



# NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ CÔNG NGHỆ ĐẾN HIỆU SUẤT TRÍCH LY COLLAGEN TỪ DA CÁ TRA (*PANGASIVUS HYPOPTHALMUS*)

## Effect of processing parameters on yield of collagen extraction from Tra fish (*Pangasius Hypophthalmus*) skin

Lê Thị Thu Hương<sup>1</sup>, Nguyễn Hoàng Dũng<sup>2</sup>, Phan Đình Tuấn<sup>3</sup>

<sup>1</sup>lenthuong1976@yahoo.com, <sup>2</sup>dzung@hcmut.edu.vn, <sup>3</sup>pdtuan@hcmunre.edu.vn

<sup>1</sup>Khoa Kỹ Thuật Hóa Học & Môi Trường, Trường Đại học Lạc Hồng, Đồng Nai, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Bách Khoa, Tp Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học Tài Nguyên và Môi Trường, Tp Hồ Chí Minh, Việt Nam

Đến tòa soạn: 20/09/2017; Chấp nhận đăng: 04/10/2017

**Tóm tắt.** Nghiên cứu được thực hiện trên cơ sở khảo sát ảnh hưởng của nồng độ acid acetic, hàm lượng enzyme pepsin và tỷ số dung môi/ da cá (L/S) đến hiệu suất trích ly collagen từ da cá tra (*Pangasius hypophthalmus*). Tiến hành quy hoạch thực nghiệm theo phương án quay bậc hai tâm xoay Box – Hunter với hàm mục tiêu là hiệu suất trích ly collagen. Kết quả phân tích thống kê cho thấy mức độ ảnh hưởng của các yếu tố đến hiệu suất trích ly collagen xếp theo thứ tự sau: acid acetic > pepsin > L/S. Hiệu suất trích ly tối đa 92,44% đạt được ở nồng độ acid acetic 0,47M; hàm lượng enzyme pepsin 0,49% và tỷ số L/S là 55ml/g. Sai số giữa giá trị thực nghiệm và dự đoán nằm trong khoảng 0,15 % -3,04 %, điều đó cho thấy phương trình hồi quy xác định được tương thích tốt với thực nghiệm.

**Từ khóa:** Trích ly; Collagen; *Pangasius hypophthalmus*; Da cá Tra

**Abstract.** This research was aimed to study the influence of acetic acid concentration, pepsin enzyme content and solvent/skin ratio (L/S) on yield of collagen extraction from tra fish (*Pangasius hypophthalmus*) skin. A rotatable quadratic design Box – Hunter was used for the experimental design and results analysis. Statistical analysis showed that each of the three independent variables (acetic acid concentration, liquid to solid ratio, and pepsin content) had a significant effect on yield of collagen extraction. The mathematical model gave an R<sup>2</sup> of 0,993 and a P value of less than 0,0001, which implied a good agreement between the predicted values and the actual values of the yield of PSC, thus confirmed a good generalization of the mathematical model. The optimal conditions to obtain maximum yield of PSC were identified as follows: 0,47 M of acetic acid concentration, 55 mL/g of liquid to solid ratio and 0,49 % of pepsin content. Under these optimized conditions, the experimental PSC extraction yield agreed closely with the predicted yield of 92,44 %.

**Keywords:** Extracting; Collagen; *Pangasius hypophthalmus*; Tra fish skin

### 1. GIỚI THIỆU

Collagen là một loại vật liệu sinh học được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất mỹ phẩm, thực phẩm và dược phẩm (Nair & Laurencin, 2007). Trước đây, collagen được tinh chế từ các nguồn nguyên liệu da và xương của trâu, bò, lợn. Hiện nay, do sự bùng nổ của bệnh bò điên, bệnh lở mồm long móng ở lợn và gia súc; thêm vào đó, vì lý do tôn giáo một số đạo cấm sử dụng sản phẩm có nguồn gốc từ bò, lợn nên trong những năm gần đây đa số các nghiên cứu tách chiết collagen tập trung vào nguồn nguyên liệu thay thế có nguồn gốc từ thủy sản (Gomez-Guillen et al, 2002) như: nghiên cứu tinh chế collagen từ da cá biển để làm vật liệu nha khoa (Bechir et al, 2008); nghiên cứu tính chất hóa sinh của dịch chiết collagen từ các loài cá có giá trị kinh tế thấp (Inwoo et al, 2008); tinh chế collagen từ da cá nóc bạc (*Lagocephalus gloveri*) (Senaratne et al, 2006); tinh chế collagen từ da cá đuối gai (*Raja kenoei*) (Hwang et al, 2007); nghiên cứu tính chất của collagen trích ly từ da cá nóc (*Takifugu rubripes*) (Nagai et al, 2002);... Nhìn chung, các nghiên cứu tách chiết collagen từ da cá chủ yếu tập trung vào các loại cá vùng ôn đới, chỉ có một vài nghiên cứu tách chiết collagen trên cá nhiệt đới như: nghiên cứu xác định đặc tính của collagen tách chiết từ da và xương cá hồng (bigeye snapper) (Kittiphattanabawon et al, 2005); nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình trích ly collagen loại I tách từ da

cá đuối (*Pomadasys kaakan*) (Aukkanit & Garnjanagoonchorn, 2010). Ở nước ta, các nhà máy chế biến cá tra, cá ba sa trên địa bàn Đồng bằng Sông Cửu Long hàng năm thải ra hàng ngàn tấn phế liệu da và xương cá, đây là nguồn nguyên liệu rất phong phú để tách chiết collagen. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố công nghệ đến hiệu suất trích ly collagen từ da cá tra được tiến hành với mục tiêu tối ưu hóa quá trình trích ly nhằm nâng cao hiệu suất thu nhận collagen.

### 2. NỘI DUNG

Collagen được trích ly theo phương pháp của Nagai và Suzuki (2000) với một số cải tiến cho phù hợp với đối tượng và mục tiêu nghiên cứu. Da cá sau xử lý sẽ được cắt nhỏ đến kích cỡ khoảng (3 x 3) mm để đem trích ly collagen bằng dung dịch acid acetic kết hợp với enzyme pepsin.

Nhiệt độ trong quá trình tách chiết collagen luôn duy trì ở 4 °C nhằm ức chế hoạt động của các enzyme và hệ vi sinh vật trong da cá, ngăn ngừa sự phân giải protein (Aukkanit & Garnjanagoonchorn, 2010). Phương pháp khuấy thường được sử dụng để gia tăng tốc độ khuếch tán collagen từ da cá vào môi trường trích ly (Wang et al, 2009), (Kiew P & Mat Don, 2013), (Nagai, 2004); trong nghiên cứu trích ly collagen từ da cá tra, tốc độ khuấy được chọn là 200 vòng/phút.

## 2.1 Nguyên liệu

Nguyên liệu là da cá Tra thu nhận từ Công ty Cổ phần Thủy Sản Việt An (QL 91, Khóm Thạnh An, P. Mỹ Thới, Tp. Long Xuyên, tỉnh An Giang) và được xử lý theo phương pháp của Lê Thị Thu Hương (2010).

## 2.2 Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1 Tiến hành thí nghiệm thăm dò theo phương pháp quy hoạch cổ điển

Khảo sát hiệu suất trích ly collagen ( $\eta$ ) tại thời điểm 24 h. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly collagen như: nồng độ acid acetic (M), hàm lượng enzyme pepsin (khối lượng enzyme pepsin / khối lượng da cá) và tỉ số dung môi/da cá (ml/g) thay đổi trong khoảng sau:

Nồng độ acid acetic (M): 0,25; 0,35; 0,45; 0,55; 0,65; 0,75

Hàm lượng enzyme pepsin ( % ): 0,25; 0,35; 0,45; 0,55; 0,65; 0,75; 0,85

Tỉ số dung môi/da cá = L/S (ml/g): 20; 40; 60; 80; 100  
Với mỗi thí nghiệm chỉ thay đổi thông số của một yếu tố, các yếu tố còn lại ấn định ở giá trị cố định.

### 2.2.2 Quy hoạch thực nghiệm theo phương án quay bậc hai tâm xoay Box - Hunter

Sau khi tìm được mức cơ sở của mỗi yếu tố từ các thí nghiệm thăm dò, bố trí thí nghiệm theo phương án quay bậc hai tâm xoay Box – Hunter, với mỗi yếu tố tiến hành ở ba mức: Mức thấp (-1), mức cao (+1) và mức cơ sở (0), các giá trị thực nghiệm và giá trị mã hóa được trình bày ở Bảng 1

**Bảng 1.** Giá trị mã hóa và giá trị thực nghiệm của các yếu tố khảo sát

Biến số	Ký hiệu	Đơn vị	Ký hiệu giá trị mã hóa		
			-1	0	+1
Nồng độ acid acetic	X <sub>1</sub>	mol/L	0,25	0,5	0,75
Hàm lượng pepsin	X <sub>2</sub>	w/w	0,25	0,5	0,75
Tỷ số L/S	X <sub>3</sub>	ml/g	20	40	60

Số thí nghiệm theo phương án quay bậc hai tâm xoay Box – Hunter là 20, được tính theo công thức  $2^k + 2k + n_0$ , với k là số yếu tố ảnh hưởng (k = 3),  $n_0$  là số thí nghiệm ở tâm ( $n_0 = 6$ ) và cánh tay đòn  $\alpha = 1,682$  (Nguyễn Cảnh, 1993).

Hàm đáp ứng được chọn là hiệu suất trích ly collagen (Y) có dạng đa thức bậc hai như sau:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

Với  $\beta_0$  là hệ số góc,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$  là các hệ số hồi quy,  $X_i$  là biến số bậc 1,  $X_i^2$  là biến số bậc 2 độc lập,  $X_i X_j$  biểu thị sự tương tác giữa các biến. Việc tính toán, xác định các hệ số của phương trình hồi quy, kiểm tra tính có nghĩa của các hệ số và kiểm tra sự tương hợp của phương trình hồi quy với thực nghiệm được thực hiện bằng phần mềm Design Expert (Software Version 10, Stat-Ease Inc).

### 2.2.3 Tối ưu hóa quá trình trích ly collagen bằng phương pháp bề mặt đáp ứng –Response Surface Methodology (RSM)

Phương pháp bề mặt đáp ứng là công cụ toán học thống kê hữu hiệu được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện trích ly collagen từ da cá trắm cỏ - grass carp (Wang et al, 2008), da cá ngừ vây vàng (Woo et al, 2008), bong bóng cá trắm cỏ (Zhang et al, 2010). Tối ưu hóa quá trình trích ly collagen nghĩa là xác định cực trị của phương trình hồi quy. Việc giải phương trình hồi quy để tìm hiệu suất trích ly cao nhất được thực hiện bằng phần mềm Design Expert (Software Version 10, Stat-Ease Inc).

### 2.2.4 Phương pháp xác định hàm lượng hydroxyproline

Định lượng hydroxyproline theo phương pháp của Ignat'eva et al (2007).

Hiệu suất trích ly collagen (H) được xác định thông qua hàm lượng hydroxyproline, một loại acid amin đặc trưng chỉ có trong collagen.

$H (\%) = (\text{Hàm lượng hydroxyproline trong dung dịch} / \text{Hàm lượng hydroxyproline trong da cá}) * 100$

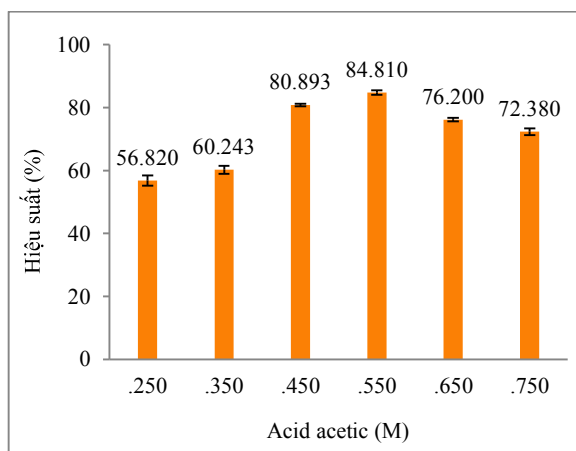
### 2.2.5 Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được thực hiện 3 lần lặp lại để tính giá trị trung bình, xử lý thống kê bằng phần mềm Excel 97-2003, phần mềm Design Expert (Software Version 10, Stat-Ease Inc), phần mềm thống kê R-3.2.2.

## 2.3 Kết quả nghiên cứu

### 2.3.1 Ảnh hưởng của nồng độ acid acetic đến hiệu suất trích ly collagen

Acid acetic là một loại dung môi thông dụng thường được sử dụng để trích ly collagen từ nhiều nguồn nguyên liệu khác nhau. Một số nghiên cứu so sánh các loại dung môi dùng để trích ly collagen cho thấy acid acetic cho hiệu quả và hiệu suất trích ly collagen cao hơn nhiều so với các dung môi khác (Sadowska et al, 2003), (Cheng et al, 2009), (Chia-Wei-Lin et al, 2013).



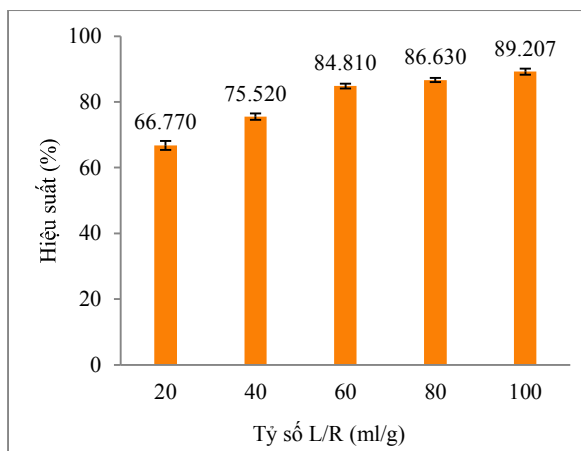
**Hình 1.** Hiệu suất trích ly collagen ở các nồng độ acid acetic khác nhau đạt được sau 24h với tỷ số L/S là 60 ml/g và hàm lượng pepsin là 0,5%

Ảnh hưởng của nồng độ acid acetic đến hiệu suất trích ly collagen được trình bày ở hình 1 cho thấy hiệu suất trích ly collagen tăng dần theo chiều tăng nồng độ acid acetic từ 0,25 M đến 0,55 M; hiệu suất trích ly cao nhất là 84,81 % đạt được ở nồng độ acid acetic bằng 0,55 M; tuy nhiên khi tiếp tục gia tăng nồng độ acid acetic trong khoảng từ 0,55M÷0,75M hiệu suất trích ly có xu hướng giảm dần. Kết quả này có thể giải thích như sau, ở giai đoạn ban đầu của quá trình trích ly, khi da cá tiếp xúc với dung dịch acid acetic sẽ xảy ra hiện tượng hydrate hóa sợi collagen

(Skierka & Sadowska, 2007). Khi nồng độ acid acetic thấp, collagen hydrate hóa không hoàn toàn nên hiệu suất trích ly chưa cao; khi tăng dần nồng độ acid acetic sẽ làm thay đổi tương tác tĩnh điện và cấu trúc sợi collagen theo sự thay đổi pH, mức độ hydrate hóa tăng dần đến gia tăng hiệu suất trích ly collagen (Verheul et al, 1998); đối với dung dịch acid acetic có nồng độ 0,75M giá trị pH tương ứng là 2,41 rất gần với giá trị pH đẳng điện của collagen (pH = 2) gây kết tủa collagen, sợi collagen bị co lại và giảm khả năng hòa tan (Wang et al, 2009), do đó hiệu suất trích ly collagen thấp. Vì vậy trong các khảo sát sau này chúng tôi chọn nồng độ acid acetic thay đổi từ 0,25 M - 0,75M.

### 2.3.2 Ảnh hưởng của tỷ số dung môi : Da cá (L/S) đến hiệu suất trích ly collagen

Theo kết quả trình bày ở Hình 2, hiệu suất trích ly collagen tăng dần theo sự gia tăng tỷ số dung môi/ da cá; điều này phù hợp với nghiên cứu của Wang et al (2009) cho rằng khi gia tăng tỷ số L/S sẽ làm tăng gradient nồng độ và tốc độ khuếch tán của collagen từ da cá vào dung dịch vì thế làm gia tăng hiệu suất trích ly collagen. Tuy nhiên khi tỷ số L/S > 60ml/g thì mức độ gia tăng hiệu suất trích ly không đáng kể.



**Hình 2.** Hiệu suất trích ly collagen sau 24 h ở các tỷ số L/S khác nhau; nồng độ acid acetic là 0,55M và hàm lượng pepsin là 0,5 %

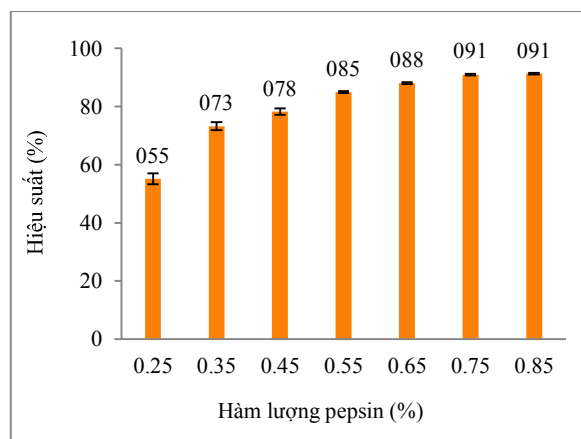
Đồng thời, kết quả phân tích phương sai bằng phương pháp Tukey cho thấy sự khác biệt hiệu suất trích ly ở tỷ số L/S 60 ml/g và 80 ml/g không có ý nghĩa thống kê ( $p = 0,228 > 0,05$ ). Trên cơ sở kết quả phân tích phương sai chúng tôi chọn tỷ số L/S trong khoảng từ 20-60ml/g cho các nghiên cứu sau này.

### 2.3.3 Ảnh hưởng của hàm lượng enzyme pepsin đến hiệu suất trích ly collagen

Trong nghiên cứu trích ly collagen, việc sử dụng dung dịch acid acetic với sự hỗ trợ của enzyme pepsin nhằm nâng cao hiệu suất trích ly collagen đã được nhiều nhà khoa học thực hiện. Theo Skierka & Sadowska (2007) enzyme pepsin không những tác động lên hai đầu không xoắn (đầu telopeptide) của sợi collagen làm cho collagen dễ dàng tách ra khỏi da cá mà còn có tác dụng phân giải các protein khác có trong da cá. Theo Zhang et al (2007) enzyme pepsin chỉ phá vỡ các liên kết ngang ở vùng telopeptide mà không gây ảnh hưởng đến cấu trúc bộ ba của phân tử collagen. Chính vì vậy khi trích ly collagen bằng acid acetic kết hợp với enzyme pepsin sẽ làm gia tăng khả năng hòa tan collagen

vào dung dịch so với trường hợp không sử dụng enzyme pepsin.

Kết quả khảo sát quá trình trích ly collagen theo sự gia tăng hàm lượng pepsin ở hình 3 cho thấy: hiệu suất trích ly gia tăng theo sự gia tăng hàm lượng pepsin; tuy nhiên khi hàm lượng pepsin > 0,75 %, nếu tiếp tục tăng hàm lượng pepsin thì hiệu suất trích ly tăng không đáng kể. Đồng thời, theo kết quả phân tích phương sai bằng phương pháp Tukey cho thấy sự khác biệt hiệu suất trích ly ở hàm lượng enzyme pepsin 0,75 % và 0,85 % không có ý nghĩa thống kê ( $p = 0,999 > 0,05$ ). Trên cơ sở kết quả phân tích phương sai chúng tôi chọn hàm lượng enzyme trong khoảng từ 0,25 % - 0,75 % cho các nghiên cứu sau này.



**Hình 3.** Hiệu suất trích ly collagen sau 24 h ở các hàm lượng pepsin khác nhau; nồng độ acid acetic là 0,55M và tỷ số L/S là 60 ml/g

### 2.3.4 Phân tích thống kê và dự đoán phương trình hồi quy

Kế hoạch thực nghiệm theo phương án quay bậc hai tâm xoay Box – Hunter được trình bày ở bảng 2. Đánh giá tính có nghĩa của các hệ số hồi quy theo chuẩn Student, đánh giá tính phù hợp của phương trình hồi quy theo chuẩn Fisher. Phần mềm “Design Expert 10” được sử dụng để tính toán các số liệu trong quy hoạch, phân tích phương sai và phân tích hồi quy.

**Bảng 2.** Kế hoạch thực nghiệm xác định hiệu suất trích ly collagen theo phương án quay bậc hai tâm xoay Box – Hunter

STT	Nồng độ acid acetic $X_1$ (M)	Hàm lượng pepsin $X_2$ (%)	Tỷ số L/S $X_3$ (ml/g)	Hiệu suất (%) $Y$ (%)
1	0,25	0,25	20	58,41 ± 0,21
2	0,75	0,25	20	76,83 ± 0,58
3	0,25	0,75	20	72,62 ± 0,53
4	0,75	0,75	20	73,22 ± 0,31
5	0,25	0,25	60	80,81 ± 1,36
6	0,75	0,25	60	84,20 ± 1,58
7	0,25	0,75	60	86,54 ± 1,29
8	0,75	0,75	60	71,86 ± 0,69
9	0,5	0,5	40	91,88 ± 0,98
10	0,5	0,5	40	92,42 ± 0,95
11	0,5	0,5	40	90,27 ± 0,82

12	0,5	0,5	40	89,53 ± 0,62
13	0,1	0,5	40	60,55 ± 0,33
14	0,9	0,5	40	63,56 ± 0,67
15	0,5	0,1	40	67,28 ± 0,73
16	0,5	0,9	40	69,43 ± 0,53
17	0,5	0,5	6,5	71,34 ± 0,29
18	0,5	0,5	73,5	90,81 ± 1,27
19	0,5	0,5	40	88,47 ± 0,84
20	0,5	0,5	40	87,73 ± 0,54

(\*) Giá trị trung bình ± SD được tính toán từ 3 mẫu thí nghiệm ở cùng điều kiện (p < 0,05).

Kết quả phân tích ANOVA theo phần mềm Design Expert 10 được trình bày ở bảng 3 cho thấy các hệ số  $\beta_1, \beta_3, \beta_1\beta_2, \beta_1\beta_3, \beta_2\beta_3, \beta_1^2, \beta_2^2, \beta_3^2$  đều có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy  $p < 0,05$ , riêng hệ số  $\beta_2 = 0$  và có  $p = 0,1520$ , nghĩa là hàm lượng enzyme pepsin bậc nhất ảnh hưởng không đáng kể đến hiệu suất trích ly collagen.

**Bảng 3.** Kết quả phân tích ANOVA từ phương trình bậc hai

Yếu tố	Hệ số hồi quy	Giá trị F	Giá trị p Prob > F	Mức độ ảnh hưởng
X <sub>1</sub>	204,97	6,39	0,0323	Đáng kể
X <sub>2</sub>	0	2,45	0,1520	Không đáng kể
X <sub>3</sub>	1,22	238,62	< 0,0001	Đáng kể
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-71,78	93,10	< 0,0001	Đáng kể
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	-0,76	66,40	< 0,0001	Đáng kể
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	-0,43	21,41	0,0012	Đáng kể
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-135,17	594,27	< 0,0001	Đáng kể
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-100,38	327,74	< 0,0001	Đáng kể
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-4,44	26,29	0,0006	Đáng kể

Từ kết quả phân tích ANOVA nhận được phương trình hồi quy mô tả ảnh hưởng của các yếu tố đến hiệu suất trích ly collagen có dạng như sau:

$$Y = -32,46 + 204,97 X_1 + 1,22 X_3 - 71,78 X_1 X_2 - 0,76 X_1 X_3 - 0,43 X_2 X_3 - 135,17 X_1^2 - 100,38 X_2^2 - 4,44 X_3^2 \quad (1)$$

Phương trình hồi quy (1) cho thấy nồng độ acid acetic (X<sub>1</sub>) và tỷ số dung môi/ cơ chất (X<sub>3</sub>) có hệ số dương nên là hai yếu tố làm gia tăng hiệu suất thu nhận collagen (Y) theo xu hướng kể từ mức cơ sở tiến đến cận trên của X<sub>1</sub>, X<sub>3</sub>; vì nồng độ acid acetic có hệ số hồi quy là 204,97 lớn hơn hệ số hồi quy của tỷ số L/S (1,22) nên có ảnh hưởng lớn hơn đến Y. Các hệ số còn lại có giá trị âm sẽ ảnh hưởng đến Y theo xu hướng kể từ mức cơ sở của các yếu tố nếu tiến đến cận trên sẽ làm giảm hiệu suất trích ly. Phương trình (1) cũng thể hiện tương tác giữa nồng độ acid acetic với hàm lượng enzyme (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>), tương tác giữa nồng độ acid acetic với tỷ số dung môi/ cơ chất (X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>) và tương tác giữa hàm lượng pepsin với tỷ số L/S (X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>); việc xét ảnh hưởng của các yếu tố X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> cũng như mối tương tác giữa chúng đến Y khá phức tạp. Do đó, cần giải phương trình hồi quy (1) để tìm cực trị Y đồng thời xác định giá trị tối ưu của các yếu tố.

Bảng 4 cho thấy giá trị p của mô hình < 0,0001 và giá trị p của sự không tương thích (lack of fit) là không đáng kể và bằng 0,3763, điều đó chứng tỏ mô hình bậc hai đưa ra hoàn toàn có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 99,99 %. Giá trị R<sup>2</sup> của mô hình bằng 0,993 chứng tỏ hiệu suất trích ly collagen thu được từ thực nghiệm gần với giá trị dự đoán của mô hình.

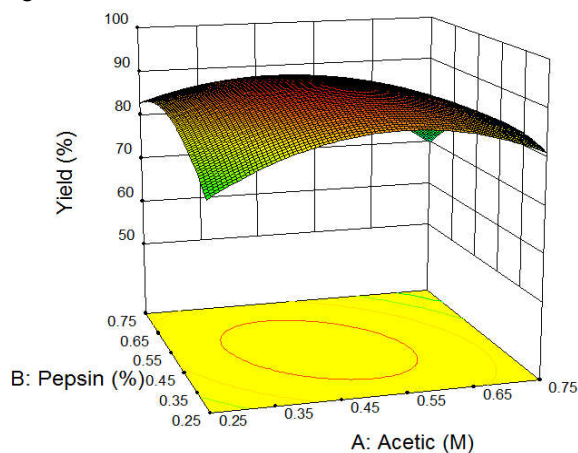
**Bảng 4.** Kết quả phân tích sự phù hợp của mô hình với thực nghiệm

Yếu tố	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị p Prob > F	Đánh giá
Mô hình	2200,21	244,47	141,35	< 0,0001	Tin cậy
Phần dư	15,57	1,73			
Sự không tương thích (Lack of Fit)	9,97	1,99	1,43	0,3763	Không đáng kể
Sai số thuần (Pure Error)	559	1,40			
Tương quan tổng	2375,79				

### 2.3.5 Tối ưu hóa giá trị các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly collagen bằng phương pháp bề mặt đáp ứng RSM

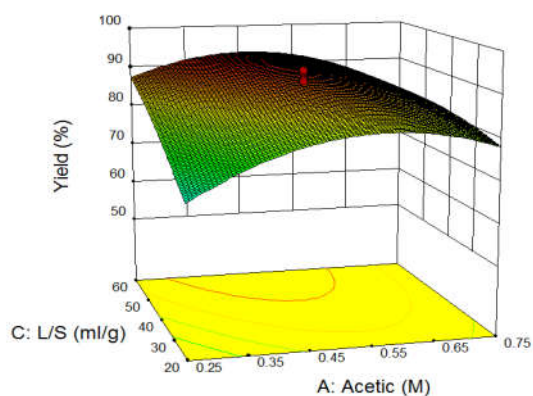
Để tìm cực trị của phương trình hồi quy (1) chúng tôi sử dụng phần mềm Design expert 10, mô hình đã dự đoán hiệu suất trích ly collagen tối đa là 92,44 % đạt được ở nồng độ acid acetic - 0,474M, hàm lượng pepsin - 0,494 % và tỷ số L/S là 55,247ml/g.

Mối quan hệ giữa các yếu tố đến hiệu suất trích ly collagen được minh họa rõ hơn khi quan sát bề mặt đáp ứng ở hình 4 - 6. Tác động dương của hai yếu tố nồng độ acid acetic và tỷ số L/S đến hiệu suất trích ly collagen tương tự như nghiên cứu của Zhang et al (2010) về trích ly collagen từ bong bóng cá trắm cỏ bằng phương pháp bề mặt đáp ứng.

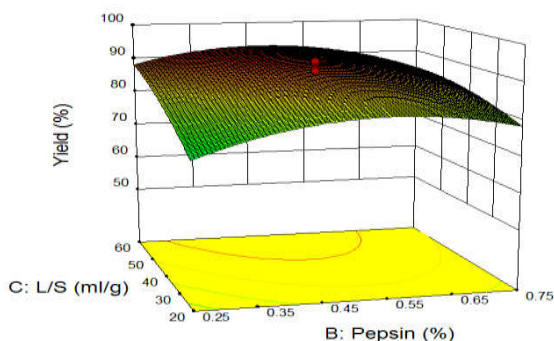


**Hình 4.** Ảnh hưởng của nồng độ acid acetic và hàm lượng pepsin đến hiệu suất trích ly collagen





Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ acid acetic và tỷ số L/S đến hiệu suất trích ly collagen



Hình 6. Ảnh hưởng của hàm lượng pepsin và tỷ số L/S đến hiệu suất trích ly collagen

### 2.3.6 Kiểm tra sự phù hợp của mô hình dự đoán với thực nghiệm

Để kiểm tra kết quả của mô hình, ta tiến hành 5 thí nghiệm lặp lại ở điều kiện tối ưu: nồng độ acid acetic 0,47 M, hàm lượng pepsin 0,49 % và tỷ số L/S 55 ml/g. Kết quả trình bày ở bảng 5 cho thấy sai số giữa giá trị thực nghiệm và dự đoán nằm trong khoảng 0,15 % -3,04 %, điều đó cho thấy sự tương quan chặt chẽ giữa kết quả thực nghiệm và mô hình với độ tin cậy 95 %.

Bảng 5. So sánh kết quả thực nghiệm và mô hình

STT	Hiệu suất thực nghiệm (%)	Hiệu suất tính toán (%)	Sai số (%)
1	91,74 ± 0,84	92,44	0,76
2	90,86 ± 0,66	92,44	1,71
3	89,63 ± 0,88	92,44	3,04
4	92,58 ± 0,92	92,44	0,15
5	93,48 ± 0,56	92,44	1,13

### 3. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được quy luật ảnh hưởng của ba yếu tố (nồng độ acid acetic, hàm lượng enzyme pepsin và tỷ số dung môi/ da cá) đến hiệu suất trích ly collagen có dạng phương trình bậc 2. Phương trình hồi quy có độ tin cậy cao, thể hiện ở hệ số tương quan  $R^2$  bằng 0,993 và giá trị p nhỏ hơn 0,001. Bằng phương pháp bề mặt đáp ứng đã xác định được hiệu suất trích ly tối đa là 92,44% đạt được ở nồng độ acid acetic 0,47M; hàm lượng enzyme pepsin 0,49% và tỷ số L/S là 55ml/g. Các kết quả kiểm chứng ở giá trị tối ưu

của ba yếu tố cho thấy mức độ tương quan chặt chẽ giữa mô hình và thực nghiệm.

### 4. CẢM ƠN

Tác giả xin cảm ơn Trường Đại học Lạc Hồng và Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện về thời gian, trang thiết bị thực nghiệm để tác giả thực hiện nghiên cứu này.

### 5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Aukkanit, N.& Garnjanagoonchorn, W., "Temperature effects on type I pepsin solubilised collagen extraction from silver - line grunt skin and its in vitro fibril self- assembly", Journal of Science Food Agriculture, vol. 90, no. 15, pp. 2627-2632, 2010.
- [2] Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A. & Hara, K., "Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skin of underutilised fishes", Food Chemistry, vol. 108, pp. 49-54, 2008.
- [3] Bechir, N., Sirbu, R., Leca, M., Maris, M., Maris, D.A., Cadar, E.M. & Maris, M., "The nanobiotechnology of obtaining of collagen gels from marine fish skin and yours rheological properties for using like new materials in dental medicine", World Academy of Science, Engineering and Technology, vol. 2, pp. 1106-1112, 2008.
- [4] Cheng, F.Y., Hsu, F.W., Chang, H.S., Lin, L.C. & Sakata, R., "Effect of different acids on the extraction of pepsin solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet", Food Chemistry, vol. 113, pp. 563-567, 2009.
- [5] Chia-Wei Lin, Michael Loughran, Tsung-Yu Tsai & Shuo-Wen Tsai, "Evaluation of convenient extraction of chicken skin collagen using organic acid and pepsin combination", Journal of The Chinese Society of Animal Science, vol. 42, no.1, pp. 27-38, 2013.
- [6] Ghaly, A.E., Dave, D. Budge, S. & Brooks, M.S., "Fish spoilage mechanism and preservation techniques: Review", American Journal of Applied Sciences, vol. 7, no. 7, pp. 859-877, 2010.
- [7] Giraud-Guille, M.M., Besseau, L., Chopin, C., Durand, P. & Herbage, D., "Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states", Biomaterials, vol. 21, no. 9, pp. 899-906, 2000.
- [8] Gómez-Guillén, M.C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M.D.L.M.O. NU., Alizarbe, M. & Montero, P., "Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study", Food Hydrocolloids, vol. 16, pp. 25-34, 2002.
- [9] Huong, L.T.T., Truong, N.N., Dung, N.H. & Tuan, P.D., "Treatment of Tra fish (Pangasius hypophthalmus) skin for collagen extraction", Journal of Science and Technology, vol. 48, pp. 319-328, 2010.
- [10] Hwang, J.H., Mizuta, S., Yokoyama, Y., Yoshinaka, R., "Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (Raja kenoeji)", Food Chemistry, vol. 100, pp. 921-925, 2007.
- [11] Ignat'eva, N.Y., Danilov, N.A., Averkiev, S.V., Obrezkov, M.V., Lunin, V.V. & Sobol, E.N., "Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues", Journal of Analytical Chemistry, vol. 62, pp. 51-57, 2007.
- [12] Kiew, P.L. & Mat, Don., "Screening of significant factors in collagen extraction from hybrid Clarias sp. using a statistical tool", International Food Research Journal, vol. 20, no. 4, pp. 1913-1920, 2013.
- [13] Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. & Tanaka, M., "Characterisation of acid soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (Priacanthus tayenus)", Food Chemistry, vol. 89, pp. 363-372, 2005.
- [14] Nair, L. & Laurencin, C. B., "iodegradable polymers as biomaterial", Prog. Polym. Sci, vol. 32, pp. 762-798, 2007.

- [16] Nagai, T., Araki, Y. & Suzuki, N., "Collagen of the Skin of Ocellate Puffer Fish (*Takifugu rubripes*)", *Food Chemistry*, vol. 78, no. 2, pp. 173-177, 2002.
- [17] Nagai, T., "Collagen from Diamondback Squid (*Thysanoteuthis rhombus*) Outer Skin", *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 59, no. 3, pp. 271-275, 2004.
- [18] Nagai, T. & Suzuk, N., "Isolation and characterization of collagen from zhizostomous jellyfish (*Rhopilema asamushi*)", *Food Chemistry*, vol. 70, pp. 205-208, 2000.
- [19] Nguyễn Cảnh, Qui Hoạch Thực Nghiệm, Trường Đại Học Bách Khoa TP. Hồ Chí Minh, 1993.
- [20] Rao, K., "Recent developments of collagen based materials for medical applications and drug delivery system", *Journal of Biomaterial Science*, vol. 7, pp. 623-631, 1995.
- [21] Sadowska, M., Kolodziejaska, I. & Niecikowska, C., "Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*)", *Food Chemistry*, vol. 81, pp. 257-262, 2003.
- [22] Senaratne, L.S., Park, P.J. & Kim, S.K., "Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin", *Bioresource Tech*, vol. 97, pp. 191-197, 2006.
- [23] Skierka, E. & Sadowska, M., "The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*)", *Food Chemistry*, vol. 105, pp. 1302-1306, 2007.
- [24] Verheul, M., Sebastianus, P.F.M. & Kees, G. de Kruit., "Kinetics of heat induced aggregation of beta-Lactoglobulin", *J. Agric, Food Chem*, vol. 46, pp. 896-903, 1998.
- [25] Wang, L.Z., Yang, B., Du, X., Yang, Y. & Liu, J., "Optimization of conditions for extraction of acid soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology", *Innovative Food Science and Engineering Technologies*, vol. 9, no. 4, pp. 604-607, 2008.
- [26] Wang, L., Yang, B. & Du, X.Q., "Extraction of acid soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin", *J. Food Process Eng*, vol. 32, pp. 743-751, 2009.
- [27] Woo, J.W., Yu, S.T., Cho, S.M., Lee, Y.B. & Kim, S.B., "Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin", *Food Hydrocolloids*, vol. 22, no. 5, pp. 879-887., 2008.
- [28] Zhang, B., Chen, Y., Wei, X., Li, M. & Wang, M., "Optimization of conditions for collagen extraction from the swim bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology", *International Journal of Food Engineering*, vol. 6, no. 3, pp. 1-18, 2010.
- [29] Zhang, Y., Liu, W., L. G., Shi, B. Miao, Y., & Wu, X., "Isolation and partial characterization of pepsin soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)", *Food Chem*, vol. 103, pp. 906-912, 2007.

#### TIÊU SỬ TÁC GIẢ



*Lê Thị Thu Hương*

Năm sinh 1976, Hải Dương. Tốt nghiệp Đại học và Thạc sĩ tại trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh năm 2000 và 2003. Hiện là phó trưởng khoa Kỹ Thuật Hóa học và Môi trường, Trường Đại học Lạc Hồng. Lĩnh vực nghiên cứu: Hóa sinh, Hóa học thực phẩm.