so với tăng chiều dài cơ thể. Cá tra trong tự nhiên có thể sống trên 20 năm. Trong ao nuôi, cá bố mẹ cho đẻ đạt tới 25kg ở cá 10 năm tuổi. Nuôi trong ao một năm cá đạt 1-1,5kg/con (năm đầu tiên), những năm về sau cá tăng trọng nhanh hơn, có khi đạt tới 5-6kg/năm tùy thuộc vào môi trường sống và sự cung cấp thức ăn cũng như loại thức ăn có hàm lượng đạm nhiều hay ít. Độ béo Fulton của cá tăng dần theo trọng lượng và nhanh nhất ở những năm đầu, cá đực thường có độ béo cao hơn cá cái và độ béo thường giảm đi khi vào mùa sinh sản.

- Đặc điểm sinh sản:

Tuổi thành thực của cá đực là 2 tuổi và cá cái là 3 tuổi, trọng lượng cá thành thực lần đầu từ 2,5-3 kg. Trong tự nhiên chỉ gặp cá thành thực trên sông ở địa phận của Campuchia và Thái Lan. Ngay từ năm 1966, Thái Lan bắt cá tra thành thực (sống trong đầm Bung Borapet) và kích thích sinh sản nhân tạo thành công. Sau đó họ nghiên cứu nuôi vỗ cá tra trong ao. Đến năm 1972 Thái Lan công bố qui trình sinh sản nhân tạo cá tra với phương pháp nuôi vỗ cá bố mẹ thành thực trong ao đất.

Cá tra không có cơ quan sinh dục phụ (sinh dục thứ cấp). Ở thời kỳ thành thực, tuyến sinh dục ở cá đực phát triển lớn gọi là buồng tinh, ở cá cái gọi là buồng trứng. Tuyến sinh dục của cá tra bắt đầu phân biệt được đực cái từ giai đoạn II tuy màu sắc chưa khác nhau nhiều. Các giai đoạn sau, buồng trứng tăng về kích thước, hạt trứng màu vàng, tinh trùng có màu hồng chuyển dần sang màu trắng sữa. Hệ số thành thực của cá tra khảo sát được trong tự nhiên từ 1,76-12,94 (cá cái) và từ 0,83-2,1 (cá đực) ở cá đánh bắt tự nhiên trên sông cỡ từ 8-11kg (Nguyễn Văn Trọng, 1989). Trong ao nuôi vỗ, hệ số thành thực cá tra có thể đạt tới 19,5%.

Mùa vụ thành thực của cá trong tự nhiên bắt đầu từ tháng 5-6 dương lịch, cá có tập tính di cư đẻ tự nhiên trên những khúc sông có điều kiện sinh thái phù hợp thuộc địa phận Campuchia và Thái Lan, không đẻ tự nhiên ở phần sông của Việt

Nam. Cá đẻ trứng dính vào giá thể thường là rễ của loài cây sống ven sông *Gimnema asiatica*, sau 24 giờ thì trứng nở thành cá bột và trôi về hạ nguồn.

Trong sinh sản nhân tạo, ta có thể nuôi thành thực sớm và cho đẻ sớm hơn trong tự nhiên (từ tháng 3 dương lịch hàng năm), cá tra có thể tái phát dục 1-3 lần trong 1 năm.

Số lượng trứng đếm được trong buồng trứng của cá gọi là sức sinh sản tuyệt đối. Sức sinh sản tuyệt đối của cá tra từ 200000 đến vài triệu trứng. Sức sinh sản tương đối có thể tới 135000 trứng/kg cá cái. Kích thước của trứng cá tra tương đối nhỏ và có tính dính. Trứng sắp đẻ có đường kính trung bình cỡ 1mm. Sau khi đẻ ra và hút nước đường kính trứng khi trương nước có thể tới 1,5-1,6mm.

- Đặc điểm dinh dưỡng:

Cá tra khi hết noãn hoàn thì thích ăn mồi tươi sống, vì vậy chúng ăn thịt lẫn nhau ngay trong bể ấp và chúng vẫn tiếp tục ăn nhau nếu cá ương không được cho ăn đầy đủ, thậm chí cá vớt trên sông vẫn thấy chúng ăn nhau trong đáy vớt cá bột. Ngoài ra khi khảo sát cá bột vớt trên sông, còn thấy trong dạ dày của chúng có rất nhiều phần cơ thể và mắt cá con các loài cá khác. Dạ dày của cá phình to hình chữ U và co giãn được, ruột cá tra ngắn, không gấp khúc lên nhau mà dính vào màng treo ruột ngay dưới bóng khí và tuyến sinh dục. Dạ dày to và ruột ngắn là đặc điểm của cá thiên về ăn thịt. Ngay khi vừa hết noãn hoàn cá thể hiện rõ tính ăn thịt và ăn lẫn nhau, do đó để tránh hao hụt do ăn nhau trong bể ấp cần nhanh chóng chuyển cá ra ao ương. Trong quá trình ương nuôi thành cá giống trong ao, chúng ăn các loại phù du động vật có kích thước vừa cỡ miệng của chúng và các thức ăn nhân tạo. Khi cá lớn thể hiện tính ăn rộng, ăn đáy và ăn tạp thiên về động vật nhưng dễ chuyển đổi loại thức ăn. Trong điều kiện thiếu thức ăn, cá có thể sử dụng các loài thức ăn bắt buộc khác như mùn, bã hữu cơ, thức ăn có nguồn gốc động vật. Trong ao nuôi cá tra có khả năng thích nghi với nhiều loại thức ăn khác như cám, rau, động vật đáy.

1.2 Tình hình phát triển cá tra ở Việt Nam [12], [13]:

Cá thuộc họ *Pangassidae* (họ cá tra) với tên Việt có những loài sau:

- *Helicophagus waandersii* – Cá tra chuột.
- *Pangasius gigas* – Cá tra dầu.
- *Pangasius kunyit* – Cá tra bần.
- *Pangasius hypophthalmus* – Cá tra nuôi.
- *Pangasius micronema* – Cá tra.
- *Pangasius larnaudii* – Cá vồ đém.
- *Pangasius sanitwongsei* – Cá vồ cò.
- *Pangasius bocourti* – Cá xác bụng (cá basa).
- *Pangasius macronema* – Cá xác sọc.
- *Pangasius pleurotaenia* – Cá xác bầu.
- *Pangasius conchophilus* – Cá hú.
- *Pangasius polyuranodon* – Cá dứa.
- *Pangasius krempfy* – Cá bông lau.

Trong số 13 loài này, có hai loài cá đã được ghi vào sách đỏ Việt Nam. Loài cá vồ cò (*Pangasius sanitwongsei*) được ghi tên trong sách đỏ từ năm 1996. Loài cá tra dầu (*Pangasius gigas*) có tên trong sách đỏ từ năm 2002. Ngoài ra có một số loài đã trở thành cá nuôi, vài loài được nuôi với tầm vóc qui mô.

Đồng bằng sông Cửu Long vốn có truyền thống nuôi cá tra từ lâu đời. Cá tra được nuôi phổ biến trong ao, đàng quăng, bãi bồi và nuôi lồng bè trên các con sông lớn thuộc tỉnh An Giang, Đồng Tháp.

Hiện nay cá tra đã được nuôi ở hầu hết các tỉnh trong vùng. Những năm gần đây, việc nuôi loài cá này phát triển mạnh nhằm phục vụ tiêu thụ nội địa và cung cấp nguyên liệu cho chế biến xuất khẩu. Đặc biệt từ khi chúng ta hoàn toàn chủ động về giống nhân tạo thì nghề nuôi càng ổn định và có những bước phát triển vượt bậc. Thế nhưng do phát triển một cách tự phát nên khủng hoảng thừa cá nguyên liệu, cả người nuôi lẫn doanh nghiệp chế biến xuất khẩu đều gặp khó khăn.

Đến tháng 6 đầu năm 2008 nghề nuôi cá tra ở Đồng Bằng Sông Cửu Long đều tăng cả về diện tích, sản lượng và năng suất bình quân/ha.

Diện tích mặt nước cá tra hiện khoảng gần 6000 ha. Việc nuôi thương phẩm thâm canh cho năng suất rất cao, cá tra nuôi trong ao đạt tới 200-300tấn/ha, cá tra nuôi trong bè có thể đạt tới 100-159kg/m³ bè. Đặc biệt, năng suất cá biệt một số ao đạt gần 1000 tấn/ha/năm. Do sản lượng cá thịt tăng đột biến, trong khi hoạt động xuất khẩu khó khăn do giá bán thấp, cạnh tranh chào hàng không lành mạnh, bị khách hàng ép giá nên xảy ra tình trạng khủng hoảng thừa trong một tháng qua. Lượng cá quá lứa trong dân lên đến con số trăm ngàn tấn. Hậu quả này là khó tránh khỏi.

2 Thành phần hóa học của cá [1]:

Thành phần hóa học của cá gồm: nước, protein, lipid, muối vô cơ, vitamin ... Các thành phần này khác nhau rất nhiều, thay đổi phụ thuộc vào giống, loài, giới tính, điều kiện sinh sống... Ngoài ra, các yếu tố như thành phần thức ăn, môi trường sống, kích cỡ cá và các đặc tính di truyền cũng ảnh hưởng đến thành phần hóa học, đặc biệt là ở cá nuôi. Các yếu tố này có thể kiểm soát được trong chừng mực nào đó.

Các thành phần cơ bản của cá và động vật có vú có thể chia thành những nhóm có cùng tính chất.

Bảng 1.1 Thành phần dinh dưỡng của cá tra thành phẩm.

Thành phần dinh dưỡng trên 100g thành phẩm ăn được					
Tổng năng lượng cung cấp (calori)	Chất đạm (g)	Tổng lượng chất béo (g)	Chất béo chưa bão hòa (có DHA, EPA) (g)	Cholesterol (%)	Natri (mg)
124.52	23.42	3.42	1.78	0.025	70.6

Bảng 1.2 Các thành phần cơ bản (tính theo % căn bản ướt) của cá và thịt bò.

Thành phần	Cá (phi lê)			Thịt nạc bò
	Tối thiểu	Thông thường	Tối đa	
Protein	6	16 - 21	28	20
Lipid	0,1	0,2 - 25	67	3
Carbohydrate	-	< 0,5	-	1
Tro	0,4	1,2 – 1,5	1,5	1
Nước	28	66 - 81	96	75

Sự khác nhau về thành phần hóa học của cá và sự biến đổi của chúng có ảnh hưởng đến mùi vị và giá trị dinh dưỡng của sản phẩm, việc bảo quản tươi nguyên liệu và qui trình chế biến.

Bảng 1.3 Thành phần hóa học của cá (%).

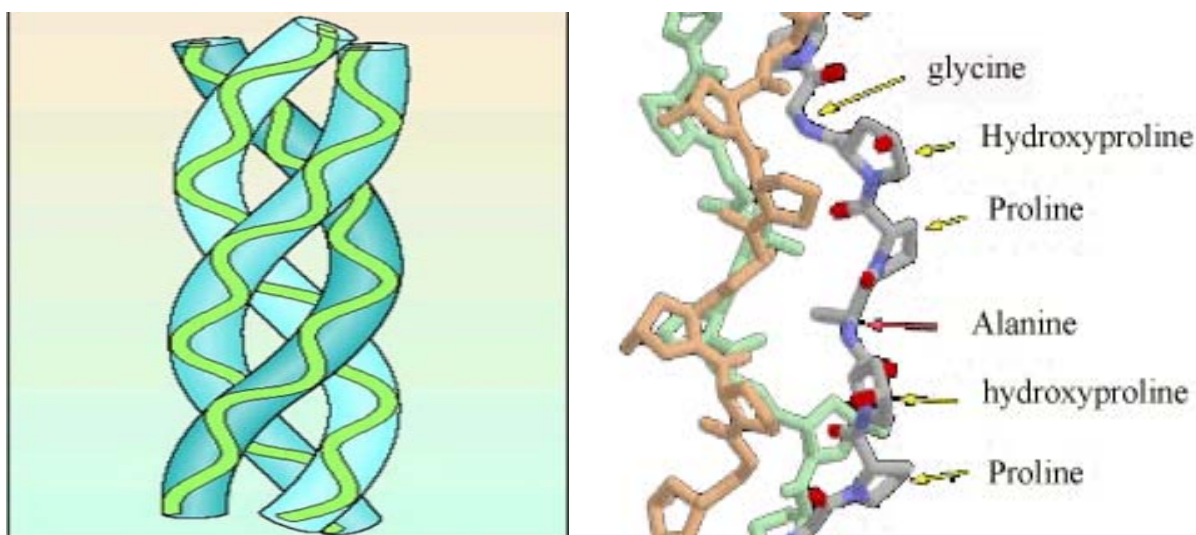
Thành phần chỉ tiêu	Nước	Protein	Lipid	Muối vô cơ
Thịt cá	48 – 85,1	10,3 – 24,4	0,1 – 5,4	0,5 – 5,6
Trứng cá	60 - 70	20 - 30	1 - 11	1 - 2
Gan cá	40 - 75	8 - 18	3 - 5	0,5 – 1,5
Da cá	60 - 70	7 - 15	5 - 10	1 - 3

3 Tìm hiểu về collagen [9], [10], [11]:

3.1 Collagen là gì?

Collagen là protein chính của cơ thể người, chiếm khoảng 25%. Collagen là thành phần chính của các mô liên kết, có khả năng đàn hồi và chịu lực rất cao, là thành phần chính của gân, dây chằng, sụn, móng tay, xương và răng trong cơ thể. 70% cấu trúc của da là collagen, chúng phân bố chủ yếu ở lớp hạ bì của da, chiếm 3/4 trọng lượng khô của da.

3.2 Thành phần cấu tạo và cấu trúc của collagen [8]:



Hình 1.1 Cấu trúc Collagen.

Collagen là một loại protein nhưng là một loại rất đặc biệt. Cấu trúc của nó được tạo thành từ những amino acid với sự sắp xếp dạng sợi, mặt khác nó được biết như là protein cứng hình sợi. Những sợi này là những chuỗi phân tử dài, chứa đến 19 loại amino acid. Thành phần amino acid quan trọng của những sợi này gồm có: prolin, glicin và hydroxyprolin và hydroxysilizin. Hai hợp chất cuối thì không tìm thấy trong bất kì loại protein nào khác.

3.2.1 Cấu tạo của collagen:

Thành phần protein chủ yếu của da, xương, vây và bong bóng cá tương tự như collagen của động vật đã được nghiên cứu rộng rãi. Thật vậy, nó gồm có hydroxyproline và hydroxylysine, có cấu trúc sợi cơ dạng xoắn nhìn thấy bằng kính hiển vi điện tử (Borasky, 1950; Schmitt, Gross và Highberger, 1955; Damodaran, Sivaraman & Dhavalikar, 1956) và có các đặc điểm khác nhau theo mô hình nhiễu xạ tia X với góc rộng và hẹp (Bear, 1956).

Các phân tích amino acid của các loại collagen cá được thực hiện bởi Beveridge & Lucas (1944), chủ yếu bằng phương pháp phân tích trọng lượng đối với thạch chiết từ bong bóng cá tuyết (*Urophycis*); bởi Block, Horwith và Bolling (1949) đối với vây cá trích (*Clupea*) và bởi Neuman (1949), người đã dùng các kỹ thuật thử nghiệm vi sinh đối với da cá bơn và gellatin chiết từ vây cá. Những nghiên cứu gần đây về thành phần chất keo tách từ vây cá mập (*Carcharinus melanopterus*) bởi Damodaran và cộng sự (1956) bằng sắc ký resin đã khẳng định kết quả của phương pháp nhiễu xạ tia X góc rộng (Astbury, 1938) bằng cách đặc các protein không bình thường này với nhóm collagen.

Sự quan tâm về collagen cá gần đây được khuyến khích nhờ những công nhận về sự ổn định cấu trúc nhỏ bé của chúng so với các collagen của động vật có vú (biểu hiện ở vùng nhiệt độ đàn hồi thấp), liên quan đến hàm lượng hydroxyproline thấp (Gustavson, 1953). Hydrogen ở chuỗi bên trong của xương giữa các nhóm hydroxyl của hydroxyproline và nhóm carbonyl của xương cột sống đều ở dạng cơ bản này, được xem như một đặc trưng cơ bản quan trọng cho cấu trúc collagen (Gustason, 1955). Giả thiết này đã được áp dụng từ khi chưa có những bằng chứng, những thông tin liên quan đến cấu trúc của collagen ở cả hai dạng, đó là nhiễu xạ tia X (Ramachndran, 1956) và kỹ thuật kính hiển vi điện tử (Reed, Wood và Keech, 1956). Một bảng tóm tắt về các nghiên cứu gần đây về mô liên kết của cá được thực hiện bởi Hamoir (1955).

Những nghiên cứu hiện tại cung cấp thông tin về thành phần của collagen từ một vài mẫu tiêu biểu của một vài loại cá thuộc ba nhóm cá sau: cá nhám, cá vây tia và cá sọc (Young, 1950; Trewavas, White, Marshall & Tucker, 1955).

Các phương pháp nghiên cứu đều dựa trên những nghiên cứu ban đầu về các collagen động vật (Eastoe, 1956) để so sánh sự khác biệt nhỏ về thành phần collagen tạo ra.

Thành phần acid amin của collagen rất đặc biệt so với các protein khác: Glycine chiếm khoảng 35%, prolin chiếm 12% tổng số gốc acid amin trong phân tử.

Collagen còn chứa hai acid amin ít gặp trong các protein khác, đó là hydroxiprolin và hydroxilizin. Đơn vị cấu trúc của collagen là tropocollagen bao gồm 3 mạch polypeptid bện vào nhau thành một dây cáp siêu xoắn. Chiều cao mỗi gốc trên trục siêu xoắn là $2,9\text{\AA}$, 1 vòng xoắn có 3,3 gốc acid amin. mạch polypeptid trong dây cáp nối với nhau bằng các liên kết hydro. Liên kết hydro được tạo thành giữa nhóm NH của gốc glycin trên một mạch polypeptid với nhóm CO trong liên kết peptid ở trên mạch polypeptid khác.

Các phân tử tropocollagen ở các dây kề nhau xếp lệch nhau $\frac{1}{4}$ phân tử tạo thành các vắn ngang trên sợi collagen. Trên cùng một dây, giữa phân tử tropocollagen có một khớp dài 400\AA .

Hàm lượng của collagen ở cơ thịt cá thấp hơn ở động vật có vú, thường khoảng 1-10% tổng lượng protein và 0,2-2,2% trọng lượng của cơ thịt. Chiếm khoảng 3% ở cá xương và khoảng 10% ở cá sụn (so với 17% trong các loài động vật có vú).

Cấu trúc phân tử collagen: collagen là loại protein đơn có hàm lượng lớn nhất ở động vật. Độ mạnh và tính toàn vẹn của tất cả các mô liên kết bao gồm xương và mạch máu phụ thuộc vào sự có mặt của sợi cơ collagen. Chính vì vậy, cấu trúc sắp xếp dạng khối phân tử của collagen cùng với sợi cơ đã được tìm kiếm tích cực trên 60 năm nay. Cấu trúc của collagen không chỉ có kiểu xoắn bộ ba, mà bao gồm cả các dạng cấu trúc có chứa acid amin và hình thể 3 mắt xích peptid đơn từ đầu đến cuối dạng khối collagen đơn và cấu trúc sợi cơ collagen.

Gần đây, người ta xác định được cấu trúc của phân tử collagen chính xác với dung dịch $5-10\text{\AA}$. Vì cấu trúc này được phát hiện trong môi trường tự nhiên, chính

xác là mô bào, người ta đã xác định được trình tự sắp xếp phân tử của sợi tơ đơn và giải thích rõ cấu trúc của vi sợi collagen.

Collagen là một loại protein tương đối đơn giản gồm có 3 chuỗi amino acid riêng biệt xoắn lại với nhau giống như một sợi dây thừng. Mỗi sợi collagen gồm có hàng nghìn cấu trúc amino acid, chủ yếu gồm có glycine và proline.

Đơn vị cấu trúc của nó là tropocollagen bao gồm 3 mạch polypeptid bện vào nhau thành một dây cáp siêu xoắn (vì mỗi mạch đơn có cấu trúc xoắn, chiều cao của mỗi góc xoắn trên trục siêu xoắn này là $2,9\text{\AA}$, một vòng xoắn là 3,3 góc amino acid). Ba chuỗi polypeptide trong “dây cáp” nối với nhau bằng các liên kết hydrogen. (Đỗ Quý Hai và ctv).

Đầu tiên 3 sợi của collagen này xoắn lại theo kiểu xoắn ốc xung quanh một sợi hình thành nên một bộ ba. Sau đó ba của những bộ này bắt lại với nhau và xoắn xung quanh mỗi bộ ba để hình thành một sợi siêu cáp. Mỗi sợi này cũng liên kết với nhau để tiến lại gần nhau bằng các liên kết ngang. Sự kết hợp này được gọi là một collagen siêu xoắn. Cấu trúc 3 chiều phức tạp này quyết định chức năng sinh học của collagen. (Colway Australia, nd).

Cấu trúc hình thái của protein ở cá dễ bị biến đổi do môi trường vật lý thay đổi. Việc xử lý với nồng độ muối cao hoặc xử lý bằng nhiệt có thể dẫn đến sự biến tính, sau đó cấu trúc protein bị thay đổi không hồi phục được.

Protein mô liên kết ở da cá, bong bóng cá, vách cơ khác nhau. Tương tự như sợi collagen trong động vật có vú, các sợi collagen ở các mô cá cũng tạo nên cấu trúc mạng lưới mỏng với mức độ phức tạp khác nhau. Tuy nhiên collagen của cá kém bền nhiệt hơn nhiều, ít có các liên kết chéo hơn và nhạy cảm hơn collagen ở động vật có máu nóng và có xương sống.

**Bảng 1.4 So sánh thành phần amino acid của phân tử protein có
khối lượng 10 000 ĐVC**

	Collagen	Casein	Albumin	Wool
Glycine	363	30	19	87
Alanine	107	43	35	46
Valine	29	54	28	40
Leucine	28	60	32	86
Isoleucine	15	49	25	-
Serine	32	60	36	95
Threonine	19	41	16	54
Cystine	-	2	1	49
Methionine	5	17	16	5
Aspartic acid	47	63	32	54
Glutamic acid	77	153	52	96
Lysine	31	61	20	19
Hydroxylysine	7	-	-	-
Arginine	49	25	15	60
Histidine	5	19	7	7
Phenylalanine	15	28	21	23

Tyrosine	5	45	9	26
Tryptophan	-	8	3	9
Proline	131	65	14	83
Hydroproline	107	-	-	-

3.2.2 Tính chất của collagen [3], [4], [5], [6:

❖ Tính chất vật lý:

Collagen là một protein không tan trong nước, nhưng có khả năng giãn nở nhẹ. Tỷ lệ giãn nở có giới hạn co giãn khoảng 7% cho sợi ướt và 5% cho sợi khô.

Ở 60°C dưới tác động của acid hay kiềm hoặc muối, collagen ẩm đột ngột, phồng lên, co rút khoảng 1/3 hay 1/4 chiều dài của nó. Và nếu tiếp tục đun collagen sẽ tiếp tục thủy phân thành gelatin.

❖ Tính chất hóa học:

Collagen là chất duy nhất có thể chuyển thành gelatin khi đun sôi với nước nóng, đó là kết quả của sự mở vòng xoắn 3 sợi kèm theo sự phá vỡ liên kết hydro. gelatone và gelatose là sản phẩm phân giải gelatin. Tỷ lệ giữa gelatin, gelatone và gelatose được quyết định bởi nhiệt độ và thời gian nấu.

Collagen bị thủy phân chậm bởi trypsin và pepsin, trong khi đó gelatin dễ bị phân hủy hơn.

Collagen khi thêm cồn, muối hoặc aceton đặc biệt là heparin thì chúng có sợi dày và kết tủa lại.

Collagen tan trong glycerin, acid acetic, ure nhưng không tan trong nước lạnh.

3.3 Phân loại collagen [9]:

Collagen tồn tại ở nhiều bộ phận trong cơ thể. Đã có 29 loại collagen được tìm thấy và thông báo trong các tài liệu khoa học. Trên 90% collagen trong cơ thể là dạng I, II, III và IV.

- Collagen I: Có trong da, gân, mạch máu, các cơ quan, xương (thành phần chính của xương).
- Collagen II: Có trong sụn xương (thành phần chính của sụn).
- Collagen III: Có trong bắp (thành phần chính của bắp), tìm thấy bên cạnh collagen I.
- Collagen IV: Thành phần chính cấu tạo màng tế bào.
- Collagen V: Có trong giác mạc, xương, mạch máu, sụn.
- Collagen VI: Có trong da, cơ tim.
- Collagen VII: Có trong da, phổi, sụn, giác mạc, nhau.
- Collagen VIII: Tạo ra từ tế bào màng trong.
- Collagen IX: Có trong sụn.
- Collagen X: Có trong sụn.
- Collagen XI: Có trong sụn, đĩa đệm cột sống.
- Collagen XII: Có trong gân, dây chằng.
- Collagen XIII: Có trong da, xương.

3.4 Chức năng của collagen [10], [11], [12]:

Protein này là giá đỡ cho các mô và các cơ quan và liên kết các cấu trúc này với xương. Collagen cũng có trong cấu trúc của da. Nó tiêu biểu cho sự khỏe mạnh và độ bền của da, thể hiện qua sự trơn láng, đầy đặn của da khi còn trẻ. Cấu trúc độc

nhất này đã làm cho collagen có sức căng mạnh hơn cả thép. Sự mất cấu trúc 3-D cũng có nghĩa là mất đi sự giúp đỡ của khung sườn của da.

Collagen này có nhiều trong các mô liên kết ở da cá. Tương tự như sợi collagen trong động vật có vú, các sợi collagen ở các mô của cá cũng tạo nên cấu trúc mạng lưới mỏng với mức độ phức tạp khác nhau. Tuy nhiên collagen ở cá kém bền nhiệt hơn nhiều và ít có các liên kết chéo hơn nhưng nhạy cảm hơn collagen ở động vật máu nóng có xương sống. (Phan Thị Thanh Quế.2005)

Collagen là loại protein phổ biến nhất trong cơ thể (chiếm khoảng $\frac{1}{4}$ tổng lượng protein), là protein chính của mô liên kết, là một trong các thành phần chính của da, cơ vân, sụn, dây chằng, gân, xương và răng; đóng vai trò quan trọng trong việc phát triển các mô trong cơ thể và cũng cố thành mạch, tồn tại trong các giác mạc và thủy tinh thể của mắt dưới dạng kết tinh. Lớp bì, lớp đệm trong cùng của da chứa rất nhiều collagen, mà chính các sợi collagen này tạo ra một hệ thống nâng đỡ, hỗ trợ cho các đặc tính cơ học của da như sức căng, độ đàn hồi, duy trì độ ẩm...

3.5 Ứng dụng của collagen:

Ngày nay collagen được ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực đặc biệt là lĩnh vực y học và trong các ngành khoa học khác. Ví dụ như các sản phẩm bông gạc làm từ collagen của tập đoàn Suwelack sẽ giúp các vết thương nhanh lên da non và mau lành sẹo, các mỹ phẩm giúp làm đẹp da mặt cho phụ nữ...

3.5.1 Ứng dụng collagen trong thực phẩm:

- ✓ Sản xuất sợi collagen làm thực phẩm.
- ✓ Sản xuất collagen vi tinh thể.
- ✓ Những ứng dụng của collagen giống như gelatin:

Collagen được ứng dụng rộng rãi dưới dạng gelatin:

+ Thực phẩm (Gattoffer, 1945; Idson và Braswell, 1957):

- Dựa vào tính chất tan chảy ở nhiệt độ cao và đông đặc ở nhiệt độ thấp người ta ứng dụng trong thực phẩm đông lạnh. Lúc này Gelatin đóng vai trò là một chất keo bảo vệ ngăn chặn sự kết tinh của đường.



Hình 1.2: Thực phẩm có chứa gelatin

- Trong kem và phomát mềm, gelatin ngăn chặn sự mất nước. Ngoài ra trong sản phẩm bơ sữa gelatin đóng vai trò quan trọng trong việc tạo độ mịn, độ sánh cho sản phẩm. Trong kẹo dẻo, gelatin cung cấp cho sản phẩm độ dẻo và dai.

+ Dược phẩm (Chvapil và cộng sự, 1973; Wood, 1977)

- Gelatin được sử dụng trong sản xuất bao con nhộng cứng hay mềm. Nó có tác dụng bảo vệ thuốc chống những tác nhân có hại như ánh sáng và oxi. Thành phần chính của vỏ là Gelatin và các tá dược khác như: glycerol hay sorbitol, những chất hoạt động bề mặt, chất màu cho phép, hương liệu....



Hình 1.3 Những nang thuốc có chứa gelatin

+ **Kỹ thuật chụp ảnh (Cox, 1972; Rose, 1977):**

- Nguyên liệu chụp ảnh chứa nhiều lớp gelatin được bao phủ lên phim hoặc giấy.
- Gelatin vận dụng hơn một trăm năm nay như là chất kết dính, chức năng của gelatin hữu ích trong việc sản xuất phim ảnh.

3.5.2 Ứng dụng collagen trong y học và dược phẩm:

a Collagen dạng sợi:

Collagen dạng sợi được dùng trong việc làm lành các vết thương, vết mổ trong phẫu thuật. Sợi collagen có thể được xử lý để tạo cấu trúc sợi thẳng, dài dùng làm những sản phẩm y học cho gân và dây chằng.

b Màng mỏng collagen:

Collagen dạng màng và lớp mỏng được sử dụng để giữ cố định các vật chất sinh học, dùng trong sự tái tạo các mô, nối kết lại võng mạc, làm vật thay thế lớp màng cứng của não.....Nó còn được dùng cho việc tái tạo dây thần kinh, khôi phục màng nhĩ, sụn và xương, có tác dụng phục hồi các vết thương.

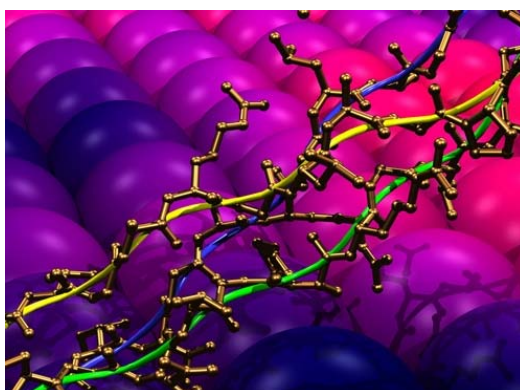
3.5.3 Ứng dụng collagen trong mỹ phẩm [10], [11], [12], [15]:

Collagen đặc biệt quan trọng trong cơ thể, collagen có trong kem dưỡng da, trong mặt nạ dưỡng da, các loại sữa tắm, dầu gội đầu....

Là một loại protein chiếm tới 25% tổng lượng protein trong cơ thể người, collagen có chức năng chính là kết nối các mô trong cơ thể lại với nhau. Nó giống như một chất “keo” dính các bộ phận trong cơ thể người lại thành một khối hoàn chỉnh, nếu không có chúng cơ thể người sẽ chỉ là các phần rời rạc. Chỉ riêng điều này cũng đã chỉ ra tầm quan trọng của collagen đối với sự sống của con người.

Riêng với làn da, ngoài nhiệm vụ liên kết collagen còn có nhiệm vụ tạo sự đàn hồi. Đây chính là lý do tại sao collagen ở da có định dạng khác so với collagen ở các bộ phận khác. Các liên kết sợi collagen ở da lỏng hơn nhằm làm tăng sự đàn hồi và tính linh hoạt của collagen, tuy nhiên cũng vì vậy mà chúng dễ bị tổn thương hay đứt gãy do tác động bên ngoài.

Collagen của da khoẻ mạnh và liên kết tốt sẽ giúp da có sự đàn hồi như không bị rạn khi mang thai, không bị da thừa khi giảm cân, không bị nếp nhăn khi chuyển động cơ lặp đi lặp lại, không bị chùng nhão da mặt và không bị sẹo sau tổn thương. Chính vì vậy, collagen đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong sức khỏe cũng như sắc đẹp của con người.



Hình 1.4 Các liên kết sợi ở collagen

Trước kia muốn sử dụng collagen các bác sĩ phải lấy chúng ngay trên cơ thể từ vùng này dùng cho vùng khác. Tuy nhiên phương pháp này quá tốn kém và phức tạp. Ngày nay, công nghệ thẩm mỹ hiện đại đã nghiên cứu và ứng dụng thành công một số loại collagen từ động vật như da bò, da lợn, cá da trơn và một số loại thực vật để cho ra đời collagen nhân tạo có hiệu quả điều trị thẩm mỹ rất tốt.

Collagen phục hồi: thường được sử dụng trong trường hợp da bị tổn thương hoặc trong giai đoạn tái tạo sau khi điều trị nám, mụn trứng cá, sẹo, rạn da và tiêu da thừa sau khi giảm béo. Sản phẩm Phials of Collagen and Elastin với các thành phần chính là collagen, elastin và vitamin E, trong đó collagen được chiết xuất từ da heo giúp kích thích tế bào và sửa chữa các khuyết khuyết ở mô nhờ đó phục hồi khả năng đàn hồi của da. Ngoài ra, sản phẩm còn có thể điều trị các vết rạn do tăng cân hay mang thai.

Collagen trẻ hoá: được sử dụng cho những phụ nữ từ 35 tuổi bắt đầu có dấu hiệu lão hoá với sự xuất hiện của các nếp nhăn, da bị mất nước, chùng nhão, chảy xệ không còn căng mịn như trước nữa, màu sắc da cũng trở nên sạm lại. Sản phẩm Beautee Collagen Cell Pure với hàm lượng collagen nguyên chất lên tới 25%, có

khả năng bổ sung và duy trì độ ẩm cho da, cung cấp dinh dưỡng và bảo vệ da chống lại môi trường ô nhiễm bên ngoài. Ngoài ra, sản phẩm còn có khả năng xoá bỏ các nếp nhăn nông, cải thiện và làm mờ các nếp nhăn sâu do tuổi tác, phục hồi lại khả năng đàn hồi tự nhiên cho da, ngăn chặn sự hình thành nếp nhăn trên da, thúc đẩy trẻ hoá tế bào theo cơ chế tự nhiên.

Collagen phục hồi liên kết cơ: thường được sử dụng trước khi đắp mặt nạ và được đưa sâu vào lớp màng đáy của da bằng dòng xung điện hoặc máy đẩy dưỡng chất Led Medicare. Phương pháp này chỉ định cho những người cần có trị liệu sâu do da lão hoá quá lâu hoặc nếp nhăn do chuyển động quá nhiều. Sản phẩm chỉ được dùng trong các MedicalSpa.

Collagen trong kem dưỡng da. Trong các sản phẩm dưỡng da cho độ tuổi ngoài 30 đều bổ sung hàm lượng collagen, tuy nhiên chỉ chiếm một phần rất nhỏ trong việc khôi phục chuỗi collagen và elastin yếu ớt trên da. Do vậy, để thực sự điều trị đàn hồi của da, bạn cần có những sản phẩm collagen chuyên nghiệp nhất. Theo đánh giá của hiệp hội sức khoẻ Hoa Kỳ, nồng độ collagen từ 18 - 27% được coi là chất lượng cao. Một khoá trị liệu collagen tối thiểu 12 lần sẽ giúp bạn xoá nếp nhăn và làm săn chắc cơ mặt hoàn hảo nhất, có thể kết hợp với các công nghệ thẩm mỹ tiên tiến khác như sóng radio, RF, sóng xung điện, IPL để collagen phát huy hết khả năng "cải lão hoàn đồng".

3.6 Các yếu tố ảnh hưởng tới collagen [2], [3], [4], [5], [6]:

3.6.1 Ảnh hưởng của pH:

Độ tan của collagen thấp nhất ở $pH = pI$ của nó, độ tan của collagen tăng lên khi pH nằm xa vì khi $pH = pI$ thì phân tử collagen không tích điện nên chúng không có lực đẩy tĩnh điện và dễ bị đông kết. Khi pH khác thì các phân tử collagen tích điện cùng dấu và đẩy nhau cho nên không bị đông kết, do đó độ tan tăng lên. pH đẳng điện của collagen ($pH = 5-7$).

3.6.2 Ảnh hưởng của nồng độ muối:

Muối trung tính ở nồng độ thấp làm tăng độ tan của collagen. Khi tăng nồng độ muối tới một giới hạn nhất định thì độ tan của collagen giảm xuống và nếu nồng độ muối tiếp tục tăng lên thì collagen có thể đông kết hoàn toàn.

3.6.3 Ảnh hưởng của dung môi:

Khi cho các dung môi như cồn, benzen, aceton, chloroform ... vào dung dịch collagen thì độ tan của collagen bị giảm và có thể dẫn đến đông kết do phá vỡ lớp vỏ thủy hóa.

3.6.4 Ảnh hưởng của không khí:

Ở các tuổi khác nhau, trong cơ thể sống hay trong ống nghiệm, không khí có một vai trò trong sự thay đổi cấu trúc hóa học của collagen (Sobel và Hansen, 1989). Sự oxy hóa sẽ làm thay đổi cấu trúc phân tử của các protein, nguyên nhân là do sự thay đổi về mặt hóa học và các liên kết của vài amino acid đã vượt quá thời gian.

3.6.5 Ảnh hưởng của nước:

Nước ảnh hưởng đến collagen theo những con đường khác. Nó giữ vai trò trực tiếp trong các biến đổi hóa học của collagen thông qua sự thủy phân, sự hydrat hóa của các gốc tự do, sự ổn định của các liên kết hydro và tỷ lệ của sự hình thành gelatin.

Bowes và Raistrick (1976) đã nghiên cứu ảnh hưởng của mối liên hệ của độ ẩm và pH lên phạm vi suy giảm thủy phân của collagen bằng sự phóng thích nitơ còn dư ở giai đoạn cuối. Ở 40°C trong tám tuần, sự thủy phân collagen tăng lên với sự tăng độ ẩm (từ 40% lên 80%) và giảm pH (từ 5,0 xuống 2,5). Họ kết luận rằng khi sự suy giảm thủy phân càng tiến xa, thì sự biến tính sẽ kéo theo và lần lượt tăng lên hơn là sự hoạt động thủy phân.

3.6.6 Ảnh hưởng của nhiệt độ:

Đo lường ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự hư hỏng của collagen bị cản trở bởi vì có sự hao hụt nhiệt độ ở tại hoặc trên nhiệt độ đo lường đưa ra những kết quả

không đáng tin cậy (Bowes và Raistrick, 1964). Mối quan tâm đặc biệt là collagen bị hư hỏng về mặt vật lý và hóa học sẽ bị hư hỏng ở tỷ lệ nhanh hơn, nhưng điều này đã không được chứng minh và là một nội dung cho việc nghiên cứu sâu hơn. Như ta đã biết, sự biến tính phá hủy collagen được điều khiển bởi ít các điều kiện hơn là sự biến tính đầu tiên khi collagen còn nguyên vẹn. Tính toàn vẹn về mặt vật lý và hóa học của collagen có thể được biểu thị qua sự ổn định thủy nhiệt, cả khi giảm nhiệt độ sai lệch đối với các sợi đã bị hư hỏng (Young, 1990).

4 Các phương pháp tách chiết Collagen [2], [3], [4], [6]:

4.1 Khái niệm:

Trong các tổ chức của cơ thể sống, protein có thể ở dưới dạng tự do trong các dịch sinh vật hoặc dưới dạng kết hợp, hoặc bị cầm trong các tế bào. Hơn nữa, trong các tế bào có chứa hàng nghìn loại protein khác nhau, nếu ta cần nghiên cứu từng loại protein, trước hết phải chiết rút và tinh sạch chúng. Chính vì vậy, các kỹ thuật chiết rút, tinh sạch và nghiên cứu protein luôn ở vị trí trung tâm của các nghiên cứu hóa sinh và luôn được cập nhật và hiện đại hóa.

4.2 Các biện pháp cần thiết để nhận protein nguyên thể:

Các phương pháp chiết rút và tinh sạch protein đều dựa trên những tính chất hóa lý của protein như độ tích điện, kích thước phân tử, độ hòa tan... của protein cần chiết rút. Nhiều protein còn liên kết với các phân tử sinh học khác nên việc chiết rút các protein này còn phụ thuộc vào bản chất của các liên kết. Muốn thu nhận được các protein nguyên thể tức là protein có tất cả tính chất tự nhiên đặc trưng của nó, cần sử dụng các biện pháp khác nhau.

4.2.1 Nồng độ proton (pH):

Protein là các chất lưỡng tính, vì vậy trong các dung dịch acid và kiềm chúng sẽ bị phân ly như sau:

- Do các acid amin trong chuỗi polypeptide còn tồn tại nhiều nhóm chức tự do dưới dạng các ion hóa là nguyên nhân tạo ra tính đa điện của protein. Phân tử protein rất dài nên nhóm ion tự do tận cùng của chuỗi polypeptide không đáng kể, chủ yếu các

nhóm chức tự do khác của chuỗi bên (R) quyết định tính chất tích điện của phân tử protein (nhóm cacboxyl của amino acid, OH của Tyrosine, $-NH_2$ của lysine, guamidin của Arginine, imidazol của histidine). Mức độ ion hóa của các nhóm này phụ thuộc vào giá trị pH. Các nhóm acid ở dạng anion trong môi trường kiềm, các nhóm kiềm tồn tại ở dạng cation trong môi trường acid.

Như vậy, ở một giá trị pH xác định, mỗi phân tử protein có một điện tích tổng số nào đấy mà độ lớn của nó phụ thuộc vào số lượng các nhóm tích điện dương và tích điện âm. Kết quả là ở giá trị nồng độ ion hydro cố định, các protein khác nhau trong hỗn hợp sẽ có tổng điện tích khác nhau. Nhiều phương pháp dùng để tách các hỗn hợp protein đều dựa vào đặc tính này. Các phân tử protein mang điện tích tổng số (dương hoặc âm) cùng đẩy nhau ra xa nên dễ tan vào dung dịch. Mỗi một protein có một giá trị pH nhất định mà ở đó tổng số điện tích âm và điện tích dương trong phân tử bằng 0. Giá trị đó gọi là điểm đẳng điện của protein. Điểm đẳng điện của các acid amin trung tính có giá trị pH từ 5,6-7,0; đối với các acid amin có tính acid (dicarboxylic) là từ 3,0-3,2; đối với các acid amin có tính kiềm (diamino) là từ 9,7-10,8. Ở điểm đẳng điện, độ hòa tan của protein là thấp nhất, protein dễ bị kết tủa. Dựa vào tính chất này, người ta có thể tách từng phần các protein enzyme trong hỗn hợp.

Cũng giống như trường hợp tác dụng của nhiệt độ trong việc tách chiết protein, có thể dùng phương pháp biến tính chọn lọc nhờ tác dụng của pH của môi trường. Dịch chiết protein enzyme được giữ ở pH = 5 trong thời gian xác định. Protein tạp bị biến tính cũng được loại bỏ bằng cách lọc hoặc ly tâm. Ví dụ cytochrom C cũng tan trong acid trichloroacetic trong khi đó acid này làm kết tủa phần lớn protein. Như vậy các protein bền với acid có thể được tách chiết bằng cách này.

4.2.2 Tác nhân hóa học:

Có thể dung muối trung tính hoặc các dung môi hữu cơ để tách chiết các protein. Phương pháp này được tiến hành dựa trên cơ sở: độ hòa tan của protein phụ thuộc vào sự tương tác của các nhóm tích điện trong phân tử protein với các phân tử nước. Sự tương tác đó (còn gọi là sự hydrat hóa) sẽ bị giảm xuống khi thêm vào

dung dịch protein các dung môi hữu cơ hoặc các muối trung tính. Dung môi hữu cơ thường dùng là etanol, isopropanol, acetone hoặc hỗn hợp các loại rượu.

4.3 Phá vỡ tế bào và chiết rút protein:

4.3.1 Phá vỡ tế bào:

Có thể phá vỡ cấu trúc của tế bào bằng các biện pháp cơ học như nghiền với bột thủy tinh hoặc cát thạch anh, làm đồng hóa bằng thiết bị nghiền đồng thể (homogenizator). Thiết bị này có chày thủy tinh gắn với một motor quay và có thể điều chỉnh được tốc độ quay theo yêu cầu. Các tế bào giữa chày thủy tinh và thành cối sẽ bị phá hủy.

Để việc phá hủy có hiệu quả, trước khi nghiền người ta thường thái nhỏ mẫu vật để vào ngăn đá hoặc cho trương nước. Còn ở các mô của động vật như gan hoặc thận, khi chiết protein người ta cần cắt bỏ các mô liên kết.

Muốn tách được các protein trong các cấu tử của tế bào, người ta còn phải dùng các yếu tố vật lý và hóa học khác nhau như sóng siêu âm, dùng các dung môi hữu cơ như butanol, acetone, glycerin, ethylacetat, ... và chất tẩy (detergent). Các hóa chất tốt cho việc phá vỡ các bào quan của tế bào vì trong các cơ quan này thường chứa mỡ.

4.3.2 Chiết rút protein:

Sau khi đã phá vỡ cấu trúc của các tế bào tiến hành chiết xuất các protein bằng các dung dịch đệm thích hợp, dung dịch muối trung tính hoặc bằng ly tâm tách tế bào đối với các protein ngoại bào: việc chọn phương pháp tách chiết protein tùy thuộc vào tính chất của protein cần nghiên cứu.

4.4 Tinh sạch protein:

4.4.1 Loại các tạp chất:

Trong dịch chiết thô thu được ngoài protein cần thiết còn có các protein tạp, các chất cao phân tử khác như polysaccharid, acid nucleic và các chất phân tử nhỏ như đường monose, các chất lipid, muối khoáng... Để loại bỏ chúng phải sử dụng

phối hợp nhiều biện pháp khác nhau. Để loại bỏ muối khoáng và các loại đường... là các tạp chất có phân tử lượng thấp người ta thường dùng phương pháp thẩm tích (dialysis) đổi nước hay đổi các dung dịch đệm loãng hoặc bằng cách lọc qua gel sephadex. Để loại bỏ các protein tạp và các tạp chất có phân tử lượng cao khác, người ta hay dùng kết hợp nhiều biện pháp khác nhau: phương pháp biến tính chọn lọc nhờ tác dụng của nhiệt độ hoặc pH của môi trường, phương pháp kết tủa phân đoạn bằng muối trung tính hoặc các dung môi hữu cơ, các phương pháp sắc ký trao đổi ion, điện di, phương pháp lọc gel.

4.4.2 Các kỹ thuật thông thường trong tinh sạch protein:

Như trên đã trình bày, sau khi nhận được dịch chiết protein thô, người ta thường sử dụng các phương pháp khác nhau để tách chiết và đồng thời làm tinh sạch protein. Ngoài các kỹ thuật đã được giới thiệu cụ thể ở các phần trên, có thể sử dụng các phương pháp dưới đây phục vụ cho việc tinh sạch các protein.

4.4.2.1 Ly tâm:

Một trong những kỹ thuật không thể thiếu được trong việc tách chiết và tinh chế protein là ly tâm.

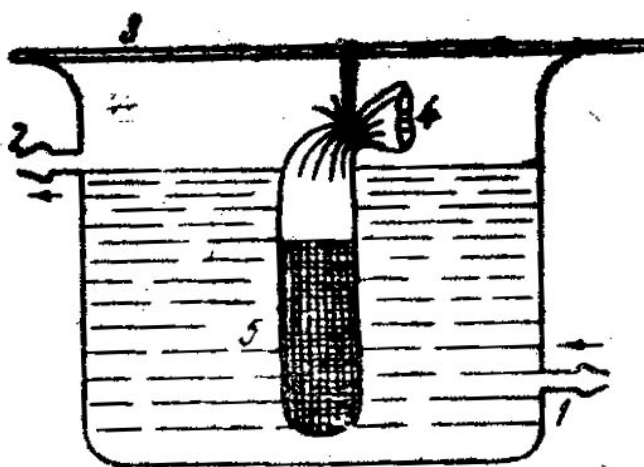
Máy ly tâm được sử dụng để tách các phần khác nhau khỏi dung dịch. Người ta gọi pha lỏng là chất lỏng bên trên kết tủa, pha rắn mà thường lắng kết xuống đáy ống ly tâm được gọi là kết tủa. Thực chất, sự ly tâm tăng tốc độ kết tủa của những tiểu phần rắn nhờ lực ly tâm. Sự sai khác về tỷ trọng của nguyên liệu lơ lửng so với chất lỏng càng lớn thì tốc độ kết tủa sẽ càng cao. Do tính chất không bền với nhiệt của phần lớn các protein, khi tách chiết tinh chế chúng, cần sử dụng máy ly tâm lạnh. Trong trường hợp điều kiện thí nghiệm có hạn chế, có thể sử dụng một số phương pháp nhằm đảm bảo duy trì mẫu ở nhiệt độ thấp. Cần làm lạnh tốt mẫu và ống ly tâm trước khi ly tâm. Nếu trong máy có các ổ đệm thay thế có thể làm lạnh chúng trong tủ lạnh trước khi ly tâm. Cần phải tiến hành ly tâm với thời gian tối thiểu để tránh nóng máy. Có thể đặt trực tiếp máy ly tâm bé vào tủ lạnh, đưa dây dẫn ra ngoài qua lớp đệm của cánh cửa tủ lạnh.

4.4.2.2 Thẩm tích:

Thẩm tích là sự khuếch tán vi phân qua màng vốn không thấm đối với những chất keo hòa tan (protein, một số các polysacharid) nhưng thấm đối với các dạng dịch các tinh thể. Các tinh thể (các muối, các hợp chất hữu cơ có trọng lượng phân tử thấp ...) có thể khuếch tán qua màng theo định luật Fick. Nước sẽ khuếch tán từ dung dịch có nồng độ thấp hơn (thường chuyển vào dung dịch rửa). Trong quá trình tách chiết và tinh sạch protein, để loại muối ammonium sulphate ra khỏi dung dịch protein thì cho dung dịch protein vào các túi đặc hiệu làm bằng nguyên liệu bán thấm. Thông thường người ta hay dùng túi colodion hoặc cellophane (loại sau hay được dùng hơn). Sau đó đặt cả túi vào bình chứa lượng lớn nước hoặc lượng lớn dung dịch đệm đã được pha loãng (ví dụ đệm phosphate có $\text{pH} = 7$, nồng độ 0,01M). Vì màng cellophane là màng bán thấm, có kích lỗ chỉ cho các chất có phân tử đi qua vào các dung dịch đệm loãng theo định luật khuếch tán. Như vậy, muối sẽ khuếch tán vào nước hoặc dung dịch đệm loãng (di chuyển theo hướng giảm nồng độ), còn nước hoặc đệm loãng sẽ di chuyển từ dung dịch rửa vào túi chứa protein. Protein là những đại phân tử không thể vượt qua túi thẩm tích và được giữ lại trong túi. Bằng cách thay đổi thường xuyên dung dịch rửa có thể tẩy sạch muối ra khỏi protein, mặc dầu trong quá trình thẩm tích, nó là dung dịch được pha loãng hơn. Có thể làm giảm bớt hoặc loại trừ sự pha loãng như thế khi tiến hành thẩm tích dưới áp suất, có nghĩa là khi dung dịch được xử lý nằm dưới một áp suất thủy tĩnh đầy đủ, để dòng thủy động của nước từ dung dịch sẽ cân bằng sự khuếch tán của các phân tử vào dung dịch. Phương pháp này thường đòi hỏi có thiết bị đặc hiệu.

Phương pháp thẩm tích thông thường là cho dung dịch có kết tủa protein vào túi thẩm tích (không quá 2/3 thể tích túi). Cho thuốc sát trùng hoặc toluen để bảo quản protein (vì thời gian thẩm tích lâu, protein có thể bị thối hỏng). Buộc túi vào một que thủy tinh, gác que thủy tinh lên miệng chậu nước để giữ túi ở giữa chậu. Cho vòi nước chảy nhẹ liên tục vào đáy chậu để thay đổi nước thường xuyên. Muối hòa

tan trong nước và bị loại dần. Thời gian thẩm tích có thể từ 24 – 48 giờ, làm thẩm tích lần cuối cùng bằng nước cất.



Hình 1.5 Thẩm tích để loại muối trong kết tủa protein.

Có thể tăng tốc độ thẩm tích khi khuấy dung dịch rửa bằng máy trộn cơ học hay máy trộn từ hoặc là quay chậm túi nhờ động cơ không lớn. Khi thẩm tích các protein thường người ta tiến hành tất cả các thao tác ở môi trường lạnh.

4.4.2.3 Sắc ký lọc gel:

Sắc ký lọc gel là một trong những kỹ thuật sắc ký cột được dùng phổ biến trong tách chiết và tinh sạch protein.

Dịch chiết protein enzyme đã được loại bỏ phần lớn các protein tạp nhưng vẫn chưa đảm bảo độ đồng nhất cần thiết được tiếp tục làm sạch bằng phương pháp sắc ký cột. Phương pháp sắc ký (chromatography) có nghĩa là viết bằng màu. Thuở ban đầu, người ta sử dụng phương pháp sắc ký để tách các chất màu và chỉ sau này người ta áp dụng cho việc tách các chất không màu.

Sắc ký lọc gel còn được gọi là phương pháp dùng chất rây phân tử, lọc gel (gel filtration).

Cơ sở của phương pháp lọc gel là dựa vào sự khác nhau về kích thước, hình dạng và phân tử lượng của protein enzyme có trong hỗn hợp để tách chúng ra.

Để đảm bảo cho việc tách protein enzyme được tốt, chất rây phân tử phải là chất trơ, không phản ứng với protein enzyme. Chất này cũng không hòa tan và tương đối bền với các yếu tố về cơ học cũng như sinh học. Ngoài ra chất được sử dụng cho mục đích lọc phân tử phải là chất không có tính đàn hồi (không co) và phải là chất ưa nước (hidrofil).

Gel sephadex là chất thỏa mãn các yếu tố trên. Sephadex là chế phẩm dextran của các loài vi sinh vật khác nhau là *Leuconostoc* tạo ra khi chúng được nuôi cấy trên môi trường chứa sacharose. Trọng lượng phân tử của dextran có thể đạt tới hàng triệu và lớn hơn. Phân tử dextran bao gồm các chuỗi do các gốc glucose tạo thành các liên kết 1,6. Sephadex nhận từ dextran bằng cách xử lý hóa học (do tác dụng của epichlorhydrin) để tạo ra các lưới phân nhánh có liên kết ngang gọi là “sàng phân tử” và chất này trở thành không tan trong nước. Số liên kết ngang tạo ra càng nhiều, kích thước của lỗ sàng phân tử càng nhỏ.

Phương pháp lọc phân tử trên Sephadex được tiến hành như sau: cho sephadex vào cột thủy tinh dài và cân bằng dung dịch đệm có pH nhất định. Sau đó cho dung dịch protein enzyme lên cột. Khi lọc và chiết bằng dung môi thích hợp, các phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ (ở đây là các muối) sẽ khuếch tán chậm chạp qua các lỗ của các hạt sephadex bị trương phồng, còn chất có trọng lượng phân tử lớn hơn (ở trường hợp này là protein enzyme) không có khả năng đi vào mà lách nhanh qua các hạt sephadex và sẽ được chiết nhanh ra khỏi cột. Vì vậy ta có thể tách được chất có trọng lượng phân tử cao hơn thoát ra khỏi cột gel trước so với chất có phân tử lượng nhỏ.

Người ta còn sử dụng sephadex để loại muối thay cho quá trình thẩm tích. Cùng nhóm chất rây phân tử có nguồn gốc polysaccharide, là chế phẩm dextran như sephadex (pharmacia) còn có molselect (Reanal) – là sản phẩm của Hungary được ứng dụng nhiều trong nghiên cứu.

Có thể dùng để làm cô đặc các chất có trọng lượng phân tử lớn như protein, peptide, loại muối khỏi protein enzyme (dùng nhanh hơn so với thẩm tích), lọc gel tách theo trọng lượng phân tử (như protein huyết thanh) hoặc tách các sản phẩm protein được

hình thành dưới tác dụng của enzyme phân cắt. Ngoài nhóm chất rây phân tử là chế phẩm dextran còn có nhóm chất rây phân tử là chế phẩm gel acrilamid bao gồm Biogel và Acrilex.

Tóm lại bằng phương pháp lọc rây phân tử người ta có thể tách các chất có trọng lượng phân tử khác nhau có trong hỗn hợp (như polymer, polysacharide, acid nucleic, protein). Người ta có thể dùng kỹ thuật này để loại muối thay cho quá trình thẩm tích. Và hơn thế nữa, trong quá trình tinh chế protein enzyme, chúng còn được sử dụng để cô đặc dung dịch protein enzyme.

4.4.2.4 Phương pháp sắc ký trao đổi ion:

Phương pháp sắc ký trao đổi ion dựa vào sự khác nhau về điện tích tổng số của các protein enzyme. Hay nói cách khác, phương pháp này dựa trên cơ sở của phản ứng trao đổi ion giữa protein được tan ra trong nước hoặc dung dịch đệm loãng và các tác nhân trao đổi ion. Tác nhân (hay nguyên liệu) trao đổi ion có thể là chất nhựa có tích nhóm sinh ion hoặc là chất ionit. Đây là những chất giá đỡ, không tan trong nước, có bản chất là cellulose hoặc chất gel dextran có lưới phân nhánh (Sephadex, Molselect) hoặc là chất nhựa polystirol. Chất giá thể này thường kết hợp với các nhóm ion hóa. Các chất trao đổi ion có chất giá là cellulose, sephadex, molselect thông thường được dùng để tách protein enzyme, còn các chất trao đổi ion có chất giá là polystirol (ví dụ như Dowex, Amberlite) chỉ dùng để tách các peptide có trọng lượng phân tử nhỏ hơn.

4.4.2.5 Phương pháp dùng chất hấp phụ đặc hiệu sinh học hay là phương pháp sắc ký ái lực (affinity Chromatography):

Cơ sở của phương pháp này là người ta gắn những phân tử gắn (ligand) vào chất mang (chất giá) rắn bằng liên kết cộng hóa trị mà protein enzyme cần tách sẽ tương tác đặc hiệu với nó. Những chất đó có thể là cơ chất (Substrate) hoặc chất ức chế (inhibitor) cạnh tranh. Trong trường hợp hai chất kháng nguyên và kháng thể có ái lực liên kết đặc hiệu với nhau, người ta thay thế vị trí chất gắn vào giá giữa kháng nguyên và kháng thể để nghiên cứu từng loại giống như cơ chất, chất ức chế và

enzyme đặc hiệu của chúng. Hay nói cách khác dùng chất chỉ có khả năng liên kết đặc hiệu với một enzyme hoặc protein ta nghiên cứu. Chất mang thể rắn có thể là bất kỳ một loại nào phục vụ cho lọc gel như sephadex, nhưng người ta hay sử dụng nhất là gel Sepharose. Ở trên cột giá thể hay chất mang chứa cơ chất cố định ở pH và lực ion phù hợp, chỉ có protein enzyme nào có khả năng chuyển hóa cơ chất mới gắn vào, các protein khác thì chảy xuống cột. Bằng cách thay đổi pH và lực ion phù hợp hoặc có thể bằng cách thêm chất ức chế cạnh tranh đã được hòa tan vào thì có thể tách được protein enzyme khỏi cột ở trạng thái sạch.

4.4.2.6 Làm khô và bảo quản chế phẩm protein:

Tính cố định cấu trúc của protein được đảm bảo nhờ khả năng liên kết nước của chúng. Nếu dung dịch protein enzyme bị khô ở nhiệt độ trong phòng thì đa số protein enzyme bị biến tính. Protein enzyme chỉ có thể được giữ ở dạng khô trong trường hợp nếu việc sấy khô được tiến hành vô cùng nhanh hoặc ở nhiệt độ thấp. Nhiều protein như chúng ta đã biết, ở nhiệt độ thấp có thể kết tủa bằng rượu hoặc acetone. Nếu kết tủa thu được bằng cách đó đem xử lý bằng rượu tuyệt đối, bằng acetone hoặc bằng ether và sau đó làm khô thật nhanh thì protein sẽ không bị biến tính. Ở dạng khô, bột protein có thể giữ một thời gian lâu, khi hòa tan nó trong nước nó thể hiện những tính chất ban đầu của mình.

Tuy nhiên, nhiều protein không chịu được cách xử lý như vậy. Vì vậy, người ta sử dụng phương pháp làm đông khô là phương pháp làm khô protein thận trọng nhất, phương pháp này có thể sử dụng được cho hầu hết protein. Dung dịch protein đã được thẩm tích được làm đông băng và làm thăng hoa băng ở áp suất 0,01-0,001 mmHg (được tạo ra nhờ máy hút chân không mạnh). Hơi nước được tạo ra đều được đông băng trong bầu dự trữ ở nhiệt độ thấp hơn ($70-80^{\circ}\text{C}$). Sau một vài giờ chỉ còn lại bột protein. Sau đó bột này (trong chân không) có thể được giữ ở nhiệt độ cao hơn. Protein đã được làm đông khô bằng cách như thế khi hòa tan trong nước cất sẽ cho dung dịch protein (nguyên thể) ngay sau một vài năm. Người ta đã bảo quản huyết thanh máu bằng phương pháp như thế, huyết thanh khô này có thể được sử dụng trong mục đích truyền máu.

5 Các phương pháp phân tích đặc tính lý – hoá của nguyên liệu và collagen [2],[5]:

5.1 Các phương pháp xác định hàm lượng protein:

- Định lượng nitrogen theo phương pháp kjeldahl:

Phần lớn các phương pháp gián tiếp xác định protein đều dựa trên cơ sở xác định lượng nitrogen. Lượng nitrogen có trong các protein là gần giống nhau không phụ thuộc vào chất lượng và nguồn protein. Đương nhiên trên cơ sở lượng nitrogen có thể xác định chỉ các protein đã được tinh sạch hoặc lượng protein của các mẫu nghiên cứu mà ngoài protein ra không chứa những chất chứa nitrogen khác. Trong nông nghiệp và công nghiệp thực phẩm, protein thô được định lượng bằng cách xác định lượng nitrogen toàn phần và kết quả nhân với 6,25, nghĩa là coi protein luôn luôn chứa 16% nitrogen. Thực tế, trong thực phẩm, bên cạnh protein còn có những chất hữu cơ khác có chứa nitrogen như amid, alcaloid, acid nitric... do đó hàm lượng nitrogen toàn phần chính thức cao hơn 16% (16-17%) nhưng ở protein thực vật thì hàm lượng này lại thấp hơn 16%. Hệ số 6,25 là hệ số trung bình thô. Trong một vài trường hợp, muốn có kết quả chính xác, nên dùng những hệ số đặc biệt.

Nguyên lý của phương pháp này là vô cơ hoá mẫu bằng H_2SO_4 đậm đặc và chất xúc tác. Dùng một kiềm mạnh (NaOH hoặc KOH) đẩy NH_3 từ muối $(NH_4)_2SO_4$. Sau đó hứng NH_3 vào dung dịch acid có nồng độ xác định. Sau đó dùng kiềm có nồng độ xác định để chuẩn độ acid dư. Từ đó tính được lượng nitrogen có trong nguyên liệu.

- Định lượng protein theo phương pháp Lowry:

Phương pháp này dựa trên cơ sở dùng máy đo màu để xác định màu sản phẩm khử của phosphomolipden - phosphowolframata (thuốc thử Folin - Ciocalteu) với phức hợp đồng - protein. Phức màu xanh tạo thành có thể đo ở bước sóng 675nm. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỷ lệ thuận với nồng độ protein. Dựa vào đồ thị chuẩn protein (thông thường dùng tinh thể albumin huyết thanh bò) ta có thể tính được hàm lượng protein trong mẫu nghiên cứu.

Phương pháp Lowry được dùng rộng rãi để xác định nhiều loại protein khác nhau. Phương pháp này có độ nhạy cao, cho phép phát hiện được protein trong dung dịch ở nồng độ 1mg/ml. Tuy nhiên cường độ màu còn tùy thuộc nhiều vào loại protein. Ví dụ, ở cùng một nồng độ, dung dịch trypsin cho cường độ màu cao gấp 3 lần gelatin, hemoglobin cho cường độ màu thấp hơn trypsin nhưng cao hơn gelatin.

Ngoài ra, nhiều chất khác có thể làm tăng hay giảm cường độ màu phản ứng, vì vậy phương pháp này cho kết quả chính xác khi xác định protein đã được tinh sạch.

- Định lượng protein bằng phương pháp quang phổ:

Phương pháp đơn giản nhất để đo nồng độ protein trong dung dịch là độ hấp thụ tia cực tím của nó. Nếu protein tinh sạch thì nồng độ tuyệt đối của nó được tính theo giá trị đo được. Nếu protein không tinh sạch (ví dụ, dịch chiết từ một sắc ký) thì nồng độ của protein tổng được tính tương đối từ độ hấp thụ. Nguyên tắc của phương pháp này là các protein hấp thụ tia cực tím cực đại ở bước sóng 280nm do các acid amin thơm như tryptophan, tyrosine và phenylalanine. Độ hấp thụ ở 280nm thay đổi tùy loại protein nhưng hệ số tắt đo được (nghĩa là độ hấp thụ của dung dịch protein 1% với đường sóng truyền qua 1cm) cho mỗi protein cho phép tính nồng độ của protein tinh sạch.

Với một hỗn hợp các protein hoặc với bất cứ một loại protein nào mà không biết hệ số tắt thì nồng độ protein được tính như sau:

$$\text{Nồng độ protein (mg/ml)} = 1,55 \times A_{280} - 0,77 \times A_{260}$$

Trong đó: A_{280} : độ hấp thụ ở bước sóng 280nm.

A_{260} : độ hấp thụ ở bước sóng 260nm.

Phương pháp này không dùng được cho các dung dịch có nồng độ protein thấp hơn 0,1mg/ml hoặc khi có mặt nhiều chất khác mà hấp thụ cùng một vùng cực tím (ví dụ, đệm, acid nucleic và một số chất béo), hoặc khi protein ở trong dịch huyền phù chứ không phải trong dung dịch. (Ví dụ, trong màng hoặc các phức hợp có trọng lượng phân tử lớn). Cũng cần chú ý là nếu tỷ lệ A_{280}/A_{260} thấp hơn 0,6 nghĩa là dung dịch protein chưa sạch, bị lẫn các chất khác, đặc biệt với acid nucleic thì nên sử

dụng phương pháp Lowry để đo nồng độ protein. Vì vậy, phương pháp đo độ hấp thụ tia cực tím thường được dùng để định lượng protein đa tinh sạch hoặc để xác định protein trong các phân đoạn nhận được khi sắc ký tách các protein qua cột.

5.2 Đánh giá tính đồng thể của protein:

Khi đã nhận được một protein enzyme ở trạng thái kết tinh, người ta phải thử lại mức độ tinh khiết hay tính đồng thể của nó. Độ đồng thể của chế phẩm protein enzyme phải được kiểm tra bằng một số phương pháp dựa trên những nguyên lý khác nhau. Trong một số trường hợp protein được coi là đồng thể khi ly tâm, nhưng lại có thể phân chia thành một số isoenzyme bằng phương pháp điện di trên gel. Chính vì vậy, nếu dùng nhiều loại phương pháp khác nhau để kiểm tra độ sạch của protein mà kết quả đều cho là đồng thể thì protein đó có thể được công nhận là tinh khiết. Những phương pháp để kiểm tra tính đồng thể hay dùng là xây dựng đồ thị về độ hoà tan, điện di và siêu ly tâm.

- Phương pháp kiểm tra tính đồng thể (hoặc còn gọi là tính đồng nhất) của protein đơn giản và nhạy nhất là xây dựng đường biểu diễn về độ hoà tan.

Cách làm như sau: Trong hàng loạt mẫu dùng một thể tích không đổi một loại dung môi (nước hoặc dung dịch muối) lắc với những số lượng enzyme khác nhau. Sau đó lọc và xác định số protein trong dịch lọc. Cuối cùng xây dựng đường đồ thị.

Trong những loại mẫu đầu, tất cả các protein thêm vào bị hoà tan và số lượng protein thêm vào bằng số lượng protein có trong dịch lọc hay dịch ly tâm. Kết quả nhận được biểu diễn là một đường thẳng. Sau đó dung dịch đạt được bão hoà. Nếu protein đem hoà tan là tinh khiết nghĩa là đồng nhất thì khi thêm protein trong dịch lọc sẽ không tăng lên và đường biểu diễn có một điểm uốn. Nếu trong mẫu có một protein thứ hai thì sau khi đạt được độ bão hoà đối với protein ít hoà tan hơn, loại protein thứ hai còn có thể hoà tan được nữa.

Kết quả là có một điểm bão hoà thứ hai và đường biểu diễn có hai điểm uốn. Nếu dịch chiết (hỗn hợp) có nhiều protein enzyme thì sẽ có nhiều điểm uốn.

Phương pháp này được Northrop và Kunitz sử dụng rất có kết quả. Nay vẫn còn ứng dụng nhiều.

- Phương pháp thứ hai để xác định độ đồng thể của protein enzyme là phương pháp điện di. Phương pháp điện di là ứng dụng tính chất lưỡng tính của protein, dựa trên cơ sở dịch chuyển của các tiểu phần chế phẩm protein enzyme mang điện trong điện trường. Dem chế phẩm protein enzyme điện di ở pH và lực ion nhất định. Nếu trên điện di đồ có một băng protein thì chứng tỏ protein enzyme đó là đơn thể. Nếu có hai băng chứng tỏ có hai protein enzyme trong chế phẩm đó. Bản điện di đồ này được đưa vào máy detector để phát hiện không chỉ nồng độ của băng điện di mà còn phát hiện được số lượng các băng vết.

- Phương pháp siêu ly tâm:

Đây cũng là phương pháp rất quan trọng để xác định tính đồng thể của protein enzyme. Phương pháp được thực hiện như sau:

Dùng lực ly tâm rất lớn bằng cách tăng số vòng quay ly tâm lên hàng nghìn, hàng vạn vòng trong một phút. Với tốc độ ly tâm rất lớn, người ta có thể tách ra được các phân tử enzyme có trọng lượng phân tử khác nhau.

Tốc độ kết tủa của protein enzyme trong máy siêu ly tâm được xác định bằng trọng lượng phân tử của nó. Khi dừng quay thì các phân tử protein lại khuếch tán vào dung dịch. Bởi vậy, cần phải quan sát tốc độ lắng trong quá trình siêu ly tâm. Chính vì vậy, trong cốc siêu ly tâm, người ta gắn một thiết bị quang học đặc biệt, vẽ các đường ánh sáng của kết quả.

5.3 Phương pháp phân tích hàm lượng lipid bằng bộ chiết Soxhlet:

Xác định hàm lượng chất béo trong mẫu nguyên liệu và collagen.

Phương pháp tiến hành:

Làm túi bằng giấy lọc. Đối với dụng cụ Soxhlet cần phải làm túi để đựng nguyên liệu: cắt một miếng giấy lọc vuông, kích thước tùy theo cỡ của dụng cụ, cuộn tròn, gấp đáy, dùng ghim để ghim mép giấy. Sấy khô.

Cân chính xác 5g da. Nghiền da trong cối sứ với natri sulfat khan.

Cho da vào trong túi đã chuẩn bị sẵn. Lau sạch cối bằng một miếng bông nhỏ rồi cho miếng bông vào túi. Gập miệng túi. Đặt túi vào dụng cụ chiết.

Lắp dụng cụ, đặt lên nồi cách thủy. Đặt phễu lên miệng ống sinh hàn. Rót dung môi qua phễu: 70- 80 ml. Dung môi thường dùng là ether etylic hoặc ether dầu hoả.

Chiết hồi lưu nhiều lần đến khi dầu mỡ được chiết kiệt. Cách thử: nhỏ một giọt dịch chiết được rút ra từ bình chiết lên giấy lọc. Hơ nóng, nếu trên giấy lọc không để lại vết là đạt yêu cầu.

Cất thu hồi dung môi. Chuyển dịch chiết trong bình cầu ra cốc khô, đã cân bì. Tráng bình cầu bằng một ít dung môi và dồn vào cốc. Bốc hơi trên cách thủy, sau đó sấy ở 100°C đến trọng lượng không đổi. Cân cặn còn lại. Tính hàm lượng dầu mỡ trong nguyên liệu theo công thức trên.

5.4 Phương pháp phân tích hàm ẩm:

Tiến hành:

Rửa sạch chén sứ rồi cho vào sấy khô ở nhiệt độ 105 -110°C, đem cân đến khối lượng không đổi.

Cân chính xác m_1 gam collagen hay nguyên liệu, đem sấy khô. Lấy ra để nguội trong bình hút ẩm.

Cân đến khối lượng không đổi m_2

Cách tính:

$$\text{Độ ẩm (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

5.5 Phương pháp phân tích hàm lượng tro:

Tiến hành:

Sau khi đo độ ẩm, lấy sản phẩm đem nung ở nhiệt độ 550 – 600⁰C, để nguội ở bình hút ẩm và cân ở cân phân tích đến khối lượng không đổi.

Cách tính:

$$\text{Tổng lượng tro (\%)} = \frac{\text{Khối lượng tro}}{\text{Khối lượng mẫu khô}} * 100$$

5.6 Phương pháp xác định phân tử lượng của collagen bằng phương pháp điện di:

Điện di hay điện di trên gel (electrophoresis hay gel electrophoresis) áp dụng trong sinh học phân tử là một kĩ thuật để phân tích các phân tử DNA, RNA hay protein dựa trên các đặc điểm vật lý của chúng như kích thước, hình dạng hay điểm đẳng điện tích (isoelectric point). Kĩ thuật này sử dụng một dung dịch đệm (buffer) để dẫn điện và tạo điện trường đều, một bản gel (thường là agarose hay polyacrylamide) đóng vai trò là thể nền để phân tách các phân tử, và các chất nhuộm khác nhau (ethidium bromide, bạc, xanh Coomassie) để phát hiện vị trí các phân tử trên gel sau khi điện di.

Kĩ thuật điện di hoạt động nhờ vào lực kéo của điện trường tác động vào các phân tử tích điện và kích thước lỗ của thể nền (gel). Gel cấu tạo bởi các chuỗi cao phân tử (polymer) được liên kết chéo với nhau tạo thành một hệ thống mạng lưới với kích thước các mắt lưới tùy thuộc vào nồng độ chất cao phân tử (agarose, polyacrylamide) và phản ứng tạo liên kết chéo. Các phân tử được phân tách khi di chuyển trong gel với vận tốc khác nhau nhờ vào sự khác nhau của (a) lực của điện trường tác động lên chúng (nếu các phân tử tích điện khác nhau) (b) kích thước của phân tử so với kích thước lỗ của gel và (c) hình dạng, độ cong kênh của phân tử.

5.7 Phương pháp xác định độ nhớt dung dịch theo phương pháp nhớt kế

Ubbelohde:

5.7.1 Nguyên tắc:

Trong lòng chất lỏng luôn tồn tại một lực chất lỏng bên trong. Chất lỏng gồm các phân tử nằm chồng chất lên nhau. Khi có một lớp chuyển động sẽ lôi kéo các

lớp kế cận nó chuyển động theo do một lực tương tác giữa phân tử của các lớp. Như vậy giữa các lớp sẽ tồn tại một gradient tốc độ có hướng vuông góc với tốc độ. Chính sự chênh lệch về tốc độ ấy mà có hiện tượng trượt trên bề mặt giữa các lớp, tạo nên lực ma sát bên trong dung dịch. Hệ số ma sát này gọi là độ nhớt dung dịch.

Nếu cho chất lỏng chảy qua mao quản, chất lỏng có độ nhớt càng cao sẽ chảy càng chậm. Độ nhớt của dung dịch phụ thuộc vào nhiệt độ, áp suất, nồng độ.....

Nhớt kế Ubbelohde, chất lỏng chảy qua mao quản do một áp suất không thay đổi từ bên ngoài.

5.7.2 Tiến hành:

- Rửa sạch nhớt kế, tráng nhớt kế bằng dung dịch cần đo.
- Ráp nhớt kế vào hệ thống.
- Vận hành nhớt kế, bấm thời gian để dung dịch chảy từ mức 1 đến mức 2.

5.7.3 Cách tính độ nhớt:

Hằng số nhớt kế được tính bằng công thức:

$$K = \frac{n_0}{P_0 t_0}$$

Công thức tính độ nhớt: $\eta_x = K.P.t$

Với: P: áp suất bên ngoài.

t: thời gian chảy.

η : độ nhớt của chất lỏng.

5.8 Phương pháp xác định nhiệt độ biến tính của collagen:

Để kiểm tra nhiệt độ biến tính của collagen người ta thường đo dung dịch 0,03% collagen trong 0,1N axit axetic trên bộ đo độ nhớt Ubbelohde được ngâm vào nước ở nhiệt độ từ 20-46°C.

Độ nhớt tương đối = $\eta_r = \frac{\text{Thời gian chảy của mẫu}}{\text{Thời gian chảy mẫu trắng (axit axetic 0,1 N)}}$

$$\text{Độ nhớt riêng} = \eta_{sp} = (\eta - \eta_0)/\eta_0 = \eta_r - 1_s$$

Độ nhớt của collagen giảm xuống khi tăng nhiệt độ. Nhiệt độ biến tính (T_d) là nhiệt độ của dung dịch collagen được đo khi độ nhớt của nó giảm xuống một nửa.

6 Lịch sử nghiên cứu và tách chiết collagen:

❖ Những nghiên cứu có liên quan đến đề tài ở các nước:

Việc nghiên cứu ứng dụng collagen vào mỹ phẩm đã tiến hành vào năm 1930 bởi người Đức; thời kì đó, người ta tách chiết collagen chủ yếu từ da và xương của trâu, bò, lợn. Tuy nhiên, đến năm 1990 bắt đầu một hướng chuyển biến mới: bắt đầu “tách chiết collagen từ da cá”, phát minh này của các nhà khoa học thuộc Viện Hóa học Gdansk (Ba Lan) đã gây tiếng vang mạnh mẽ trên toàn cầu. Trong những năm gần đây nhiều quốc gia như: Mỹ, Pháp, Đức, Ba Lan, Nhật Bản, Hàn Quốc đã đầu tư hàng triệu đôla vào nghiên cứu thu nhận collagen để làm nguyên liệu sản xuất da nhân tạo, chỉ tự tiêu, thuốc mỡ điều trị bỏng và các sản phẩm làm đẹp như mặt nạ, kem dưỡng da, dầu dưỡng tóc...

❖ Những nghiên cứu có liên quan tại Việt Nam:

1. Năm 1990, Trần Thị Luyến đã nghiên cứu 50 keo xương cá của một số loài cá fillet.
2. Năm 2005, Vũ Trần Tùng đã nghiên cứu thành phần hoá học của cá Basa, tối ưu hóa công đoạn xử lý NaCl, NaOH. Từ đó đưa ra quy trình sản xuất gelatin từ da cá Basa.

CHƯƠNG 2

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu nghiên cứu:

Da cá tra được lấy về từ nhà máy chế biến thuỷ sản Cần Thơ.

Một số hoá chất dụng cụ, thiết bị của phòng thí nghiệm khoa Công Nghệ Sinh Học – Môi Trường và của khoa Công Nghệ Hoá Thực Phẩm.

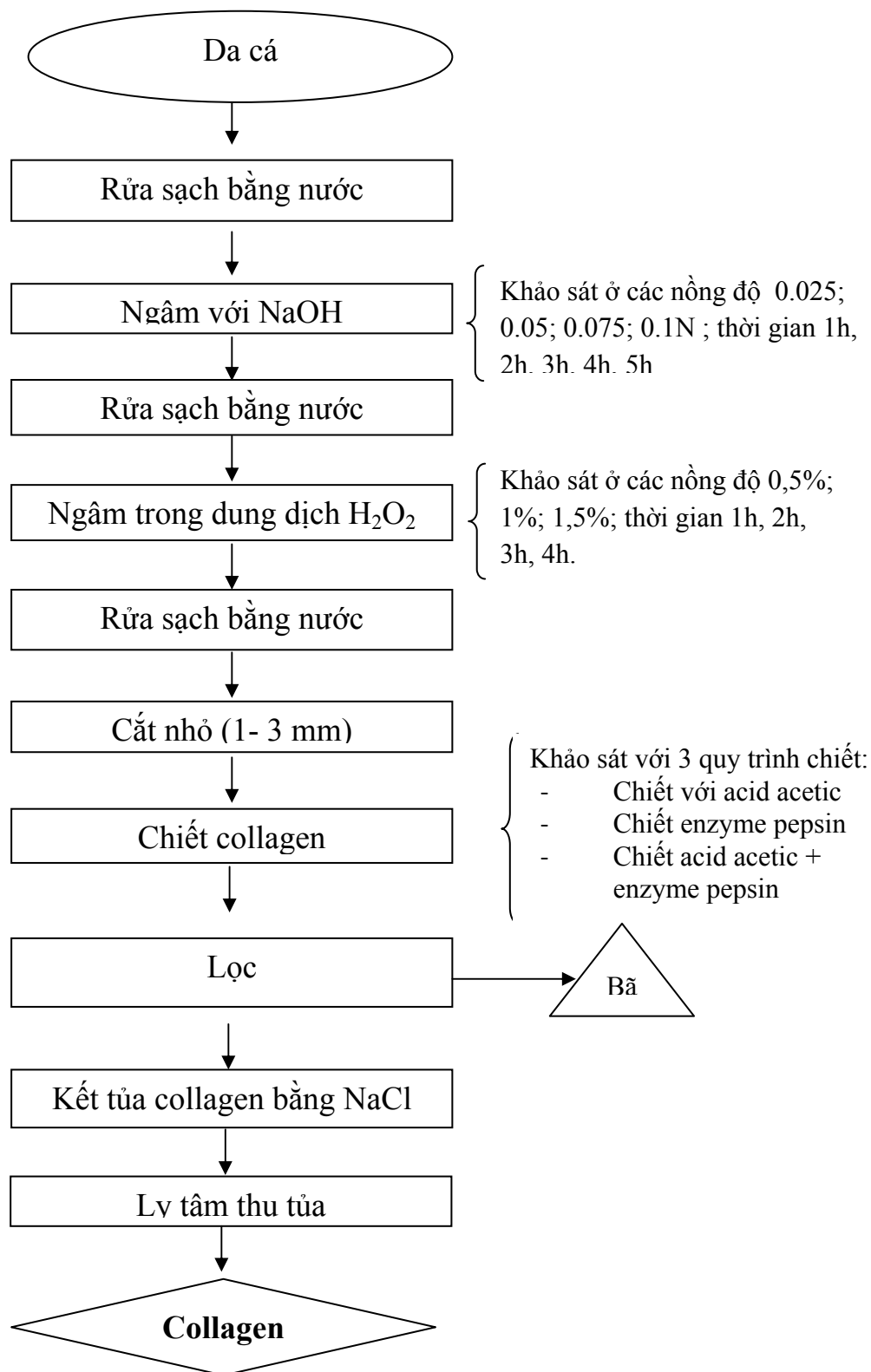
2.2 Phương pháp nghiên cứu:

Các phương pháp nghiên cứu sử dụng:

- Tổng hợp tài liệu.
- Phương pháp phân tích vật lý.
- Phương pháp cảm quan.
- Phương pháp phân tích định lượng.
 - Phân tích độ ẩm: sấy khô ở 105°C đến trọng lượng không đổi (TCVN 3705 – 90).
 - Phân tích lipid: Phương pháp sohxlet(TCVN 3903 – 90).
 - Phân tích nitơ tổng: Xác định theo MicroKjeldal (TCVN 3705 – 90).
 - Phân tích tro: xác định theo AOAC 923 - 03.
 - Phương pháp cảm quan theo tài liệu Ngô Thị Hồng Thư – Kiểm nghiệm thực phẩm bằng phương pháp cảm quan – NXB Khoa Học và Kỹ Thuật, 1989.

2.3 Quy trình tách chiết Collagen:

Quy trình thu nhận Collagen được xây dựng như sau:




2.3.1 Nguyên liệu:

Da cá vận chuyển từ nhà máy về:

- Bảo quản lạnh.
- Rã đông.
- Rửa bằng nước sạch nhiều lần để loại bỏ máu và các tạp chất bẩn khác...

2.3.2 Ngâm NaOH:

Mục đích: nhằm làm sạch các tạp chất bẩn, tẩy mỡ, máu, mùi tanh, chất nhờn, cắt đứt các liên kết hydro của collagen. Và các mạch này trở nên lỏng lẻo, tạo điều kiện cho quá trình chiết collagen được dễ dàng, hiệu suất thu hồi collagen cao.

 Nguyên liệu sau khi rửa sạch ta tiến hành ngâm xút, với các nồng độ 0,025M; 0,05M; 0,075M; 0,1M. Sau khi ngâm da nở ra và khử đi các chất hữu cơ có thể hòa tan trong kiềm. Thời gian ngâm khảo sát 1-5 giờ, trong điều kiện nhiệt độ tương đối thấp từ 4 – 9⁰C nhằm hạn chế sự phát triển của vi sinh vật và làm tránh biến đổi collagen. Trong quá trình ngâm nên khuấy đều để tránh hiện tượng tác dụng của xút không đều lên nguyên liệu. Kết thúc thời gian ngâm thì vớt ra, rửa sạch.

Trong công đoạn này ta tiến hành khảo sát tỉ lệ ngâm xút và thời gian ngâm xút để tìm ra nồng độ và thời gian tốt nhất để đạt được hiệu quả cao.

2.3.3 Ngâm với H₂O₂:

Sau khi ngâm da cá với xút ta lấy ra rồi rửa sạch đến hết mỡ, chất nhờn, bỏ vào **cốc** rồi tiến hành ngâm với H₂O₂. Trong công đoạn này ta tiến hành khảo sát tỉ lệ rắn/lỏng, nồng độ H₂O₂ và thời gian ngâm. Trong quá trình ngâm ta cũng giữ trong điều kiện nhiệt độ tương đối thấp từ 4 – 9⁰C.

Mục đích: tẩy trắng nguyên liệu, khử mùi, và loại bỏ một phần lipid.

2.3.4 Cắt nhỏ:

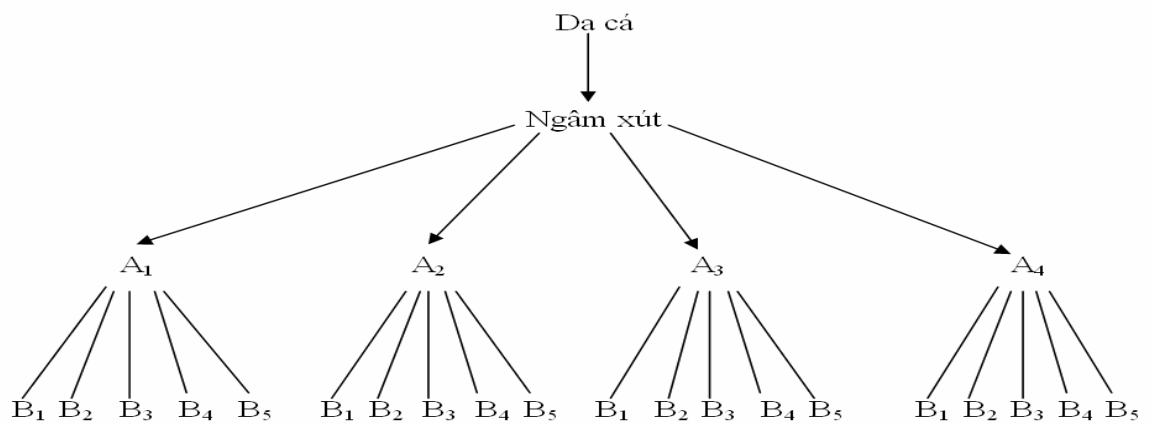
Mục đích: Tạo diện tích tiếp xúc lớn giữa nguyên liệu và dung môi chiết, tăng hiệu quả chiết collagen.

2.3.5 Chiết collagen:

Sau khi cắt nhỏ nguyên liệu ta tiến hành khảo sát quy trình chiết collagen bằng acid acetic, enzyme pepsin, và kết hợp enzyme pepsin và acid acetic. Trong quá trình chiết luôn đảm bảo nhiệt độ nằm trong khoảng 5 - 15⁰C nhằm tránh biến tính collagen thành gelatin.

2.4 Sơ đồ bố trí nghiệm thức cho công đoạn ngâm với xút và H₂O₂ như sau:

2.4.1 Sơ đồ bố trí thí nghiệm với xút:



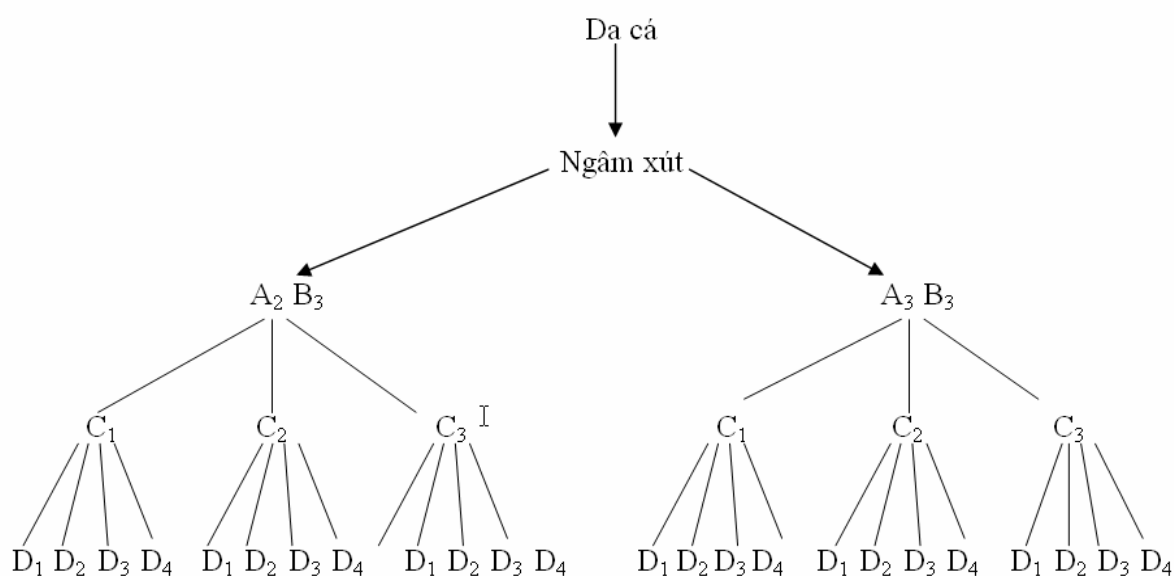
Thí nghiệm được sắp xếp ngẫu nhiên với 20 nghiệm thức được lặp lại 5 lần.

- Nồng độ xút : A₁ (0,025m) ; A₂ (0,05M) ; A₃ (0,075M); A₄ (0,1M)
- Thời gian: B₁ (1 giờ); B₂ (2 giờ); B₃ (3 giờ); B₄ (4 giờ); B₅ (5 giờ)

Bảng 2.1 Bố trí thí nghiệm cho các nghiệm thức.

Nghiệm thức		Nghiệm thức	
1	$A_1 B_1$	11	$A_3 B_1$
2	$A_1 B_2$	12	$A_3 B_2$
3	$A_1 B_3$	13	$A_3 B_3$
4	$A_1 B_4$	14	$A_3 B_4$
5	$A_1 B_5$	15	$A_3 B_5$
6	$A_2 B_1$	16	$A_4 B_1$
7	$A_2 B_2$	17	$A_4 B_2$
8	$A_2 B_3$	18	$A_4 B_3$
9	$A_2 B_4$	19	$A_4 B_4$
10	$A_2 B_5$	20	$A_4 B_5$

2.4.2 Sơ đồ bố trí thí nghiệm với H_2O_2 :



Thí nghiệm được sắp xếp ngẫu nhiên với 24 nghiệm thức được lặp lại 4 lần.

- Nồng độ xút : A_2 (0,05M) ; A_3 (0,075M)
- Thời gian: B_3 (3 giờ)

- Nồng độ H_2O_2 : C_1 (0,5%) ; C_2 (1%) ; C_3 (1,5%)
- Thời gian: D_1 (1 giờ); D_2 (2 giờ); D_3 (3 giờ); D_4 (4 giờ)

Bảng 2.2 Bố trí thí nghiệm cho các nghiệm thức.

Nghiem thức		Nghiem thức	
1	$A_2 B_3 C_1 D_1$	13	$A_3 B_3 C_1 D_1$
2	$A_2 B_3 C_1 D_2$	14	$A_3 B_3 C_1 D_2$
3	$A_2 B_3 C_1 D_3$	15	$A_3 B_3 C_1 D_3$
4	$A_2 B_3 C_1 D_4$	16	$A_3 B_3 C_1 D_4$
5	$A_2 B_3 C_2 D_1$	17	$A_3 B_3 C_2 D_1$
6	$A_2 B_3 C_2 D_2$	18	$A_3 B_3 C_2 D_2$
7	$A_2 B_3 C_2 D_3$	19	$A_3 B_3 C_2 D_3$
8	$A_2 B_3 C_2 D_4$	20	$A_3 B_3 C_2 D_4$
9	$A_2 B_3 C_3 D_1$	21	$A_3 B_3 C_3 D_1$
10	$A_2 B_3 C_3 D_2$	22	$A_3 B_3 C_3 D_2$
11	$A_2 B_3 C_3 D_3$	23	$A_3 B_3 C_3 D_3$
12	$A_2 B_3 C_3 D_4$	24	$A_3 B_3 C_3 D_4$

Chương 3

KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1 Phân tích thành phần nguyên liệu:

- Nguồn nguyên liệu: Da cá Tra được lấy từ nhà máy chế biến thủy sản Cần Thơ.
- Xử lý: Da cá thu gom từ nhà máy về được rửa sạch, để ráo. Sau đó gói bằng bao polyethylene và bảo quản trong tủ đông -18°C .
- Khảo sát thành phần da cá tra:

Bảng 3.1 Thành phần da cá tra nguyên liệu

Thành phần	Hàm lượng (% trọng lượng ướt)
Protein	30,4
Lipid	7,5
Độ ẩm	60,7
Độ tro	0,3
Các hợp chất hữu cơ (chất màu, mùi, hydrocarbon)	1,1

3.2 Xử lý da cá bằng NaOH:

Ngâm xút: Nguyên liệu sau khi rửa sạch ta tiến hành ngâm xút, nồng độ xút dùng ngâm là 0,025 – 0,1N. Sau khi ngâm da nở ra và khử đi các chất hữu cơ có thể hòa tan trong kiềm.

Ngâm mẫu: lượng da cá/dung dịch NaOH được khảo sát 1/10 lần lượng dung dịch xút (1/10 w/v). Thời gian ngâm được khảo sát 1 ÷ 5 giờ. Trong quá trình ngâm nên khuấy đều để tránh hiện tượng tác dụng của xút không đều lên nguyên liệu. Sau khi ngâm đủ thời gian thì xả nước xút rồi vớt ra, dùng nước trong rửa sạch tạp chất và xút bám trên nguyên liệu sau đó vớt ra để ráo.

Điều kiện khảo sát:

Nhiệt độ: nhiệt độ xử lý (nhiệt độ phòng thí nghiệm 30 – 32⁰C)

Tỉ lệ da cá / dung dịch xút (w/v): 1:10

Nồng độ NaOH(N): 0.025; 0.05; 0.075; 0.1

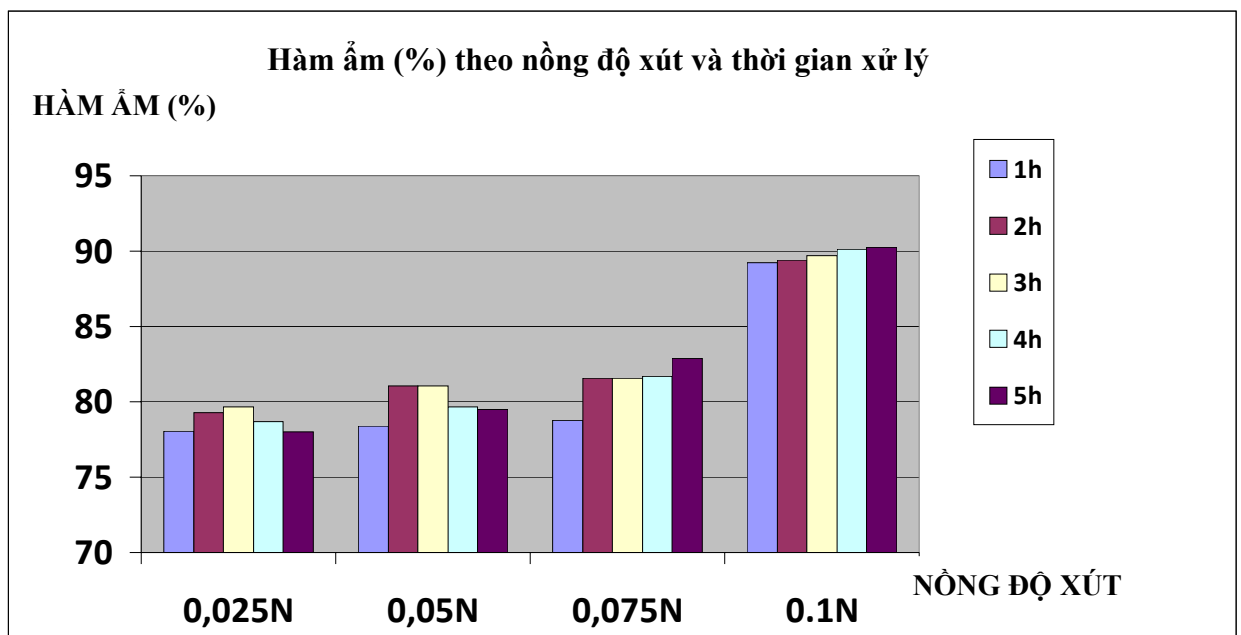
Thời gian (giờ): 1h; 2h; 3h; 4h; 5h

Bảng 3.2 Kết quả xử lý da với NaOH

<div>Nồng độ Thời gian</div>	NaOH 0,025N	NaOH 0,05N	NaOH 0,075N	NaOH 0,1N
1h	Chưa sạch, da bình thường	Chưa sạch, da bình thường	Chưa sạch, da bình thường	Sạch,da trương lớn
2h	Chưa sạch, da bình thường	Chưa sạch, da bình thường	Chưa sạch, da bình thường	Sạch,da trương lớn
3h	Chưa sạch, da bình thường	Sạch, da bình thường	Sạch, da bình thường	Sạch,da trương lớn
4h	Chưa sạch, da bình thường	Sạch, da bình thường	Sạch, da bình thường	Sạch,da trương lớn
5h	Chưa sạch, da bình thường	Sạch, da bình thường	Sạch, da bình thường	Sạch,da trương lớn

Bảng 3.3 Khảo sát hàm ẩm sau khi ngâm với NaOH

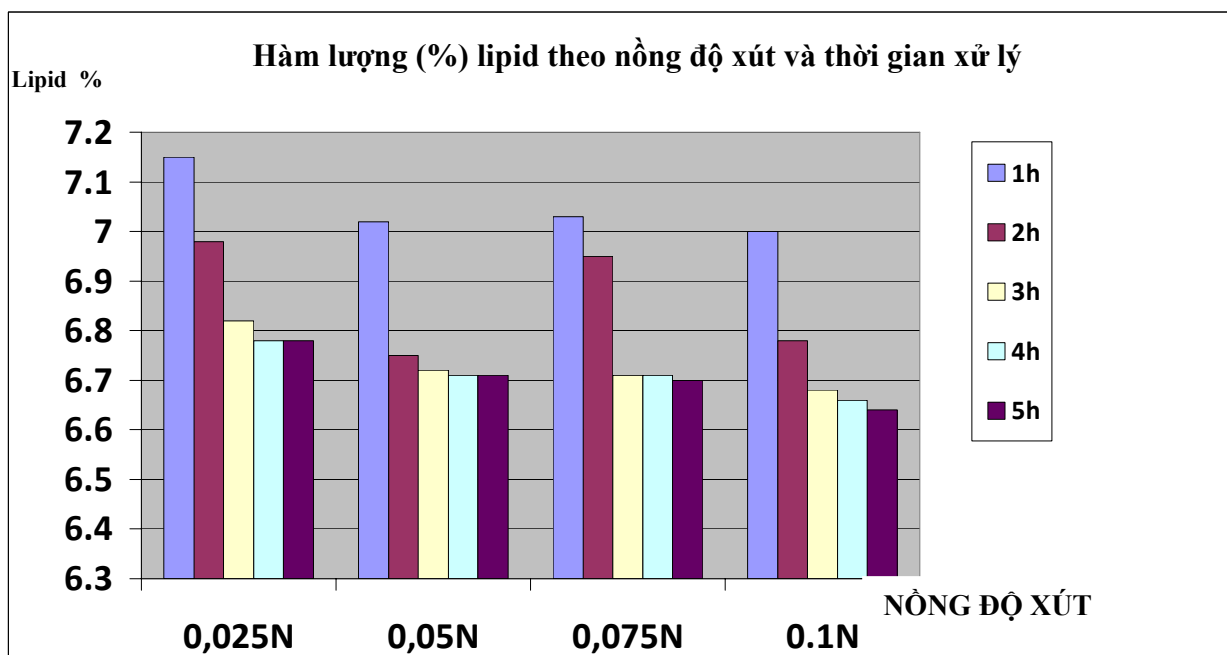
Nghiệm thức	Độ ẩm (%)	Nghiệm thức	Độ ẩm (%)
A ₁ B ₁	78,03	A ₃ B ₁	78,78
A ₁ B ₂	79,29	A ₃ B ₂	81,55
A ₁ B ₃	79,66	A ₃ B ₃	81,57
A ₁ B ₄	78,68	A ₃ B ₄	81,71
A ₁ B ₅	78,01	A ₃ B ₅	82,87
A ₂ B ₁	78,40	A ₄ B ₁	89,23
A ₂ B ₂	81,60	A ₄ B ₂	89,42
A ₂ B ₃	81,08	A ₄ B ₃	89,71
A ₂ B ₄	79,65	A ₄ B ₄	90,13
A ₂ B ₅	79,51	A ₄ B ₅	90,26



Hình 3.1 Biểu đồ khảo sát hàm ẩm nguyên liệu sau khi xử lý bằng NaOH

Bảng 3.4 Khảo sát hàm lượng lipid sau khi ngâm với NaOH

<div> <div>Nồng độ</div> <div>Thời gian</div> </div>	NaOH 0,025N	NaOH 0,05N	NaOH 0,075N	NaOH 0,1N
	%	%	%	%
1h	7.15	7.02	7.03	7.0
2h	6.98	6.75	6.95	6.78
3h	6.82	6.72	6.71	6.68
4h	6.78	6.71	6.71	6.66
5h	6.78	6.71	6.70	6.64



Hình 3.2 Biểu đồ khảo sát hàm lượng lipid sau khi xử lý bằng NaOH

Nhận xét: Từ bảng khảo sát độ sạch của nguyên liệu ta nhận thấy rằng ở mẫu có nồng độ xút 0.1N có cấu trúc da tương quá lớn không giữ được trạng thái ban đầu của nguyên liệu, ta loại bỏ mẫu này và chỉ khảo sát các bước tiếp theo với 3 mẫu còn lại. Dựa vào các bảng khảo sát ta thấy mẫu có thời gian xử

lý 3 giờ và nồng độ xút 0.05N có cấu trúc da bình thường không bị trương quá lớn và sạch. Vì vậy ta lấy mẫu này mang đi khảo sát bước tiếp theo.

3.3 Xử lý da cá bằng H_2O_2 .

Nguyên liệu sau khi ngâm với xút ta tiến hành công đoạn tách màu, mùi cho nguyên liệu. Hoá chất được sử dụng ở đây là H_2O_2 , nồng độ dùng ngâm là 0,5%; 1%; 1,5%. Trong khi ngâm các chất màu, mùi và khoáng sẽ bị tách ra khỏi nguyên liệu. Ngâm mẫu: lượng da cá/dung dịch H_2O_2 được khảo sát 1/10 (w/v). Thời gian ngâm được khảo sát 1 ÷ 4 giờ, trong điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm (30 -32⁰C). Trong quá trình ngâm nên khuấy đều để tránh hiện tượng tác dụng của H_2O_2 không đều lên nguyên liệu. Sau khi ngâm đủ thời gian thì xả nước H_2O_2 rồi vớt ra, dùng nước trong rửa sạch tạp chất và H_2O_2 bám trên nguyên liệu.

Điều kiện khảo sát:

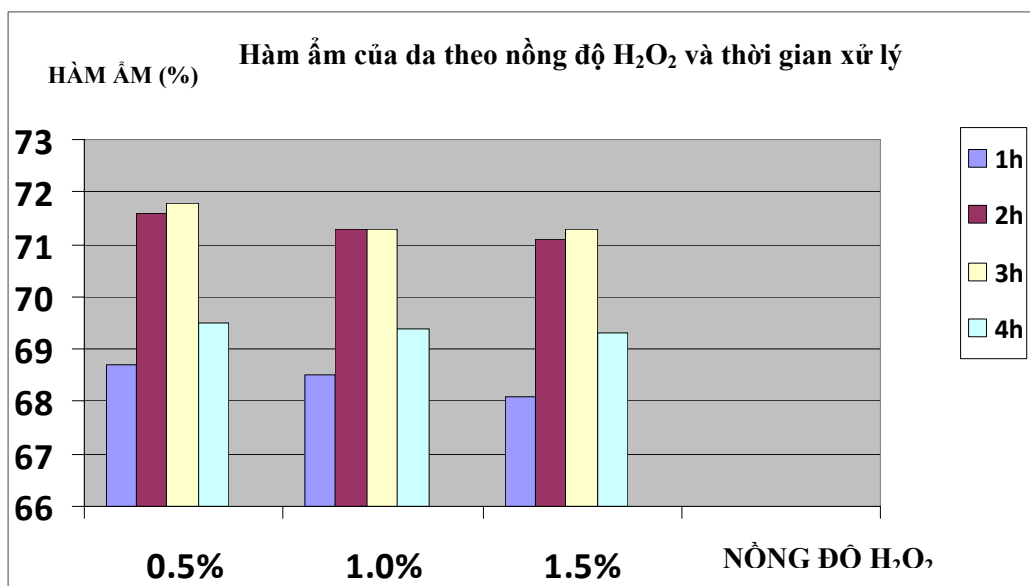
- Nhiệt độ: nhiệt độ xử lý (nhiệt độ phòng thí nghiệm 30 – 32⁰C).
- Tỷ lệ da cá / dung dịch H_2O_2 (w/v): 1:10.
- Nồng độ H_2O_2 (%): 0.5%; 1%; 1.5%.
- Thời gian (giờ): 1h; 2h; 3h; 4h.

Bảng 3.5 Kết quả xử lý da bằng H₂O₂

Mẫu Thời gian	NaOH 0,05N, 3h					
	H ₂ O ₂ 0,5%		H ₂ O ₂ 1%		H ₂ O ₂ 1,5%	
	Màu	Mùi	Màu	Mùi	Màu	Mùi
1h	Xám	ít	Xám	ít	Xám	ít
2h	Xám	Rất ít	Xám trắng	Rất ít	Xám trắng	Rất ít
3h	Xám trắng	Rất ít	Trắng	Rất ít	Trắng	Rất ít
4h	Xám trắng	Rất ít	Trắng	Rất ít	Trắng	Rất ít

Bảng 3.6 Kết quả khảo sát hàm ẩm bằng H₂O₂

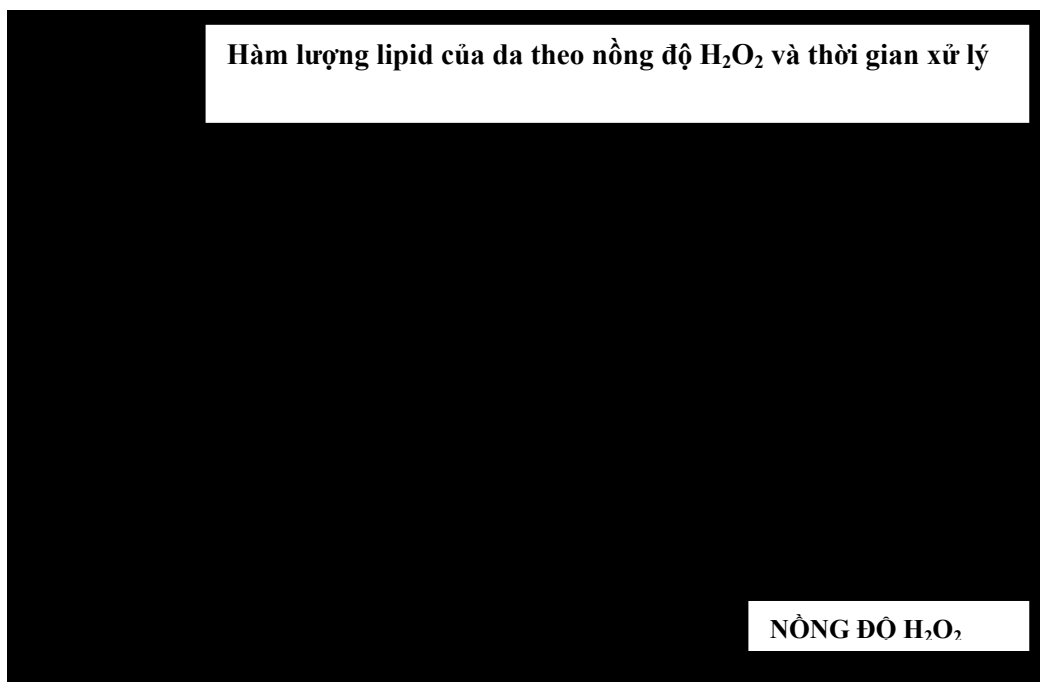
Mẫu Thời gian	NaOH 0,05N, 3h		
	H ₂ O ₂ 0,5%	H ₂ O ₂ 1%	H ₂ O ₂ 1,5%
1h	68.7	68.5	68.1
2h	71.6	71.3	71.1
3h	71.8	71.3	71.3
4h	69.5	69.4	69.1



Hình 3.3 Biểu đồ khảo sát hàm ẩm của da sau khi xử lý bằng H_2O_2

Bảng 3.7 Kết quả khảo sát hàm lượng lipid sau khi xử lý da bằng H_2O_2

Mẫu Thời gian	NaOH 0,05N, 3h		
	H_2O_2 0,5%	H_2O_2 1%	H_2O_2 1,5%
1h	4.3	4.2	4.2
2h	4.3	4.1	3.9
3h	4.1	3.9	3.9
4h	4.1	3.9	3.8



Hình 3.4 Biểu đồ khảo sát hàm lượng lipid của da sau khi xử lý bằng H_2O_2

Nhận xét: Từ các bảng phân tích cảm quan, hàm ẩm, lipid chúng tôi nhận thấy rằng xử lý da ở nồng độ H_2O_2 trong thời gian 3 giờ là đạt kết quả tốt nhất, khi tăng nồng độ và thời gian xử lý thì cũng làm tăng hiệu quả nhưng không đáng kể. Vì vậy chúng tôi sẽ chọn mẫu da được xử lý ở nồng độ H_2O_2 1% trong thời gian 3h để đi tiến hành chiết collagen.

3.4 Chiết collagen bằng acid acetic:

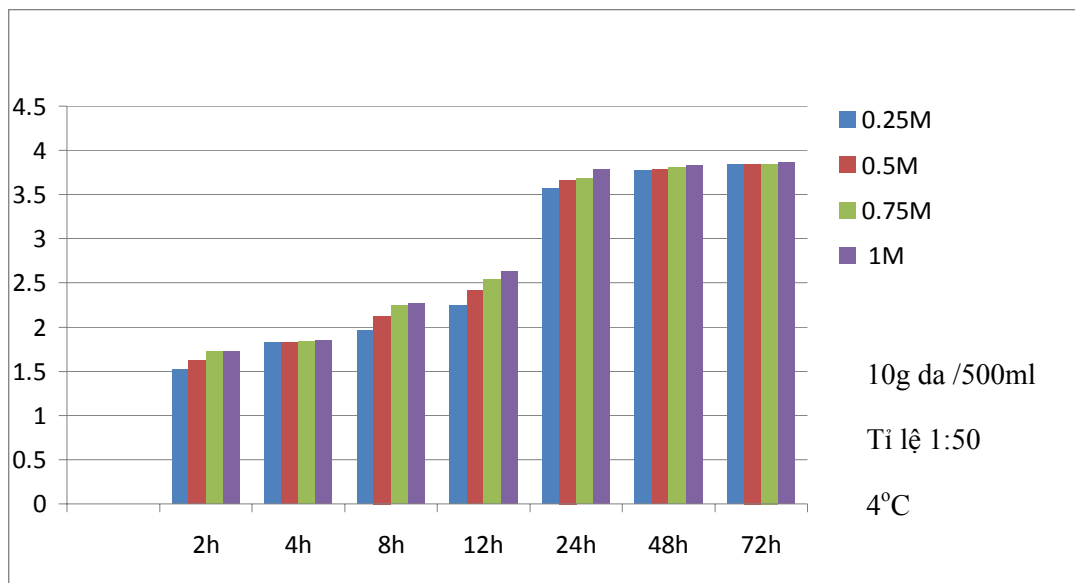
Điều kiện khảo sát:

- Nhiệt độ: $4^{\circ}C$; $9^{\circ}C$.
- Tỷ lệ da /dung dịch (w/v): 1:10 ; 1:50; 1:70
- Nồng độ acid (M): 0.25; 0.5; 0.75; 1
- Thời gian lấy mẫu (h): 2; 4; 6; 8; 12; 24; 48; 72

Tiến hành thí nghiệm với tỉ lệ da /dung dịch (w/v): 1:10 chúng tôi thấy da trương lên và hút hết nước trong dung dịch. Vì vậy chúng tôi tiến hành thí nghiệm với tỉ lệ da/ dung dịch (w/v): 1:50.

Bảng 3.8 Kết quả chiết collagen bằng acid acetic ở 4⁰C, tỷ lệ R/L = 1:50

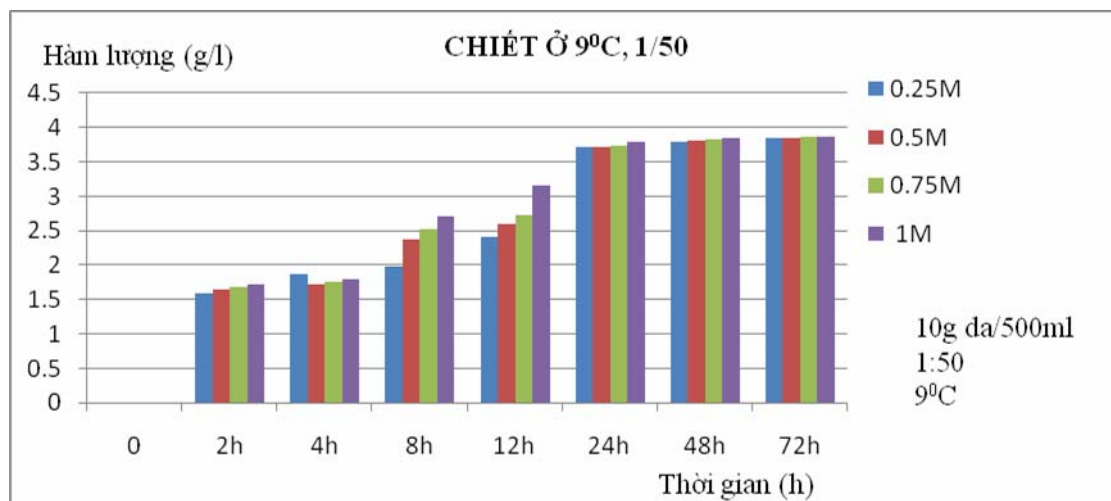
<div> <div>Nồng độ</div> <div>Thời gian</div> </div>	0.25M	0.5M	0.75M	1M
	g/l	g/l	g/l	g/l
2h	1.53	1.63	1.72	1.73
4h	1.82	1.98	1.75	1.84
8h	1.96	2.13	2.25	2.27
12h	2.24	2.42	2.54	2.63
24h	3.57	3.67	3.68	3.79
48h	3.78	3.79	3.81	3.83
72h	3.84	3.85	3.85	3.86



Hình 3.5 Kết quả chiết collagen bằng acid acetic ở 4°C, tỷ lệ R/L = 1:50

Bảng 3.9 Kết quả chiết collagen bằng acid acetic ở 9°C, tỉ lệ R/L = 1:50

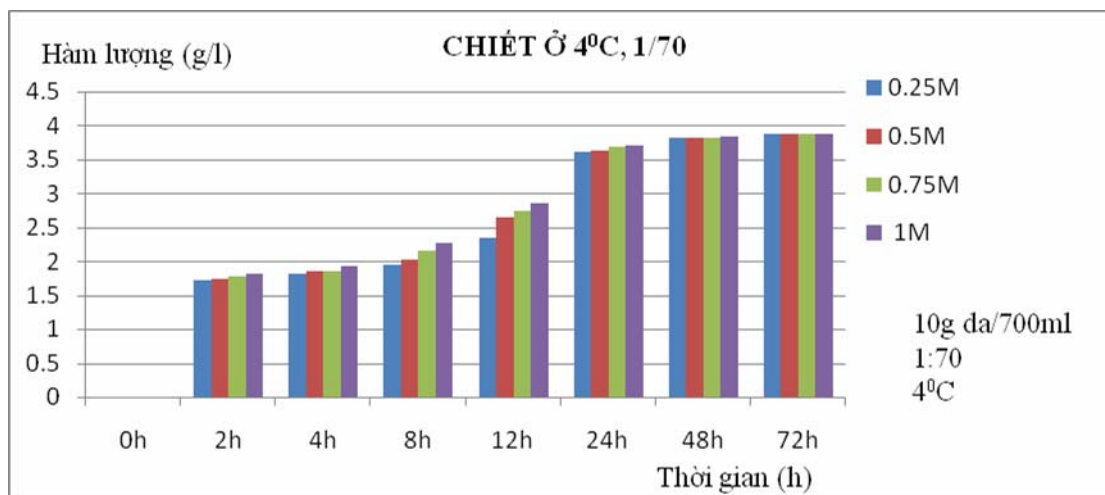
Thời gian \ Nồng độ	0.25M	0.5M	0.75M	1M
	g/l	g/l	g/l	g/l
2h	1.58	1.65	1.68	1.71
4h	1.87	1.72	1.76	1.79
8h	1.98	2.37	2.53	2.87
12h	2.41	2.59	2.73	3.15
24h	3.72	3.72	3.73	3.78
48h	3.79	3.81	3.82	3.84
72h	3.85	3.85	3.86	3.86



Hình 3.6 Kết quả chiết collagen bằng acid acetic ở 9°C, tỷ lệ R/L = 1:50

Bảng 3.10 Kết quả chiết collagen bằng acid acetic ở 4°C, tỉ lệ R/L = 1:70

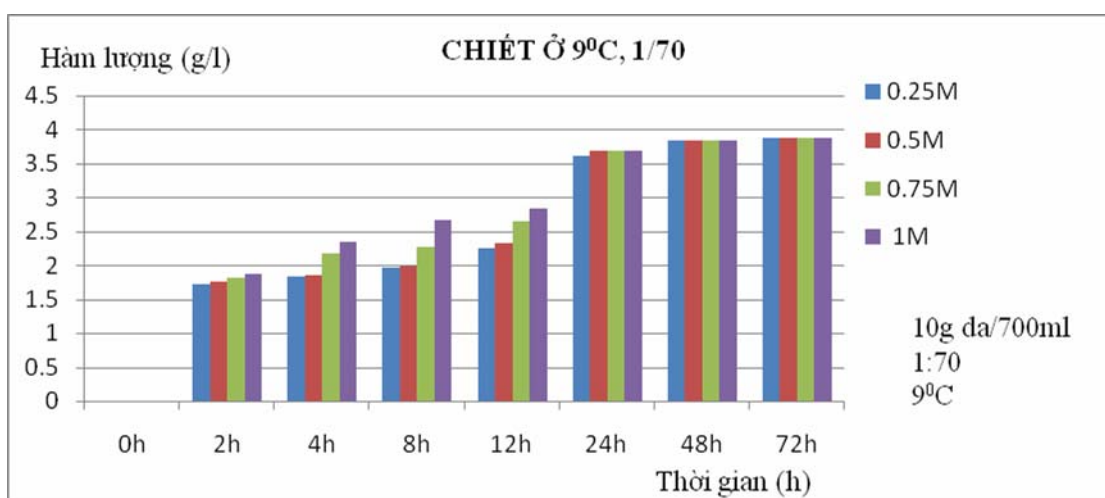
Nồng độ Thời gian	0.25M	0.5M	0.75M	1M
	g/l	g/l	g/l	g/l
2h	1.72	1.74	1.78	1.81
4h	1.82	1.85	1.86	1.93
8h	1.94	2.02	2.15	2.26
12h	2.34	2.65	2.75	2.86
24h	3.61	3.63	3.68	3.71
48h	3.82	3.82	3.82	3.83
72h	3.87	3.88	3.88	3.88



Hình 3.7 Kết quả chiết collagen bằng acid acetic ở 4°C, tỷ lệ R/L = 1:70

Bảng 3.11 Kết quả chiết collagen bằng acid acetic ở 9°C, tỉ lệ R/L = 1:70

<div> <div>Nồng độ</div> <div>Thời gian</div> </div>	0.25M	0.5M	0.75M	1M
	g/l	g/l	g/l	g/l
2h	1.73	1.75	1.82	1.88
4h	1.83	1.85	2.18	2.35
8h	1.96	1.98	2.26	2.66
12h	2.25	2.32	2.65	2.84
24h	3.62	3.68	3.69	3.69
48h	3.83	3.83	3.83	3.84
72h	3.87	3.88	3.88	3.88



Hình 3.8 Kết quả chiết collagen bằng acid acetic ở 9°C, tỷ lệ R/L = 1:70

Kết luận: Chiết collagen bằng acid acetic ở nồng độ 0.5M, tỷ lệ R/L = 1:50, nhiệt độ 4⁰C, thời gian 24h. Hàm lượng collagen thu được là 3.67g/l. Việc tăng nồng độ, thời gian, tỷ lệ chiết cũng làm tăng hàm lượng nhưng không đáng kể. Khi tăng nhiệt độ chiết 4 -9⁰C hàm lượng collagen cũng tăng nhưng không đáng kể.

3.5 Chiết collagen bằng enzyme pepsin:

Điều kiện khảo sát:

- Nhiệt độ: 4⁰C; 9⁰C;
- Tỷ lệ da /dung dịch (w/v): 1:10 ; 1:50; 1:70
- Nồng độ enzyme pepsin (%): 0.025; 0.05; 0.075; 0.1
- Thời gian lấy mẫu (h): 2; 4; 6; 8; 12; 24; 48; 72

Bảng 3.12 Kết quả chiết collagen bằng enzyme pepsin ở 4⁰C, tỉ lệ R/L = 1:10

Nồng độ enzyme Thời gian	0.025%	0.05%	0.075%	0.1%
	Collagen (g/l)	Collagen (g/l)	Collagen (g/l)	Collagen (g/l)
2h	0.023	0.042	0.063	0.078
4h	0	0	0	0
8h	0	0	0	0
12h	0	0	0	0
24h	0	0	0	0
48h	0	0	0	0
72h	0	0	0	0

Nhận xét: Không chiết được collagen bằng enzyme pepsin ở 4⁰C, tỉ lệ R/L = 1:10. Và kết quả cũng tương tự khi chúng ta tiến hành chiết ở nhiệt độ 9⁰C và các tỉ lệ R/L cao hơn. Chúng ta thấy không những không chiết được collagen mà còn xảy ra hiện tượng tự tiêu enzyme vì enzyme có khả năng tự tiêu chính nó.

3.6 Chiết collagen bằng enzyme pepsin kết hợp với acid acetic:

Khảo sát với 4 yếu tố:

- Nhiệt độ: 4⁰C; 9⁰C;

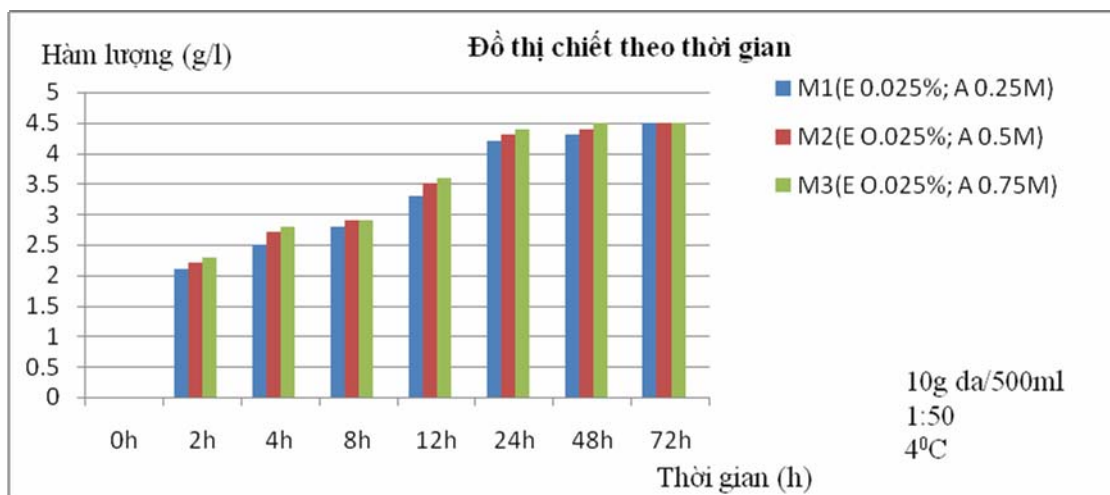
- Tỷ lệ da /dung dịch (w/v): 1:50

- Nồng độ enzyme pepsin (%): 0.025; 0.05; 0.075

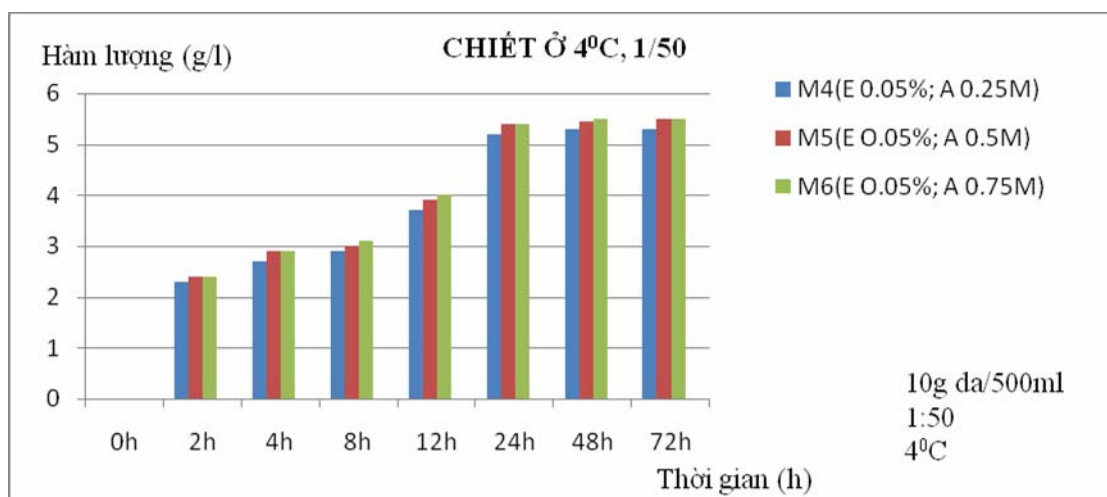
- Nồng độ acid (M): 0.25; 0.5; 0.75

Thời gian lấy mẫu (h): 2; 4; 6; 8; 12; 24; 48; 72

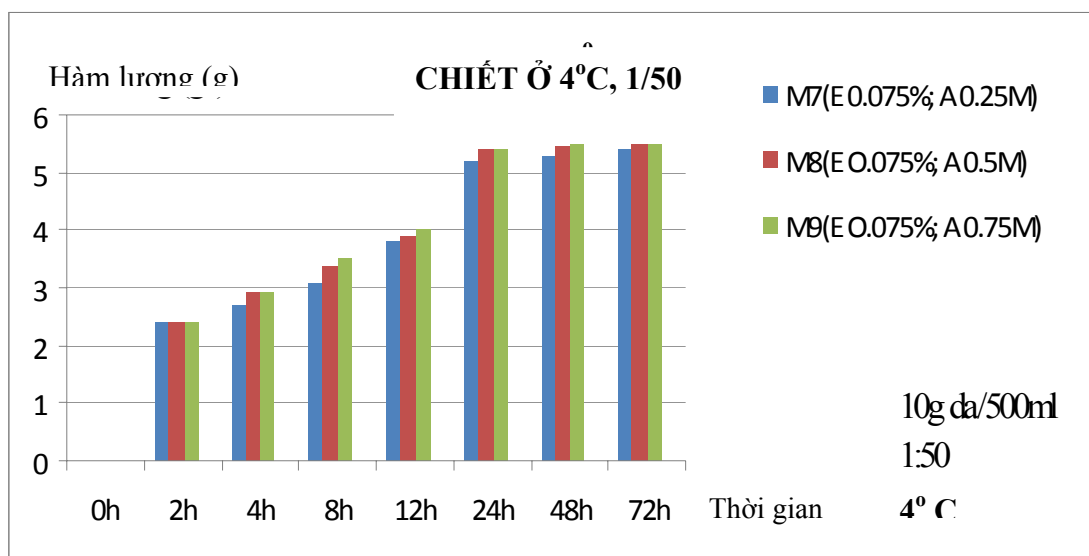
BẢNG NGHIỆM THỨC				
STT	Enzyme pepsin (%)	Acid acetic (M)	R/L	Nhiệt độ
1	0.025	0.25	1:50	4
2	0.025	0.5	1:50	4
3	0.025	0.75	1:50	4
4	0.05	0.25	1:50	4
5	0.05	0.5	1:50	4
6	0.05	0.75	1:50	4
7	0.075	0.25	1:50	4
8	0.075	0.5	1:50	4
9	0.075	0.75	1:50	4
10	0.025	0.25	1:50	9
11	0.025	0.5	1:50	9
12	0.025	0.75	1:50	9
13	0.05	0.25	1:50	9
14	0.05	0.5	1:50	9
15	0.05	0.75	1:50	9
16	0.075	0.25	1:50	9
17	0.075	0.5	1:50	9
18	0.075	0.75	1:50	9

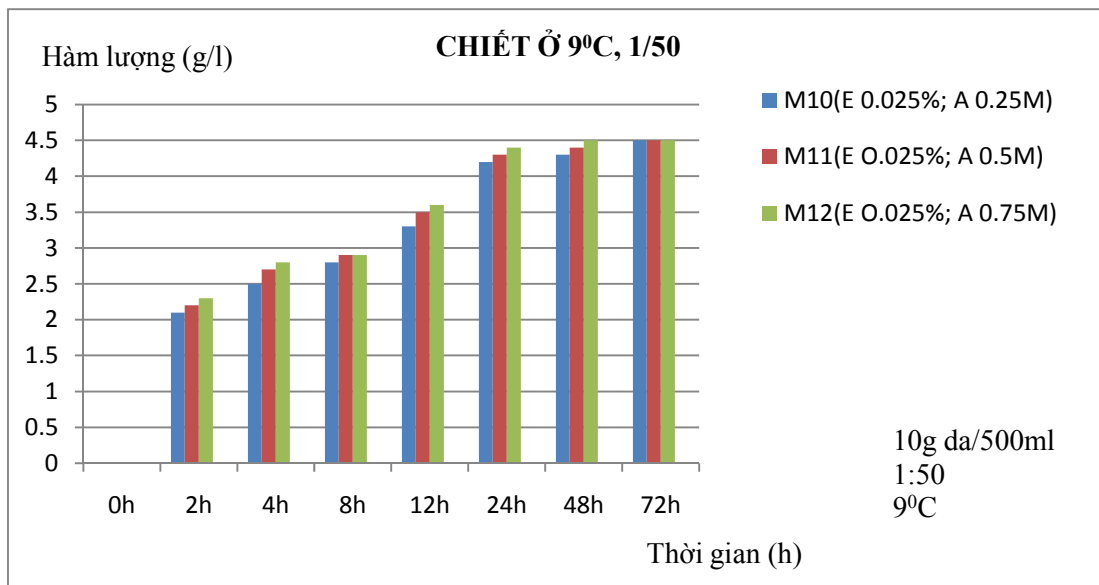


Hình 3.9 Kết quả chiết collagen ở 4°C, tỷ lệ R/L = 1:50

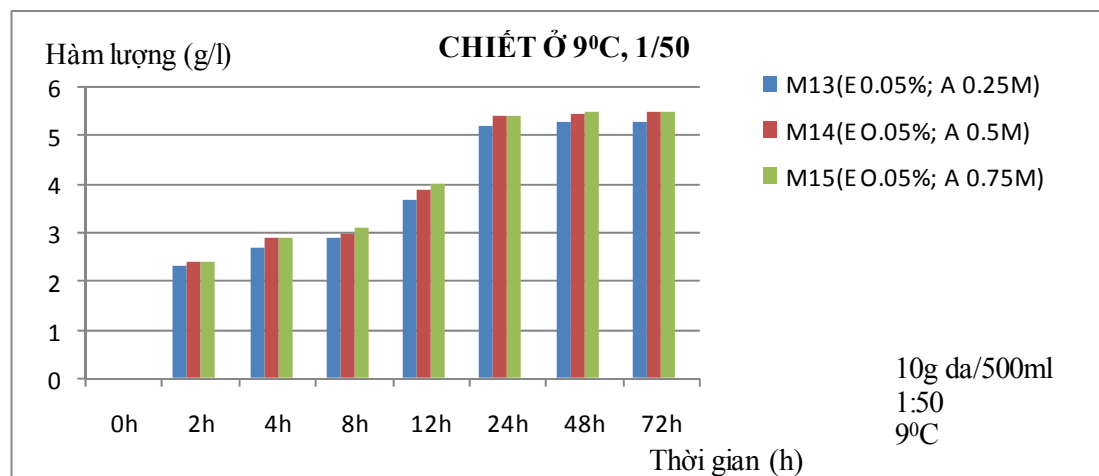


Hình 3.10 Kết quả chiết collagen ở 4°C, tỷ lệ R/L = 1:50

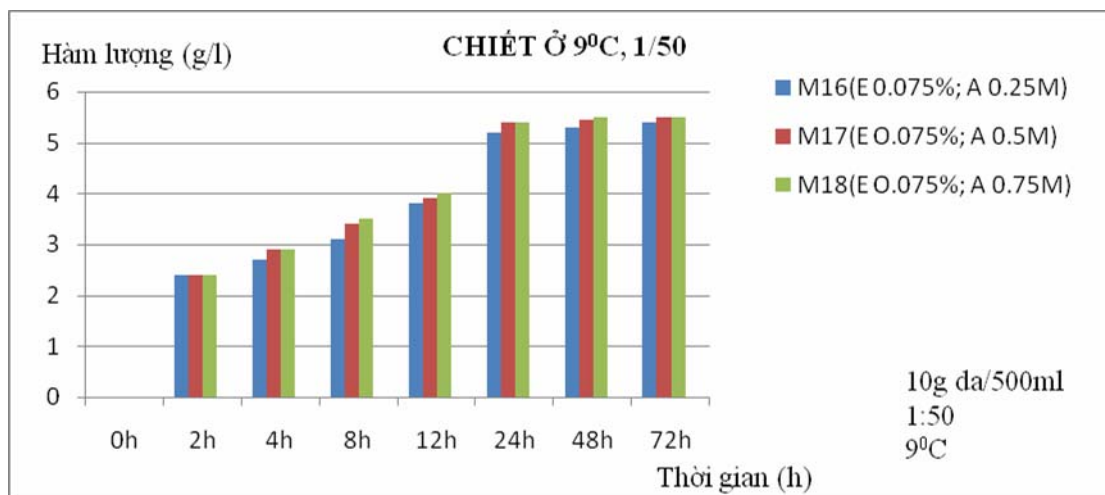




Hình 3.12: Kết quả chiết collagen ở 9°C, tỷ lệ R/L = 1:50



Hình 3.13 Kết quả chiết collagen ở 9°C, tỷ lệ R/L = 1:50



Hình 3.14 Kết quả chiết collagen ở 90°C, tỷ lệ R/L = 1:50

Kết luận:

- Điều kiện chiết collagen bằng enzyme pepsin kết hợp với acid acetic: khi bổ sung acid acetic làm hiệu suất chiết tăng đáng kể vì khi bổ sung thêm acid acetic tạo môi trường pH thích hợp cho enzyme pepsin hoạt động.

- Ở nồng độ enzyme pepsin 0.05%, acid acetic 0.5M, tỷ lệ 1:50, nhiệt độ chiết 40°C, thời gian chiết 24h. Hàm lượng collagen thu được là 5.4 g/l, việc tăng nồng độ, thời gian, nhiệt độ cũng làm tăng hiệu suất nhưng không đáng kể.

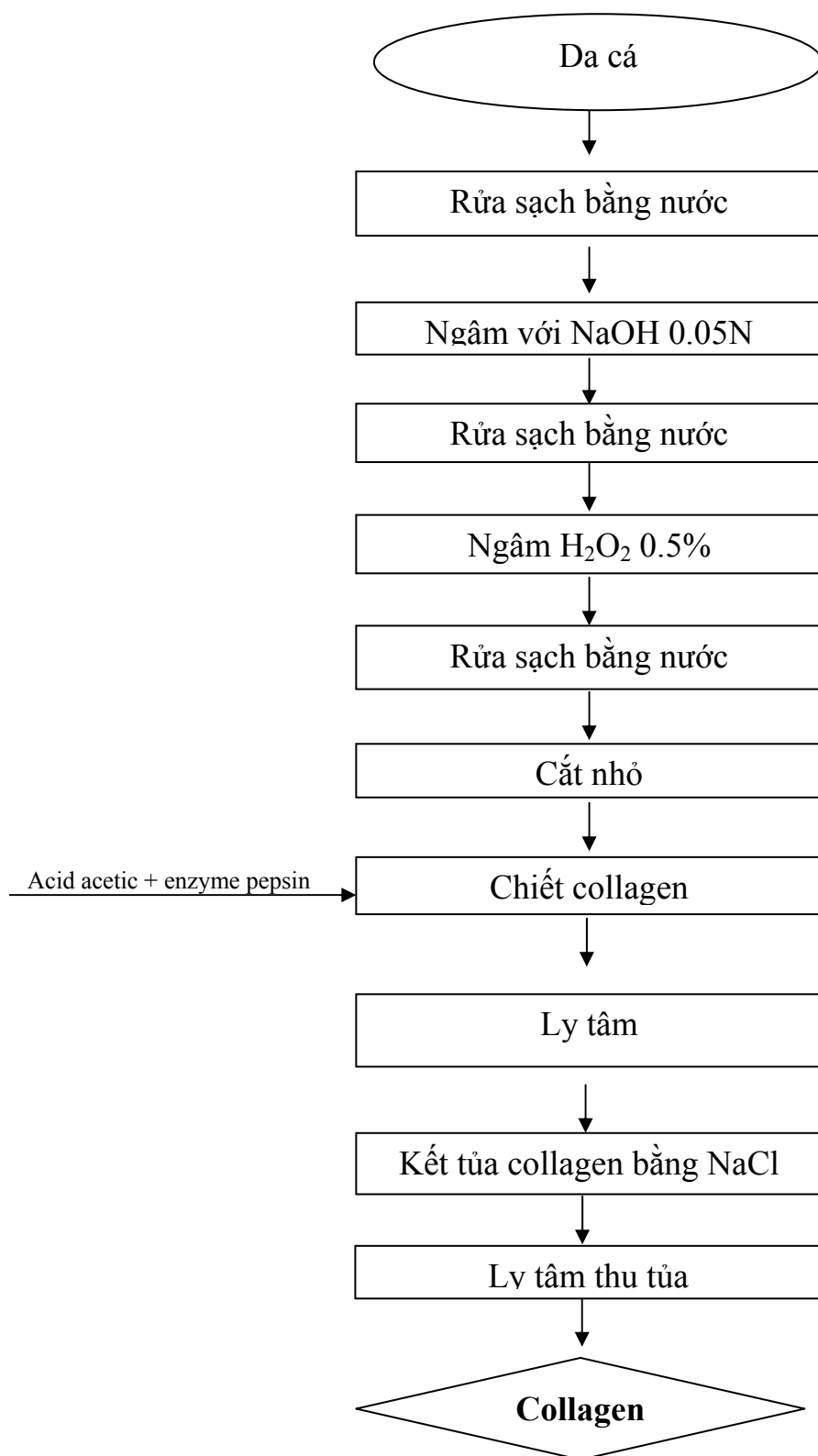
3.7 Xác định đặc tính lý hoá của collagen thu được:

Kết quả phân tích collagen ở dạng tủa:

Dịch chiết collagen được tạo tủa bằng NaCl ở 40°C, 3h. Lấy tủa đem phân tích thu được kết quả như sau:

- Hàm lượng ẩm: $86.2 \pm 0.7 \%$
- Tro: $1.92 \pm 0.02 \%$
- Hàm lượng chất hữu cơ: $5.42 \pm 0.09 \%$
- Hàm lượng lipid $0.13 \pm 0.02 \%$.
- Kết quả điện di:

3.8 Quy trình chiết collagen từ da cá tra bằng acid acetic và enzyme pepsin như sau:



Chương 4:

KẾT LUẬN – KIẾN NGHỊ

4.1 Kết luận:

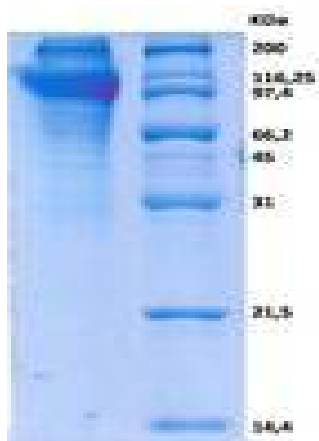
Qua kết quả nghiên cứu, chúng tôi đã tìm được điều kiện thích hợp cho quá trình thu nhận collagen như sau:

- Xử lý da cá bằng NaOH 0.05N trong thời gian 3h, H₂O₂ 1% trong thời gian 3h, da cá sạch, có màu trắng, mùi giảm nhiều, da cá trương nhẹ, da không bị biến tính.

- Phương pháp tách chiết bằng enzyme pepsin kết hợp với acid acetic cho hàm lượng collagen cao(5.4g/l) hơn phương pháp chiết bằng acid acetic (3.67g/l.)

- Xác định được nhiệt độ và thời gian, nồng độ tách chiết tốt nhất của enzyme pepsin kết hợp với acid acetic là:

- Nhiệt độ: 4⁰C
- Thời gian: 24h
- Nồng độ enzyme: 0.05%
- Nồng độ acid: 0.5M
- Kết quả điện di cho thấy collagen thu được là collagen type I gồm hai chuỗi α 1,2 (khoảng 115kDa) và 1 chuỗi β (khoảng 210kDa).



4.2 Kiến nghị:

- Trong quá trình nghiên cứu do thời gian có hạn nên việc thu thập tài liệu, tìm hiểu sâu rộng về quy trình sản xuất gelatin còn nhiều thiếu sót.

- Các trang thiết bị trong thí nghiệm còn nhiều hạn chế nên việc thực hiện đề tài gặp nhiều khó khăn.

Do đó, hướng đề xuất để hoàn thiện đề tài là:

- Phòng thí nghiệm cần được đầu tư thêm các trang thiết bị để thuận lợi cho việc nghiên cứu như: máy đông khô, bộ chiết béo sohxlet, tủ đông ...

PHỤ LỤC
MỘT SỐ HÌNH ẢNH TRONG QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT
COLLAGEN



Hình 1: Da cá nguyên liệu



Hình 2: Da ngâm với NaOH 0.05N và H₂O₂ trong 3h

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

- [1] Đỗ Quý Hải, Nguyễn Bá Lộc, Trần Thanh Phong và Cao Đăng Nguyên – Hoá Sinh – NXB đại học Huế.
- [2] Phạm Thị Thanh Hồng, Trần Mỹ Quan, Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Quang Tâm – Thực Tập Sinh Hoá Cơ Sở - NXB đại học Quốc Gia TP Hồ Chí Minh – 2004.
- [3] Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết, Lê Thị Thuỷ Tiên, Tạ Thu Hằng, Huỳnh Ngọc Oanh, Nguyễn Thuý Hương, Phan Thị Huyền – Công Nghệ Enzyme – NXB Đại học Quốc Gia TP Hồ Chí Minh – 2004.
- [4] Đỗ Minh Phụng – Đặng Văn Hiệp, Phân tích kiểm nghiệm sản phẩm thủy sản, Đại Học Thủy Sản Nha Trang, 1997.
- [5] Phan Thị Thanh Quế - Công Nghệ Chế Biến Thủy Sản – Đại Học Cần Thơ - 2005.
- [6] Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Thu Thuỷ, Nguyễn Xuân Sâm - Công Nghệ Enzyme – NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội – 2004.

TIẾNG ANH

- [7] Perumal, S., O. Antipova, and J.P. Orgel, collagen fibril architecture, domain organization, and triple – helical conformation govern its proteolysis. Proc Natl Acad Sci USA, 2008.105(8).
- [8] Shimizu, johsuke; shimizu, hideki; nagashima, koji; yamada, kunishige; takamashu, minori – Fish collagen and method of producing same – united states patent 6271350 -2001.
- [9] T.Randal – nature and structure of collagen – 1953.

TÀI LIỆU INTERNET

- [10] <http://www.biquyet.vn/Cham-soc-da/Tre-lai-nho-collagen-chuyen-dung.html>
- [11] [http:// www Collagenline.com](http://www.Collagenline.com)
- [12] [http:// www Collagen4u.com](http://www.Collagen4u.com)

- [13] http://hungvuongpanga.com/index.php?option=com_content&task=view&id=59&Itemid=6§ionid=&catid=&title=Tin%20t%E1%BB%A9c
- [14] http://vi.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1_tra
- [15] [http:// wikipedia.org/wiki/Collagen](http://wikipedia.org/wiki/Collagen)