

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Kim Dung

**NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT COLLAGEN TỪ SỮA
RHOPILEMA HISPIDUM (VANHOFFEN, 1888)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ

NGUYỄN THỊ KIM DUNG

**SINH HỌC THỰC
NGHIỆM**

2022

Hà Nội - 2022

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Kim Dung

NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT COLLAGEN TỪ SÚA

***RHOPILEMA HISPIDUM* (VANHOFFEN, 1888)**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Phạm Thế Thư
2. TS. Lê Thanh Tùng

Hà Nội - 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận văn này là công trình nghiên cứu của cá nhân tôi, được thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của TS. Phạm Thế Thư và TS. Lê Thanh Tùng. Các số liệu, kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận văn đảm bảo tính trung thực, khách quan, đồng thời các kết quả này chưa từng được sử dụng hoặc công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả

Nguyễn Thị Kim Dung

LỜI CẢM ƠN

Luận văn này được hoàn thành tại Viện Tài nguyên và Môi trường biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong quá trình nghiên cứu, tôi đã nhận được nhiều sự giúp đỡ quý báu của quý thầy cô, các nhà khoa học, các đồng nghiệp, gia đình và bạn bè.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc đến TS. Phạm Thế Thu - Viện Tài nguyên và Môi trường biển, TS. Lê Thanh Tùng - Viện nghiên cứu Hải sản, những người thầy đã tận tâm định hướng, chỉ dẫn cho tôi về chuyên môn, đồng thời động viên, khích lệ và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn.

Tôi xin cảm ơn ban lãnh đạo tại Viện Tài nguyên và Môi trường biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện giúp đỡ, chia sẻ kinh nghiệm, đưa ra những lời khuyên bổ ích trong suốt thời gian tôi thực tập tại Viện.

Tôi xin trân trọng cảm ơn tất cả các thầy cô, cán bộ của Học viện Khoa học và Công nghệ đã giảng dạy, cung cấp cho tôi các kiến thức mới và giúp tôi hoàn thành chương trình đào tạo.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới toàn thể gia đình, người thân và bạn bè đã quan tâm, khích lệ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và tiến hành luận văn này.

Học viên

Nguyễn Thị Kim Dung

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	ii
DANH MỤC BẢNG	vi
DANH MỤC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	vii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. Trữ lượng và khả năng khai thác sứa biển ở Việt Nam.....	4
1.1.1. Trữ lượng sứa biển ở Việt Nam	4
1.1.2. Khả năng khai thác sứa biển ở Việt Nam.....	5
1.1. Collagen và collagen từ sứa biển.....	7
1.1.1. Cấu tạo và cấu trúc collagen.....	7
1.1.2. Phân loại collagen	8
1.1.3. Collagen từ sứa biển.....	8
1.1.4. Ứng dụng của collagen.....	10
1.2. Nhu cầu collagen và nguồn nguyên liệu sản xuất collagen	11
1.3. Collagen peptide	12
1.4. Công nghệ tách chiết collagen.....	14
1.4.1. Giai đoạn xử lý nguyên liệu	14
1.4.2. Giai đoạn chiết xuất.....	15
1.4.3. Giai đoạn thu hồi	16
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.1. Nguyên liệu, hóa chất và thiết bị nghiên cứu	17
2.1.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu	17
2.1.2. Nguyên vật liệu và hóa chất nghiên cứu	17
2.2. Phương pháp nghiên cứu	18
2.2.1. Phương pháp thử nghiệm	18
2.2.2. Các phương pháp phân tích.....	21
2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu	25
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	26

3.1. Nghiên cứu ứng dụng enzyme pepsin trong tách collagen từ sữa <i>R. hispidum</i>	26
3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme pepsin tới hiệu suất tách chiết collagen từ sữa <i>R. hispidum</i>	26
3.3.2. Ảnh hưởng của của thời gian tới hiệu suất tách chiết collagen từ sữa <i>R. hispidum</i> bằng enzyme pepsin	28
3.3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ sữa với thể tích dung môi enzyme pepsin tới hiệu suất tách chiết collagen từ sữa <i>R. hispidum</i>	30
3.2. Xác định một số đặc điểm của sản phẩm collagen.....	31
3.2.1. Đặc điểm thành phần và trọng lượng của collagen	31
3.2.2. Đặc điểm của collagen dưới kính hiển vi quét (SEM).....	33
3.2.3. Đặc điểm phổ phân tử (FTIR) của collagen	37
3.2.4. Đặc điểm thành phần và số lượng axit amine của collagen	39
3.2.5. Một số đặc điểm khác của collagen.....	41
3.3. Nghiên cứu thử nghiệm phân cắt collagen bằng enzyme tạo sản phẩm collagen peptide.....	42
3.3.1. Kết quả thử nghiệm phân cắt collagen tạo sản phẩm collagen peptide bằng enzyme alkaline protease	42
3.3.2. Đặc điểm sản phẩm collagen peptide dưới kính hiển vi quét (SEM).....	45
3.3.3. Đặc điểm phân bố kích thước hạt collagen peptide	48
KẾT LUẬN	50
KIẾN NGHỊ	50
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	51

DANH MỤC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

EDTA	Ethylendiamin Tetraacetic Acid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
ATP	Adenosin triphosphat
QCVN	Quy chuẩn Việt Nam
TCVN	Tiêu chuẩn Việt Nam
UV	Ultra Violet – Tia cực tím
FESEM	Field Emission Scanning Electron Microscope
DLS	Dynamic light scattering

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Trữ lượng nguồn lợi sứa kinh tế ước tính ở các vùng ven biển Việt Nam [2]	5
Bảng 1.2. Khả năng khai thác nguồn lợi sứa kinh tế ước tính ở vùng ven biển Việt Nam [2].....	6
Bảng 1.3. Hiệu suất tách chiết collagen từ các nguyên liệu khác nhau	9
Bảng 3.1. Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố giữa các nồng độ enzyme pepsin thử nghiệm (giá trị $P=0,05$)	27
Bảng 3.2. Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố giữa các thời gian tách chiết thử nghiệm (giá trị $P=0,05$).....	29
Bảng 3.3. Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố giữa các tỷ lệ mẫu sứa và dung môi thử nghiệm (giá trị $P=0,05$).....	31
Bảng 3.4. Dải phổ hấp phụ của amide phân tử giữa collagen từ sứa <i>R. hispidum</i> và từ các nguyên liệu biển khác [23]	39
Bảng 3.5. Thành phần axit amin trong collagen từ thí nghiệm và một số loài sứa khác (g/1000g)	39
Bảng 3.6. Một số đặc điểm dinh dưỡng của collagen.....	42
Bảng 3.7. Kết quả thử nghiệm phân cắt collagen thành collagen peptide.....	43

DANH MỤC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Mô hình cấu trúc của sợi collagen	7
Hình 2.1. Hình ảnh loài sứa <i>R. hispidum</i> (Vanhöffen, 1888)	17
Hình 2.2. Sơ đồ các bước thí nghiệm tách chiết collagen sử dụng enzyme pepsin	19
Hình 2.3. Sơ đồ các bước phân cắt collagen thành collagen peptide bởi enzyme alkaline protease	21
Hình 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme pepsin tới hiệu suất thu collagen từ sứa <i>R. hispidum</i>	26
Hình 3.2. Ảnh hưởng của thời gian sử dụng enzyme pepsin tới hiệu suất thu collagen từ sứa <i>R. hispidum</i>	28
Hình 3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ giữa khối lượng sứa và thể tích dung môi enzyme pepsin tới hiệu suất thu collagen từ sứa <i>R. hispidum</i>	30
Hình 3.4. Bản điện di SDS-PAGE của mẫu collagen tách chiết	32
Hình 3.5. Ảnh chụp SEM cấu trúc bột collagen tách chiết từ sứa	36
Hình 3.6. Dải phổ hấp thụ của các mẫu collagen được đọc trên	38
Hình 3.7. Ảnh chụp SEM của mẫu collagen 1	46
Hình 3.8. Ảnh chụp SEM của mẫu collagen 2	47
Hình 3.9. Phân bố kích thước của hệ collagen 1	48
Hình 3.10. Phân bố kích thước của hệ collagen 2	48

MỞ ĐẦU

Việt Nam có nguồn lợi sứa biển vô cùng dồi dào. Theo ước tính, trữ lượng sứa biển nước ta lên đến hàng triệu tấn và công suất khai thác lên tới hàng trăm nghìn tấn/năm [1] [2]. Đặc biệt loài sứa *Rhopilema hispidum* (Vanhoffen, 1888) (*R. hispidum*) là nguồn lợi biển có tiềm năng mang lại lợi ích kinh tế và xã hội cao. Mặc dù sản lượng khai thác sứa hàng năm trên thế giới nói chung và ở nước ta nói riêng rất lớn, nhưng sứa biển Việt Nam chủ yếu chỉ được khai thác và chế biến thô, đa phần là các sản phẩm sơ chế phục vụ tiêu thụ nội địa làm thực phẩm và xuất khẩu (sứa muối) với giá trị kinh tế rất thấp [2]. Mặt khác, do ảnh hưởng của sự thay đổi các điều kiện môi trường, tần số và quy mô hiện tượng sứa “nở hoa” ngày càng gia tăng. Điều này dẫn đến những ảnh hưởng nghiêm trọng tới môi trường, các nguồn lợi thủy sản khác, trực tiếp và gián tiếp tác động tiêu cực đến kinh tế - xã hội.

Collagen là một protein cấu trúc, là thành phần chính trong nhiều mô liên kết. Trong công nghiệp, collagen từ lâu đã được ứng dụng rộng rãi như một nguyên liệu quan trọng trong ngành y dược, mỹ phẩm và thực phẩm. Ước tính thị trường collagen toàn cầu năm 2016 là 3,71 tỷ USD, dự kiến sẽ có sự tăng trưởng mạnh và đạt 6,63 tỷ USD vào năm 2025 [3]. Thị trường nguyên liệu collagen toàn cầu dự báo sẽ có khả năng đạt được tốc độ tăng trưởng kép 10,4% hàng năm trong khoảng thời gian từ năm 2017 đến năm 2025 [4]. Tuy nhiên, nguyên liệu sản xuất collagen hiện nay chủ yếu là xương và da của các loài gia súc. Những nguồn nguyên liệu này hiện không đủ nguồn cung cấp dẫn đến giá thành ngày càng cao, ảnh hưởng trực tiếp tới nguồn cung và giá collagen trên quy mô toàn cầu. Mặt khác, sự ràng buộc tôn giáo (người Hồi giáo, người Hindu và người Do Thái chiếm tới 38,4% dân số toàn cầu) cũng tạo ra sự hạn chế trong việc sử dụng các sản phẩm từ lợn và bò. Do đó, giải pháp cấp bách là tìm ra nguồn nguyên liệu thay thế trong việc sản xuất collagen.

Collagen có nguồn gốc từ biển đã được công nhận có nhiều tác dụng ưu việt hơn so với collagen từ các nguồn nguyên liệu khác, như có độ an toàn cao, ít có nguy cơ truyền bệnh, không có rào cản về tôn giáo trong việc sử dụng, nguồn nguyên liệu phong phú và năng suất chiết xuất lại cao hơn so với các nguồn nguyên liệu khác [5] [6]. Đặc biệt collagen từ sứa biển lại có thêm các đặc điểm ưu việt hơn, tiềm năng trong ứng dụng trong y dược. Do vậy, xét về

mặt kinh tế và ý nghĩa xã hội thì sữa biển được xem là đối tượng ưu việt có thể dùng làm nguyên liệu thay thế trong sản xuất collagen.

Từ lâu, nhiều nghiên cứu tách chiết collagen từ nguồn sinh vật biển đã được nghiên cứu và ứng dụng trong thực tiễn. Mặc dù có hàm lượng collagen cao, tuy nhiên nghiên cứu tách chiết collagen từ sữa biển còn hạn chế. Trên thế giới, các nghiên cứu tách chiết collagen từ sữa đã được thực hiện trên một số loài, với phương pháp chủ yếu là sử dụng enzyme và các loại axit.

Tại Việt Nam, dù sản lượng sữa hàng năm rất cao và là loài có tác động lớn đến môi trường sinh thái biển cũng như nhiều khía cạnh đời sống, kinh tế nhưng các nghiên cứu về loài sinh vật này vẫn còn rất hạn chế. Việc nghiên cứu sữa mới bắt đầu được tiến hành trong khoảng 50 năm trở lại đây. Các nghiên cứu mới chỉ tập trung khảo sát, đánh giá về số lượng loài, sản lượng và phân bố các loài, chưa có nhiều nghiên cứu về việc tách chiết các hoạt chất trong sữa biển. Cho tới nay, đáng chú ý nhất phải kể đến đề tài “Nghiên cứu công nghệ ứng dụng enzyme trong sản xuất collagen từ nguồn lợi sữa biển Việt Nam” thuộc Đề án phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học lĩnh vực công nghiệp chế biến đến năm 2020 do Bộ Công Thương quản lý và Viện Tài nguyên và Môi trường biển là cơ quan chủ trì đề tài. Trong đó, đề tài đã tiến hành nghiên cứu và xây dựng được quy trình công nghệ xử lý nguyên liệu và tách chiết collagen từ sữa và đánh giá được hiệu suất tách chiết từ các công nghệ khác nhau [7]. Mặc dù vậy, tối ưu hóa quy trình công nghệ sử dụng enzyme trong tách chiết để đạt hiệu quả cao nhất vẫn hết sức cần thiết. Mặt khác, để tăng khả năng ứng dụng của sản phẩm collagen vào đời sống thì việc nghiên cứu tìm ra phương thức tạo sản phẩm collagen có đặc tính ưu việt hơn là hết sức quan trọng, trong đó collagen peptide đã được chứng minh là có đầy đủ các đặc tính như collagen dạng I nhưng lại có thêm nhiều đặc điểm vượt trội so với collagen thông thường. Hơn nữa, việc đánh giá các đặc điểm khác nhau của các sản phẩm collagen được tách chiết cũng rất cần thiết, nhằm cung cấp đầy đủ cơ sở khoa học cho việc phát triển các ứng dụng sau này.

Xuất phát từ những lý do trên, đề tài nghiên cứu của luận văn: “*Nghiên cứu tách chiết collagen từ sữa *Rhopilema hispidum* (Vanhoffen, 1888)*” nhằm thu được collagen từ loài sữa *R. hispidum* và đánh giá được một số đặc điểm của chúng làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu, ứng dụng tiếp theo.

Mục đích nghiên cứu

Ứng dụng enzyme pepsin trong tách chiết collagen, tạo collagen peptide từ sứa *R. hispidum* và đánh giá một số đặc điểm của chúng.

Nội dung nghiên cứu

1. Nghiên cứu ứng dụng enzyme pepsin trong tách chiết collagen từ sứa *R. hispidum*.
2. Nghiên cứu thử nghiệm phân cắt collagen bằng enzyme tạo sản phẩm collagen peptide.
3. Nghiên cứu một số đặc điểm của sản phẩm collagen, collagen peptide.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Trữ lượng và khả năng khai thác sứa biển ở Việt Nam

1.1.1. Trữ lượng sứa biển ở Việt Nam

Theo Nguyễn Dương Thao và cộng sự (2011) [2], trữ lượng nguồn lợi sứa kinh tế ở các vùng ven biển Việt Nam được tổng hợp trên Bảng 1.1. Diện tích vùng ven biển Việt Nam được tính toán theo hệ tọa độ WGS 84 với diện tích vùng biển điều tra là 100.414 km²; trong đó, diện tích vùng ven biển phía tây Vịnh Bắc Bộ là 25.920 km², vùng ven biển Trung Bộ là 8.213km², vùng ven biển Đông Nam Bộ là 43.360 km² và vùng ven biển Tây Nam Bộ là 22.921 km².

Bằng phương pháp Pennington (1983), tổng trữ lượng nguồn lợi sứa kinh tế ở cả 4 vùng ven biển Việt Nam được ước tính trung bình khoảng 1.048.040 tấn. Trữ lượng ở vùng ven biển phía tây Vịnh Bắc Bộ ước tính khoảng 926.250 tấn chiếm tới 88% tổng trữ lượng, trong đó sứa trắng là 919.510 tấn và sứa đỏ là 6.740 tấn. Trữ lượng ở vùng ven biển Trung Bộ ước có khoảng 45.750 tấn chiếm 4% tổng trữ lượng, gồm sứa trắng là 36.670 tấn và sứa rô là 9.080 tấn. Trữ lượng ở vùng ven biển Đông Nam Bộ ước tính khoảng 28.180 tấn chiếm 3% tổng trữ lượng, gồm sứa trắng 18.030 tấn và sứa *L. smithii* 10.150 tấn. Trữ lượng ở vùng ven biển Tây Nam Bộ ước khoảng 47.860 tấn chiếm 5% tổng trữ lượng, trong đó sứa trắng 12.670 tấn và sứa *L. smithii* 35.190 tấn (Bảng 1.1).

Trong nhóm sứa kinh tế, sứa trắng chiếm phần chủ yếu với trữ lượng đạt tới 986.880 tấn, tiếp đến là sứa *L. smithii* khoảng 45.330 tấn, sứa rô khoảng 9.080 tấn và cuối cùng là sứa đỏ đạt khoảng 6.740 tấn. Trữ lượng nguồn lợi sứa kinh tế ở vùng ven biển Việt Nam có sự biến động lớn trong thời gian điều tra (từ đầu năm 2009 tới hết năm 2010), trong đó năm 2009 ước có khoảng 1.307.810 tấn. Năm 2010 trữ lượng sứa chỉ ước có khoảng 60% so với năm 2009 ước khoảng 788.270 tấn sứa (Bảng 1.1).

Bảng 1.1. Trữ lượng nguồn lợi sứa kinh tế ước tính ở các vùng ven biển Việt Nam [2]

Vùng ven biển	Diện tích (km ²)	Thời gian	Trữ lượng nguồn lợi theo loài (tấn)				Tổng trữ lượng (tấn)
			Sứa trắng <i>R.hispidum</i>	Sứa đỏ* <i>R.esculentum</i>	Sứa rô <i>C.mastigophora</i>	Sứa <i>L.smithii</i>	
Phía tây Vịnh Bắc Bộ	25.920	4-5/2009	1.240.505	6.551	-	-	1.247.056
		3-4/2010	598.506	6.938	-	-	605.444
		Trung bình	919.506	6.744	-	-	926.250
Trung Bộ	8.213	5-6/2009	32.786	-	10.614	-	43.400
		4-5/2010	40.558	-	7.547	-	48.105
		Trung bình	36.672	-	9.081	-	45.753
Đông Nam Bộ	43.360	9-10/2009	-	-	-	11.238	11.238
		10-11/2010	36.063	-	-	9.057	45.120
		Trung bình	18.032	-	-	10.147	28.179
Tây Nam Bộ	22.921	10-11/2009	6.114	-	-	-	6.114
		4-5/2011	19.228	-	-	70.369	89.597
		Trung bình	12.671	-	-	35.185	47.856
Toàn vùng	100.414	Năm 2009	1.279.405	6.551	10.614	11.238	1.307.808
		Năm 2010**	694.355	6.938	7.547	79.426	788.266
		Trung bình	986.880	6.744	9.081	45.332	1.048.037

Ghi chú: (*) giá trị tính ở vùng ven biển Quảng Ninh - Thanh Hóa; (**) điều tra ở vùng biển Tây Nam Bộ năm 2009 & 2011.

1.1.2. Khả năng khai thác sứa biển ở Việt Nam

Cũng như nguồn lợi hải sản khác, để đảm bảo sứa biển không bị đánh bắt quá mức, cần phải bảo vệ một phần của đơn vị trữ lượng để tái tạo nguồn lợi. Do sứa là nhóm thủy sinh vật có sức sinh sản lớn với cả 2 kiểu sinh sản vô tính và hữu tính, vòng đời ngắn, thời gian sinh trưởng nhanh nên khả năng khai thác bền vững nguồn lợi sứa sẽ lớn hơn cá, ước tính bằng khoảng 70% trữ lượng. Khả năng khai thác nguồn lợi sứa kinh tế ở các vùng ven biển Việt Nam ước tính từ các chuyên điều tra được trình bày trong Bảng 1.2.

Bảng 1.2. Khả năng khai thác nguồn lợi sứa kinh tế ước tính ở vùng ven biển Việt Nam [2]

Vùng biển	Thời gian	Khả năng khai thác theo loài (tấn)				Khả năng khai thác (tấn)
		Sứa trắng <i>R. hispidum</i>	Sứa đỏ <i>R. esculentum</i>	Sứa rô <i>C. mastigophora</i>	Sứa <i>L. smithii</i>	
Phía tây Vịnh Bắc Bộ	4-5/2009	868.354	4.586	-	-	872.939
	3-4/2010	418.954	4.857	-	-	423.811
	Trung bình	643.654	4.721	-	-	648.375
Trung Bộ	5-6/2009	22.950	-	7.430	-	30.380
	4-5/2010	28.391	-	5.283	-	33.674
	Trung bình	25.670	-	6.357	-	32.027
Đông Nam Bộ	9-10/2009	-	-	-	7.867	7.867
	10-11/2010	25.244	-	-	6.340	31.584
	Trung bình	12.622	-	-	7.103	19.725
Tây Nam Bộ	9-10/2009	4.280	-	-	-	4.280
	4-5/2011	13.460	-	-	49.258	62.718
	Trung bình	8.870	-	-	24.629	33.499
Toàn vùng biển	Năm 2009	895.584	4.586	7.430	7.867	915.466
	Năm 2010*	486.049	4.857	5.283	55.598	551.786
	Trung bình	690.816	4.721	6.357	31.732	733.626

Khả năng khai thác nguồn lợi sứa ở vùng ven biển Việt Nam giai đoạn 2009 - 2011 ước tính khoảng 733.600 tấn. Trong đó, vùng ven biển phía tây Vịnh Bắc Bộ là ngư trường trọng điểm có khả năng khai thác nguồn lợi sứa lên đến 648.400 tấn, tiếp đến là vùng ven biển Tây Nam Bộ 33.500 tấn, vùng ven biển Trung Bộ 32.000 tấn; khả năng khai thác thấp nhất là vùng ven biển Đông Nam Bộ ước khoảng 19.700 tấn (Bảng 1.2).

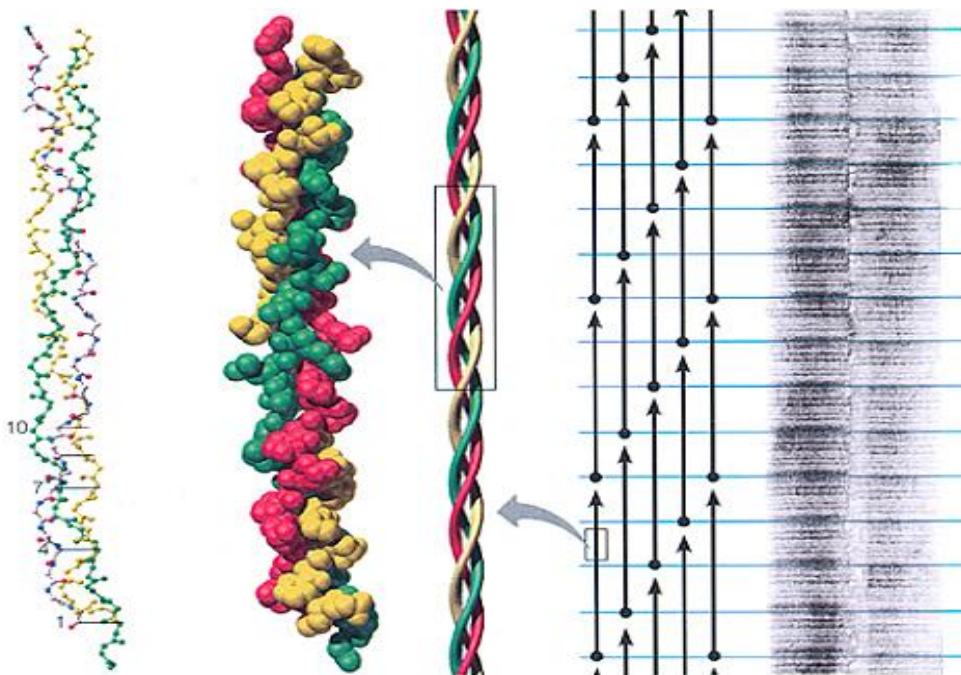
Kết quả thống kê trong Bảng 1.2 cũng cho thấy: nguồn lợi sứa kinh tế ở vùng ven biển Việt Nam với thành phần chủ yếu là sứa trắng cho khả năng khai thác ước tính khoảng 690.800 tấn, sứa *L. smithii* 31.700 tấn, sứa rô 6.400 tấn, sứa đỏ là 4.700 tấn. Đặc biệt, vùng ven biển phía tây Vịnh Bắc Bộ hàng năm có khả năng khai thác đến 648.400 tấn sứa kinh tế, trong đó sứa trắng 643.700 tấn và sứa đỏ 4.700 tấn. Loài sứa dù trắng *R. hispidum* là loài có trữ lượng và khả năng khai thác chính với hơn 643 nghìn tấn/năm, trong đó phân bố chủ yếu ở vùng Quảng Ninh, Hải Phòng cho tới Thanh Hóa.

1.1. Collagen và collagen từ sữa biển

1.1.1. Cấu tạo và cấu trúc collagen

Collagen là một loại protein cấu trúc phổ biến, có trong tất cả các mô, đặc biệt phong phú ở động vật đa bào, chiếm đến 25- 30% tổng số protein trong cơ thể động vật [8] [9]. Phần lớn collagen ngoại bào có cấu trúc dạng sợi, là thành phần cấu trúc chính của chất nền ngoại bào của tất cả các mô liên kết (từ da, xương, dây chằng, gân và sụn) cũng như mô đệm của tất cả các cơ quan nhu mô [10]. Protein xơ này làm tăng độ bền cơ học và chức năng sinh lý của tế bào và các cơ [11] [12].

Phần lớn collagen được tìm thấy có cấu trúc dạng sợi dài khoảng 280 nm, với khối lượng phân tử khoảng 360.000 Da [13]. Phân tử collagen có cấu trúc xoắn ốc gồm ba chuỗi polypeptide bện vào nhau thành một chuỗi siêu xoắn (mỗi mạch đơn có cấu trúc xoắn, chiều cao của mỗi góc xoắn trên trục siêu xoắn này là $2,9\text{Å}$, một vòng xoắn là 3,3 góc amino acid). Các chuỗi polypeptide được cấu thành từ sự lặp đi lặp lại trình tự của ba axit amin, glycine-XY, trong đó X và Y chủ yếu là proline và hydroxyproline. Phân tử collagen thường chứa khoảng 35% glycine, 11% alanin, và 21% prolin và hydroxyproline [10].



Hình 1.1. Mô hình cấu trúc của sợi collagen

(Nguồn: http://web.mit.edu/3.082/www/team1_f02/collagen.htm)

1.1.2. Phân loại collagen

Cho đến nay, đã có 29 loại collagen được xác định, trong đó trên 90% collagen trong cơ thể là collagen dạng I, II, III và IV [14] [10].

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)
- Collagen IV: thành phần chính cấu tạo màng tế bào

Ngoài ra, còn có các dạng collagen khác như:

- ✓ 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

1.1.3. Collagen từ sữa biển

Trong các sinh vật biển thì sữa là một đối tượng hứa hẹn có thể trở thành nguồn nguyên liệu tiềm năng cung cấp cho sản xuất collagen. Hàm lượng collagen trong protein tổng số từ sữa rất cao, chiếm tới hơn 60% lượng protein trong cơ thể [15]. Do cấu trúc về thành phần hóa học của cơ thể sữa đơn giản, chủ yếu là nước và protein, mà phần phần lớn protein là collagen (Bảng 1.3) nên phương pháp tách chiết collagen từ sữa biển thường đơn giản hơn, nhanh hơn và đặc biệt là hiệu suất tách chiết luôn đạt tỉ lệ rất cao.

Bảng 1.3. Hiệu suất tách chiết collagen từ các nguyên liệu khác nhau

Loại collagen	Nguồn nguyên liệu	Loại mô nghiên cứu	Hiệu suất	Tài liệu tham khảo
Loại I	Cá Hồng	Xương	ASC: 1,6%	[11]
	Cá trê Mỹ		ASC: 16,8%; PSC: 28%	[16]
	Cá chìa vôi		ASC: 5,5%; PSC: 33,2%	[17]
	Cá mặt quỷ		PSC: 54,3%	[6]
	Cá nóc		ASC: 10,7%; PSC: 44,7%	[18]
	Cá mối		ASC: 0,8%	[19]
	Cá sông Nhật Bản	ASC: 1,5%		
	Cá đuối	ASC: 0,4%		
	Cá chuồn	ASC: 0,7%		
	Cá tráp vàng	ASC: 0,9%	Vây	
	Cá ngừ mắt to	Xương		-
	Mực lá	Da	ASC: 0,6%; PSC: 16,2%	[21]
	Sứa	Dù	46.4%	[22]
Loại 2	Cá mập tre vằn	Sụn	ASC: 1,3%; PSC: 9,59%	[11]
	Cá mập mắt trắng	Sụn	ASC: 1%; PSC: 10,3%	
	Sứa ma	Dù	PSC: 9%– 19%	[23]
Loại 3	Bọt biển		30%	[24] [25] [26]

Ghi chú: PSC - Pepsin Soluble Collagen (collagen hòa tan trong pepsin); ASC - Acid Soluble Collagen (collagen hòa tan trong axit)

So với collagen từ động vật trên cạn và một số loài động vật biển khác, collagen từ sữa đã được ghi nhận là có các đặc điểm khác biệt về thành phần axit amin, tạo ra các tính chất khác biệt của chúng. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng collagen từ sữa có khả năng tương thích sinh học tốt hơn, khả năng phân hủy sinh học cao hơn, có tính kháng nguyên thấp hơn và có tính gắn kết tế bào như protein tự nhiên, có thể bị phân hủy thành các hợp chất có khả năng chịu đựng sinh lý trong cơ thể [27] [28].

1.1.4. Ứng dụng của collagen

Ngày nay collagen được ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực khác nhau, đặc biệt là lĩnh vực y học, dược học, mỹ phẩm và một số ngành công nghiệp khác.

✚ Ứng dụng collagen trong lĩnh vực y học và dược phẩm

Collagen và các dẫn xuất của chúng từ sữa đóng nhiều vai trò có lợi cho sức khỏe. Gần đây, một số công trình nghiên cứu đã khẳng định rằng, dẫn xuất của collagen từ sữa có hiệu quả trong việc ngăn ngừa và chữa trị viêm khớp dạng thấp [29], viêm xương khớp và loãng xương [30], cao huyết áp [31], và sữa cũng đã được ghi nhận và chứng minh là có tác dụng chống lão hóa.

Thuốc từ sữa thường được dùng để điều trị các bệnh như viêm khớp, tăng huyết áp, phế quản, đau lưng, loét dạ dày, hen suyễn, viêm mũi, bỏng và mệt mỏi [32] [33] [34] hoặc giúp ngăn ngừa sự biến đổi tế bào phôi gốc phát triển thành tế bào ung thư [35].

Nhiều nghiên cứu đã thử nghiệm sử dụng collagen từ biển làm vật liệu sinh học. Collagen là vật liệu sinh học tự nhiên có triển vọng nhất trong kỹ thuật mô, vì có nguồn cung dồi dào, khả năng tương thích sinh học cao, có thể phân hủy sinh học, giống với các thành phần có trong hệ thống ngoại bào và hỗ trợ các mô liên kết bao gồm da, gân, xương, sụn, mạch máu và dây chằng [36].

Collagen biển cũng được sử dụng rộng rãi trong nha khoa như các loại màng, vật liệu ghép xương, chất mang vận chuyển thuốc và cầm máu [37]. Collagen được sử dụng làm chất mang thuốc tại chỗ, thường là ở dạng màng. Các màng này được sử dụng trong điều trị nha chu và cấy ghép để tái tạo mô mềm và ức chế sự mọc lại nhanh chóng của da khi cấy ghép xương. Màng được sử dụng nhiều nhất được cấu tạo bởi hai thành phần: chlorhexidine và collagen

[38]. Một sản phẩm khác được sử dụng để làm chất mang thuốc tại chỗ bao gồm hệ sợi tetracycline-collagen. Cả hai hệ thống đều cho phép khuếch tán thuốc khi collagen trải qua quá trình bị hấp thu, giải phóng thuốc khỏi chất nền một cách có kiểm soát [39].

✚ Ứng dụng collagen trong thực phẩm

Dựa vào tính chất tan chảy ở nhiệt độ cao và đông đặc ở nhiệt độ thấp người ta ứng dụng collagen trong thực phẩm đông lạnh. Collagen dạng thủy phân (gelatin) đóng vai trò là một chất keo bảo vệ ngăn chặn sự kết tinh của đường cũng như phụ gia tạo cấu trúc trong công nghiệp sữa và các sản phẩm từ sữa. Ngoài ra, collagen cũng được dùng phổ biến trong quá trình làm sạch rượu vang, bia, nước trái cây do nó có khả năng làm keo tụ các chất vẩn đục trong dung dịch, đồng thời rất an toàn.... [40].

✚ Ứng dụng collagen trong mỹ phẩm

Các nghiên cứu cho thấy, collagen có tác dụng chống lão hóa, ngăn ngừa và cải thiện nếp nhăn. Chúng tạo ra một hệ thống nâng đỡ, hỗ trợ các đặc tính cơ học của da như sức căng, độ đàn hồi, đồng thời giúp duy trì độ ẩm tối ưu cho da, đảm bảo sắc tố da, làm cho da mịn màng, tươi tắn và trẻ trung [41]. Do đó, collagen đã được bổ sung vào các loại mỹ phẩm. Các sản phẩm mỹ phẩm, dựa trên collagen chiết xuất từ biển, đã cho thấy tác dụng tương đương trên da với collagen động vật về độ pH, độ ẩm và sự tiết bã nhờn.

Collagen cũng có tác dụng tốt trong quá trình phục hồi và tái tạo da. Trường hợp da bị tổn thương hay trong giai đoạn tái tạo sau khi điều trị các vấn đề về da như nám, mụn, sẹo, tiêu da thừa sau khi giảm béo, có thể điều trị collagen phục hồi.

✚ Ứng dụng collagen trong nhiếp ảnh

Collagen (gelatin) là thành phần thiết yếu cho quá trình đông tụ và phát triển bạc halogen - một chất nhũ tương ảnh, có tác dụng làm chất ổn định giữa thành phần gắn kết và hệ nhũ tương thuốc nhuộm. Đây cũng là tác nhân gắn kết trong quá trình sản xuất trong các giấy in phun hiện nay [42].

1.2. Nhu cầu collagen và nguồn nguyên liệu sản xuất collagen

Collagen là một thành phần quan trọng trong cơ thể con người nên nhu cầu sử dụng collagen trong đời sống rất lớn và đa dạng. Ước tính thị trường

collagen toàn cầu năm 2016 đạt mức 3,71 tỷ USD và dự kiến sẽ có sự tăng trưởng mạnh trong những năm tiếp theo, có thể đạt 6,63 tỷ USD vào năm 2025 [3]. Theo Parenteau-Bareil và cộng sự [4], 2010 cũng nhận định rằng, thị trường nguyên liệu sinh học collagen toàn cầu dự báo sẽ có khả năng đạt được tốc độ tăng trưởng kép 10,4% hàng năm trong khoảng thời gian từ năm 2017 đến năm 2025 [4]. Riêng liên quan tới các sản phẩm từ collagen làm mỹ phẩm dưỡng da cũng đã đạt tới 3 tỷ USD vào năm 2012 [5]. Do vậy, việc sản xuất collagen không chỉ có ý nghĩa đáp ứng nhu cầu sử dụng của xã hội mà còn có thể mang lại lợi ích kinh tế là rất lớn [43].

Các gia súc như bò và lợn (đặc biệt là da và xương của chúng) là những nguồn nguyên liệu truyền thống dùng trong công nghiệp sản xuất collagen [44]. Tuy nhiên, sử dụng collagen từ lợn và bò tạo ra nguy cơ lây truyền các bệnh như bò điên (bovine spongiform encephalopathy - BSE), bệnh nhiễm thể đạm độc (transmissible spongiform encephalopathy - TSE) và bệnh lở mồm long móng (foot and mouth disease - FMD) [45] [46]. Ngoài ra, người Hồi giáo, người Do Thái và người Hindu không sử dụng các sản phẩm từ lợn hoặc trâu bò vì lý do tôn giáo. Trong khi đó người Hồi giáo, người Hindu và người Do Thái chiếm tới 38,4% dân số toàn cầu [47]. Bên cạnh đó, hiện nay giá nguyên liệu thô là xương và da chủ yếu từ lợn và trâu bò ngày càng tăng lên do không đủ nguồn cung cấp đang là một mối đe dọa lớn đối với nguồn cung cấp collagen ở trên quy mô toàn cầu [5]. Do vậy, việc tìm kiếm các nguồn nguyên liệu mới có nhiều ưu việt để cung cấp cho quá trình sản xuất collagen ứng dụng trong các lĩnh vực của đời sống con người là hết sức cấp thiết. Collagen từ động vật biển là nguồn nguyên liệu đầy hứa hẹn vì nó có tính an toàn cao, ít nguy cơ truyền bệnh, không có rào cản về tôn giáo trong việc sử dụng, nguồn nguyên liệu phong phú và hiệu suất chiết xuất lại cao hơn so với các nguồn nguyên liệu khác [6]. Do đó, collagen đã được nghiên cứu chiết xuất từ nhiều loài sinh vật biển trong những năm qua, bao gồm cá [45], cá hồng đỏ [44], cá bơn [48], cá nóc [18], cá mập [11], cá tuyết Baltic [49], cá chép [16], sứa [22] [15].

1.3. Collagen peptide

Collagen peptide (collagen thủy phân) là dạng collagen thu được sau khi phân tử collagen tự nhiên bị biến tính, cấu trúc chuỗi xoắn ba chuyển sang dạng cuộn ngẫu nhiên do sự phân ly của các liên kết hydro khi collagen bị thủy phân.

Quá trình này có thể phá vỡ các liên kết trong chuỗi polypeptide để thu được một lượng lớn các collagen peptide có trọng lượng phân tử rất thấp (3-6KDa) [50].

Collagen peptide ngoài việc có đầy đủ các tính chất của một collagen dạng I thì nó còn có thêm nhiều đặc điểm vượt trội so với collagen thông thường, như độ tan trong nước đạt khoảng 7,5%, tăng gấp 7.500 lần so với collagen thông thường (0,001%); do nó kích thước nhỏ nên làm gia tăng bề mặt tiếp xúc, tăng tốc độ thẩm thấu và hấp thu vào các mô (đạt tới 95%) [50].

Sự thủy phân bằng enzyme không chỉ ảnh hưởng đến kích thước của các peptide mà còn ảnh hưởng đến các tính chất lý hóa và sinh học. Các đặc tính này chủ yếu liên quan đến giá trị khối lượng phân tử. Collagen peptide trọng lượng phân tử thấp hoạt động như một chất cho điện tử để tạo ra các sản phẩm ổn định hơn phản ứng với các gốc tự do. Đó là những yếu tố làm tăng các đặc tính chức năng như khả năng chống oxy hóa, hoạt tính kháng khuẩn, sinh khả dụng cao hơn [50].

Khối lượng phân tử và đặc tính chức năng của collagen peptide phụ thuộc vào nguồn nguyên liệu, phương pháp và loại enzyme được sử dụng trong quá trình chiết xuất. Những đặc tính này định hướng cho các ứng dụng khác nhau của collagen peptide trong các ngành công nghiệp mỹ phẩm, dược phẩm, vật liệu sinh học, thực phẩm và dinh dưỡng [50].

Nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc khai thác collagen peptide từ nguồn biển như cá và các động vật không xương sống khác như sứa và bọt biển. Collagen peptide thu được từ các thử nghiệm có kích thước và đặc tính khác nhau như từ cá Mập (*Prionace glauca*) có trọng lượng phân tử thấp hơn 20 KDa [51]; từ trực khuẩn *Clostridium* kết hợp sử dụng collagenase cho sản phẩm có trọng lượng phân tử khoảng 5 KDa [52]; từ cá Tuyết (*Gadus morhua*) có trọng lượng phân tử thấp hơn (3-5 KDa) [53]; từ cá rô phi Vàng (*Oreochromis niloticus*) đã được sử dụng để sản xuất collagen peptide với chất lượng cao [54]. Đặc biệt, bằng cách thay đổi các thông số chiết xuất từ các nhiệt độ khác nhau (150-300°C), áp suất (50-100 bar) và thời gian phản ứng (5 phút), có thể thu được collagen peptide từ da cá ngừ có trọng lượng phân tử thấp (<600 Da) và có hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn tốt [55].

1.4. Công nghệ tách chiết collagen

Collagen về cơ bản có thể được tách chiết với phương pháp thủy phân bằng hóa chất vô cơ hoặc enzyme [56]. Trong đó, phương pháp thủy phân hóa học được sử dụng phổ biến hơn trong công nghiệp. Tuy nhiên, các quy trình tách chiết bằng thủy phân sinh học với việc sử dụng các enzyme mang lại nhiều hứa hẹn hơn với các sản phẩm có giá trị dinh dưỡng và chức năng đều tốt hơn [57]. Hơn nữa, các quy trình sử dụng enzyme tạo ra ít chất thải hơn và giảm thời gian tách chiết. Tuy nhiên các quy trình sinh học thường tốn nhiều chi phí hơn, do đó nhiều nghiên cứu đang tập trung vào việc thử nghiệm các phương pháp để nâng cao hiệu suất và giảm chi phí. Để tách chiết collagen, cần phải loại bỏ các liên kết hóa trị trong và giữa các phân tử liên kết chéo, chủ yếu liên quan đến lysine và hydroxy-lysine, liên kết este và các liên kết khác với saccharite [58]. Tùy thuộc vào loại nguyên liệu sử dụng mà việc xử lý, công nghệ áp dụng và các thông số kỹ thuật của các quy trình tách chiết có sự khác nhau. Tuy nhiên, quy trình tách chiết collagen từ các loại nguyên liệu đều có chung 3 giai đoạn chính, bao gồm: xử lý nguyên liệu, chiết xuất và thu hồi. Trong đó, giai đoạn xử lý nguyên liệu được sử dụng để loại bỏ các tạp chất phi collagen; giai đoạn chiết xuất collagen là quan trọng nhất với công nghệ phổ biến là dựa trên độ hòa tan của collagen trong dung dịch muối trung tính, dung dịch axit hoặc các dung dịch axit có bổ sung enzyme; giai đoạn cuối cùng là tinh sạch và thu nhận sản phẩm. Cụ thể các bước như sau:

1.4.1. Giai đoạn xử lý nguyên liệu

Trong bước xử lý nguyên liệu bao gồm làm sạch, tách các bộ phận của động vật và giảm kích thước nguyên liệu bằng cách cắt hoặc băm nhỏ. Cụ thể, cá được chia thành da, vây, vây và xương, vì thành phần collagen của chúng khác nhau. Trong trường hợp nguyên liệu là sứa, người ta thường tách thành chân sứa và dù, và sau đó dù sứa lại được chia thành phần dù trên (exumbrella), dù dưới (subumbrella) và phần chất keo - óc sứa (mesogloea) [23].

Việc giảm kích thước của các mẫu này là điều cần thiết để tạo điều kiện thuận lợi cho các công đoạn (tiền) xử lý hóa học tiếp theo nhằm loại bỏ các tạp chất phi collagen như chất béo, các sắc tố, protein khác. Phương pháp phổ biến để xử lý là dùng natri hydroxit (NaOH) không gây ra sự thay đổi cấu trúc đối với chuỗi collagen, alcohol (cụ thể là butyl-alcohol hoặc ethanol) và oxy

peroxide trong quá trình loại bỏ protein, chất béo và sắc tố, tương ứng [44] [15] [18] [6] [59]. Ngoài ra, việc sử dụng natri clorua (NaCl) thay thế cho NaOH cũng đã được đề xuất trong một số nghiên cứu [49].

Hơn nữa, để cải thiện quá trình chiết xuất collagen từ xương, sụn và vảy cá, EDTA cũng được sử dụng cho mục đích khử khoáng hay muối [16] [60] [11]. Ngoài ra, cũng có thể sử dụng HCl để khử khoáng [61].

1.4.2. Giai đoạn chiết xuất

Đối với giai đoạn chiết xuất, các nghiên cứu đã chỉ ra rằng khả năng hòa tan của collagen trong nước lạnh kém vì sự hiện diện của các liên kết chéo mạnh trong cấu trúc chuỗi xoắn ba của nó. Có hai phương pháp khác nhau thường được sử dụng: chiết xuất collagen hòa tan trong axit và chiết xuất collagen hòa tan trong enzyme. Sử dụng hai phương pháp này, sản lượng, thành phần hóa học và đặc tính của collagen chiết xuất sẽ khác nhau. Toàn bộ giai đoạn chiết xuất thường được thực hiện ở 4°C.

Khi chiết xuất collagen chỉ được thực hiện bằng cách sử dụng axit, sản phẩm được gọi là collagen hòa tan trong axit (ASC). Để chiết xuất collagen từ các mô động vật biển, axit acetic là axit loãng được sử dụng nhiều nhất (nhìn chung, ở nồng độ cuối cùng thường là 0,5 M), ngoài ra axit citric và axit lactic cũng được sử dụng. Các quy trình tách chiết thường được điều chỉnh từ các phương pháp đã được công bố trong các nghiên cứu [11] và [15].

Khoảng 95% cơ thể động vật không xương sống ở biển như sữa là nước, điều này ảnh hưởng đến khả năng hòa tan collagen trong axit axetic. Do đó, đông nhất hoặc đông khô nguyên liệu sữa là cần thiết để cải thiện khả năng hòa tan collagen trong axit và làm tăng hiệu suất chiết xuất.

Gần đây, Yusoff đã đề xuất một phương pháp mới để chiết xuất collagen từ động vật biển, trong đó xử lý axit được kết hợp với một chuỗi xử lý vật lý và cơ học, bao gồm điều chỉnh pH, đông nhất, trộn, cũng như dùng sóng siêu âm [62]. Bằng cách tăng cường can thiệp vật lý vào sữa, năng suất thu hồi collagen cũng tăng lên đáng kể so với quy trình thông thường [5].

Khi enzyme pepsin được thêm vào trong quá trình chiết xuất, collagen được chiết xuất được gọi là collagen hòa tan trong pepsin (PSC). Pepsin là một endoproteinase aspartic được phân lập từ niêm mạc dạ dày lợn. Nó chủ yếu được sử dụng để thủy phân protein và peptide không đặc hiệu trong môi trường

axit. Phương pháp xử lý này rất hữu ích, vì trong điều kiện tối ưu, protease phân cắt các vùng liên kết chéo telopeptide mà không phá vỡ tính toàn vẹn của chuỗi xoắn ba, và do đó thủy phân một số protein không liên kết và tăng độ tinh khiết của collagen [59]. Do đó, trong hầu hết các trường hợp, các enzyme được sử dụng để thu được các sản phẩm protein cụ thể sẽ làm tăng năng suất, giảm tạp chất cũng như giảm tính kháng nguyên do telopeptide gây ra [29] [25] [63]. Tuy nhiên, khi lượng enzyme pepsin cao được sử dụng trong thời gian dài, năng suất thu hồi PSC có thể giảm do phân tử collagen có thể bị phân cắt, làm giảm tính toàn vẹn của chuỗi xoắn ba [44].

Sau khi thu được dịch chiết collagen, nhiều nghiên cứu đã thử nghiệm sử dụng kết hợp thêm các enzyme protease khác nhằm phân cắt mạch collagen để tạo collagen peptide [64] [65]. Phương pháp này được bổ sung sau bước chiết xuất thông thường, giúp thu hồi được sản phẩm collagen có kích thước nhỏ hơn nhiều. Quy trình thủy phân của Huo & Zhao (2009) có thể thu các phân tử collagen trọng lượng 300-1500Da, phần lớn dưới 1200Da [64].

1.4.3. Giai đoạn thu hồi

Trong bước thu hồi thì collagen được kết tủa bằng cách thêm NaCl đến nồng độ cuối cùng 2,3-2,6 M. Kết tủa thu được bằng cách ly tâm, hòa tan trong axit axetic 0,5 M, thẩm tách và đông khô [13].

Từ sữa, collagen thường được chiết xuất bằng cách hòa tan trong dung dịch axit axetic 0,5 M (thường là trong ba ngày), sau đó tách muối ra bằng cách thẩm tách với dung dịch Na_2HPO_4 . Collagen kết tủa được tách bằng cách ly tâm, hòa tan trong axit axetic, và được tinh sạch bằng cách tái kết tủa khi thêm NaCl vào để đạt nồng độ 0,9 M. ASC cũng có thể được chiết bằng enzyme pepsin để thu được atelo-collagen (atelocollagen: collagen đã được loại telopeptide kháng nguyên) [8] [46].

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu, hóa chất và thiết bị nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu là loài sứa trắng (*R. hispidum* Vanhöffen, 1888) - Hình 2.1, thuộc:

Giới: Animalia

Ngành: Cnidaria

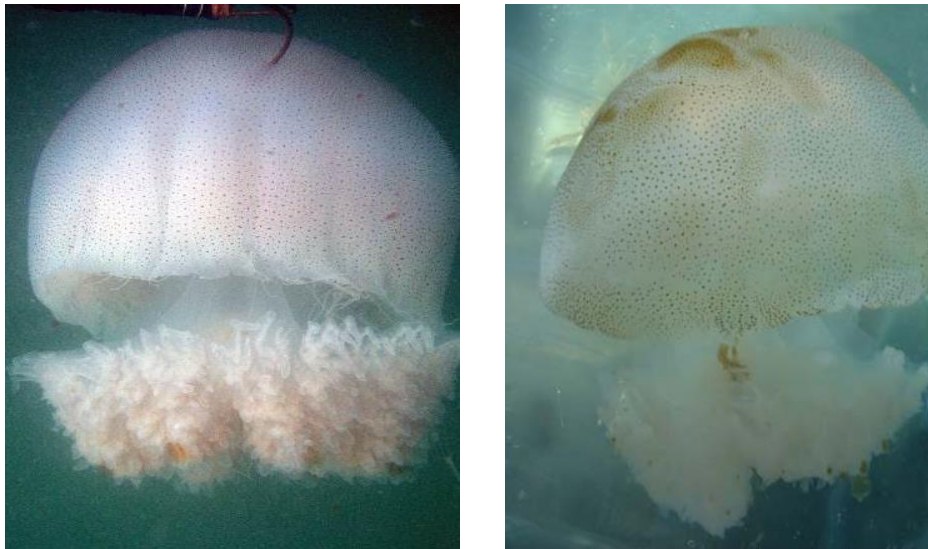
Lớp: Scyphozoa

Bộ: Rhizostomeae

Họ: Rhizostomatidae

Giống: *Rhopilema*

Loài: *R. hispidum* Vanhöffen, 1888.



Hình 2.1. Hình ảnh loài sứa *R. hispidum* (Vanhöffen, 1888)

- Phạm vi nghiên cứu: Quy trình ứng dụng enzyme pepsin trong tách chiết collagen, thử nghiệm phân cắt tạo collagen peptide và đặc điểm của sản phẩm thu được từ sứa *R. hispidum* trong điều kiện phòng thí nghiệm.

2.1.2. Nguyên vật liệu và hóa chất nghiên cứu

- Nguyên liệu: sứa tươi của loài *R. hispidum*. Mẫu sứa tươi được thu tại vùng ven biển Hải Phòng, bảo quản lạnh bằng hộp thu mẫu chuyên dụng ở nhiệt độ ~4°C. Mẫu được vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm và được TS Trần Mạnh

Hà, Viện Tài Nguyên và Môi trường biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam phân loại xác định loài dựa trên đặc điểm hình thái. Mẫu sữa sau đó được sử dụng làm nguyên liệu cho các thử nghiệm.

- Enzyme pepsin (E.C. 3.4.23.1.) được mua tại công ty Serva, Đức, hoạt lực $\geq 2500\text{IU}$, khoảng hoạt động hiệu quả từ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ và pH từ 1.5-2.

- Enzyme alkaline protease (EC 3.4.21.62) có nguồn gốc Trung Quốc, hoạt tính 250 IU/mg , khoảng hoạt động hiệu quả từ 20 đến 65°C và pH từ 9.0 ~ 12.0.

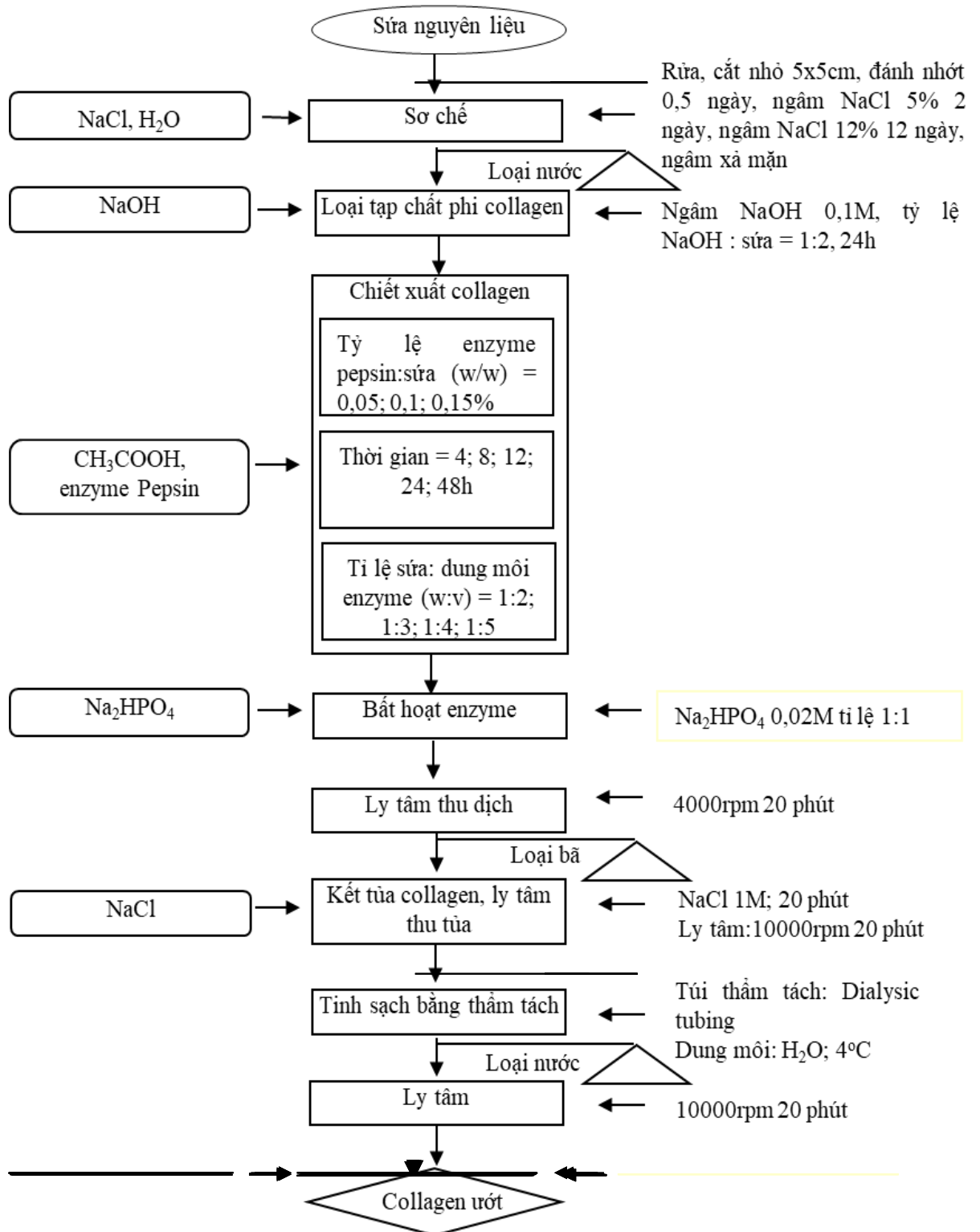
- Các hóa chất và vật tư khác là các hóa chất chuẩn và vật tư của các hãng Merck (Đức), Nhật, Ấn Độ, Trung Quốc, Hàn Quốc và Việt Nam có độ tinh khiết và chất lượng đảm bảo cho nghiên cứu và thử nghiệm của đề tài.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thử nghiệm

Toàn bộ quy trình thử nghiệm tách chiết collagen từ sữa được thực hiện dựa trên các công bố của [62] [5] [15] [7] và có cải tiến cho phù hợp với điều kiện thí nghiệm. Quy trình gồm nhiều bước theo mô tả trên Hình 2.2 và Hình 2.3.

- ✚ Phương án thí nghiệm ứng dụng enzyme pepsin trong tách collagen từ sữa theo sơ đồ Hình 2.2.



Hình 2.2. Sơ đồ các bước thí nghiệm tách chiết collagen sử dụng enzyme pepsin

Nghiên cứu này tập trung vào các thử nghiệm để xác định điều kiện sử dụng enzyme pepsin cho hiệu suất thu collagen cao nhất. Các nghiệm thức được bố trí cụ thể như sau:

- Thử nghiệm ảnh hưởng của nồng độ enzyme được tiến hành ở các nồng độ 0,05%, 0,1% và 0,15% so với khối lượng sữa, thời gian chiết mẫu 24h.

- Thử nghiệm ảnh hưởng của thời gian ngâm mẫu trong dung dịch enzyme tách chiết được tiến hành ở các thời gian: 4h, 8h, 12h, 24h và 48h, nồng độ enzyme là 0,1% so với khối lượng sữa.

- Thử nghiệm ảnh hưởng của tỷ lệ giữa khối lượng sữa và thể tích dung dịch CH_3COOH hòa tan enzyme pepsin (dung môi enzyme) được tiến hành ở các tỷ lệ (w:v): 1:2; 1:3; 1:4; 1:5, trong 24h và nồng độ enzyme là 0,1% so với khối lượng sữa.

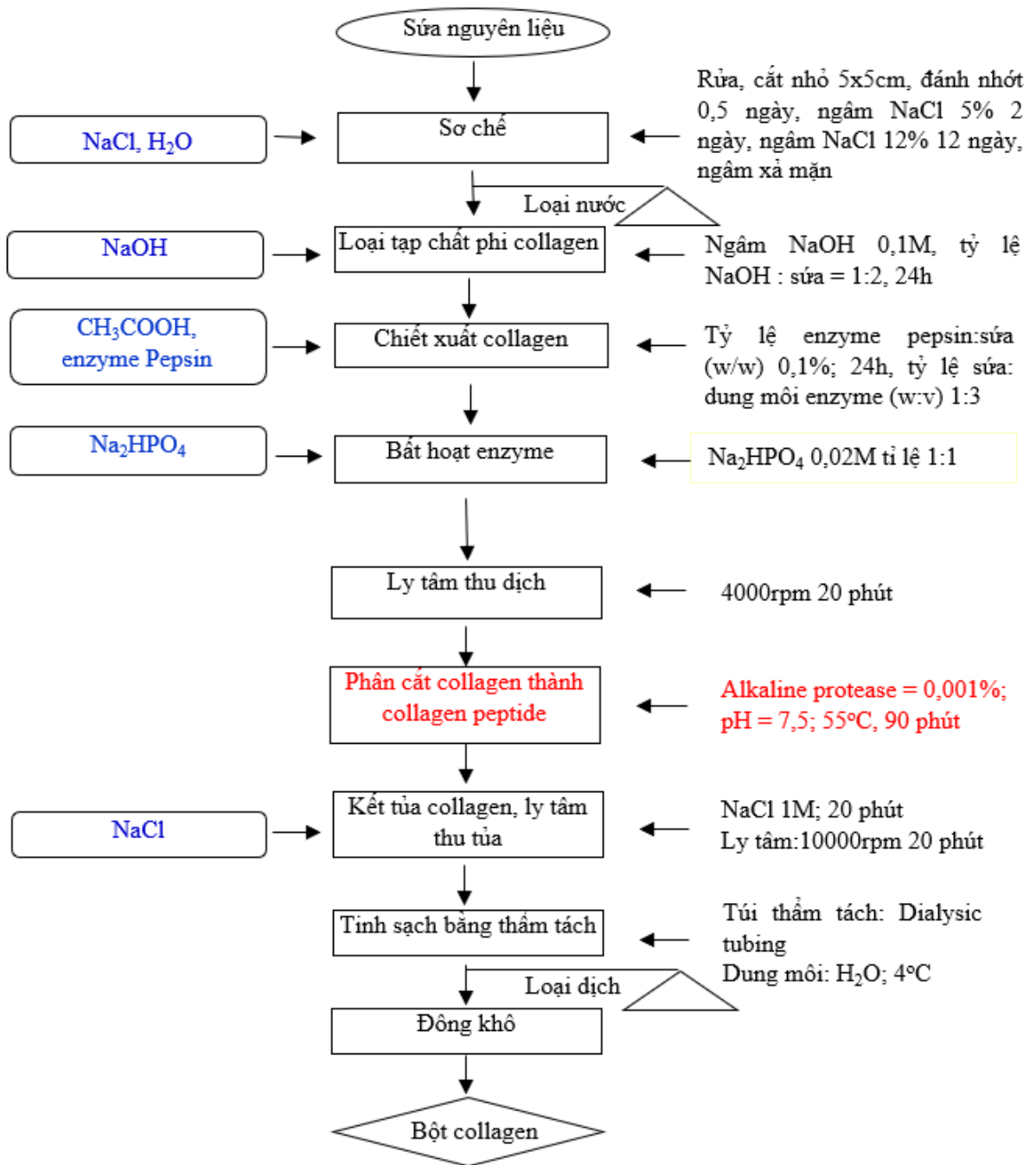
Các thử nghiệm sử dụng enzyme pepsin dựa trên nguyên tắc chung: mỗi thí nghiệm chỉ thay đổi 1 yếu tố và giữ cố định các thông số khác, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hiệu suất thu collagen được tính toán dựa trên hiệu suất thu collagen dạng ướt theo công thức mục 2.2.3.

Quy trình thử nghiệm phân cắt collagen tạo sản phẩm collagen peptide

Trong thử nghiệm tạo collagen peptide, các bước được thực hiện tương tự như quy trình tách chiết collagen thông thường và có bổ sung thêm bước phân cắt collagen theo sơ đồ Hình 2.3.

Thử nghiệm được tiến hành song song giữa quy trình có bổ sung thêm bước phân cắt tạo collagen peptide và quy trình đối chứng không có bước này. Các thử nghiệm được tiến hành với 30g sữa nguyên liệu/thí nghiệm. Enzyme alkaline protease được sử dụng với hàm lượng 0,001% so với khối lượng nguyên liệu sữa ở 55°C trong thời gian 90 phút.

Việc xác định được hiệu suất của quy trình công nghệ có vai trò hết sức quan trọng, là cơ sở để tính toán và lựa chọn công nghệ phù hợp với điều kiện thực tế. Do vậy, hiệu suất tách chiết và hiệu suất thu collagen của hai quy trình được tính toán dựa trên hiệu suất thu collagen dạng khô theo công thức mục 2.2.3.



Hình 2.3. Sơ đồ các bước phân cắt collagen thành collagen peptide bởi enzyme alkaline protease

2.2.2. Các phương pháp phân tích

- ✚ Phương pháp SDS-PAGE xác định thành phần và trọng lượng phân tử collagen theo mô tả của Laemmli (1970) [66].

Thành phần và trọng lượng phân tử collagen được xác định bằng kỹ thuật SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), SDS-PAGE được thực hiện trên máy điện di đứng (omniPAGE WAVE Maxi

System) của hãng Cleaver Scientific với dung dịch đệm 0,1% SDS, 0,025 M Tris HCl và 0,192 glycine.

Dung dịch collagen hòa tan trong Na_2PO_4 0,02 M chứa 1% sodium dodecyl sulphate và 3,5 M urê (pH 7,0). Hỗn hợp này được ly tâm trong thời gian 5 phút với tốc độ 8.500 rpm để loại bỏ các thành phần không hòa tan.

Hỗn hợp dung dịch collagen hòa tan 20 μg protein được trộn với dung dịch đệm (0,25M Tris-HCl, pH 6,8, chứa 4% SDS, 20% glycerol, β -mercaptoethanol, bromophenol blue) với tỷ lệ 1:1 (v/v) và chạy trên gel polyacrylamide với lớp gel gồm 8% và gel phân tách 4%, dòng điện 150V.

Sau khi điện di, gel được nhuộm trong dung dịch 0,05% (w/v) Coomassive blue R-250 trong 15% (v / v) metanol và axit axetic 5% (v/v). Sau đó gel được rửa trong dung dịch metanol 30% (v / v) và axit axetic 10% (v / v) trong khoảng 12 giờ.

Trọng lượng phân tử, thành phần của protein collagen được xác định khi so sánh với thang protein tiêu chuẩn (marker) có kích thước dao động từ 75 kDa đến 250 kDa.

✚ Phương pháp kính hiển vi điện tử quét (SEM) xác định cấu trúc collagen

Cấu trúc hình thái của collagen được xác định bằng phương pháp quan sát và chụp ảnh trên kính hiển vi điện tử quét (Hitachi S-4800) ở các mức độ phóng đại khác nhau.

✚ Phương pháp quang phổ chuyển đổi hồng ngoại Fourier (FTIR) xác định phổ phân tử collagen

Nguyên lý của phương pháp: ánh sáng ở vùng bước sóng từ $50 \mu\text{m} \div 1\text{mm}$ gây ra hiện tượng quay phân tử quanh trục không gian của nó, còn ánh sáng có bước sóng từ $0,8 \div 50 \mu\text{m}$ thì gây ra những dao động của nguyên tử và các liên kết trong phân tử. Do sự khác nhau về khối lượng và lực liên kết nên mỗi nhóm chức có một số khoảng tần số nhất định tương ứng với các giao động riêng của chúng. Sự thay đổi vị trí các tần số đặc trưng còn phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau như: liên kết hydro, ảnh hưởng của trạng thái tập hợp, ảnh hưởng của hiệu ứng cảm ứng... Như vậy tần số đặc trưng của một nhóm nguyên tử (gốc, nhóm chức) tương đối thay đổi từ hợp chất này sang hợp chất khác. Người ta đã xây dựng một ngân hàng cơ sở dữ liệu về phổ FTIR của nhiều chất chuẩn trong các dung môi khác nhau để giúp ta dễ dàng nhận biết các liên kết trong chúng. Dựa

trên nguyên lý này mà collagen cũng được xác định cấu trúc các nhóm chức thông qua phương pháp FTIR.

- ✚ Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) xác định thành phần axit amin trong collagen dựa trên cơ sở TCVN 12621:2019.

Hàm lượng axit amin được phân tích bằng hệ thống HPLC với tiền dẫn xuất phenylisothiocyanate (PITC).

Các mẫu đông khô được thủy phân bằng dung dịch HCl 6N chứa 0,01% phenol (w/v) trong 24 giờ tại 110°C ở điều kiện chân không. Mẫu thủy phân và các axit amin tiêu chuẩn (Sigma Aldrich, MO, USA) được lọc khi bổ sung AABA làm chất chuẩn và sấy khô bằng chân không. Hỗn dịch và chất chuẩn được bổ sung các chất phản ứng, bao gồm methanol: nước: trimethylamine theo lý lệ về thể tích là (2: 2: 1), sau đó trộn và sấy khô bằng chân không. Tiếp theo, phần cặn khô được cho phản ứng với dẫn xuất thuốc thử gồm metanol: PITC: triethylamine: nước theo tỷ lệ (7: 1: 1: 1) ở nhiệt độ phòng trước khi sấy trong chân không để loại bỏ PITC. Các mẫu dẫn xuất được hòa tan trong 0,1M acetate ammonium, pH 6,5 và lọc qua bộ lọc nylon 0,2 µm trước khi được bơm mẫu vào hệ thống HPLC.

Quá trình tách và phân tích sắc kí được tiến hành bằng hệ thống HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, USA) với hệ thống bơm 4 dòng dung môi, đầu dò huỳnh quang (DAD) và bộ lấy mẫu tự động, sử dụng cột rửa giải ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 × 150 mm, 3,5 µm, Agilent Technologies, USA). Quá trình tách các dẫn xuất của amoni acid sử dụng pha động là hỗn hợp đệm A (amoni acetat 0,1M) pH =6,5 và đệm hỗn hợp B (amoni acetat: acetonitril: metanol theo tỉ lệ thể tích là 44:46:10). Tốc độ dòng rửa ổn định ở 0,1ml/phút, và nhiệt độ cột duy trì 43°C. Pha động được thiết lập với tốc độ rửa giải đệm B tăng từ 0% - 10% trong 15 phút, đặt 40% tại phút 30; 50% tại phút 40 và giữ 100% trong 5 phút. Phổ hấp thụ tại bước sóng 254 nm được sử dụng để tính toán kết quả. Mỗi dung dịch chuẩn và mẫu được phân tích lặp lại ít nhất 3 lần. Hệ thống sắc kí được điều khiển bằng phần mềm Chemstation Rev 08.01 (Agilent Technologies USA).

- ✚ Phương pháp xác định các đặc điểm và thành phần dinh dưỡng của sản phẩm collagen theo các phương pháp chuẩn TCVN.

- Độ ẩm (g/100g) được xác định theo TCVN 3705 – 90, mẫu được sấy ở $105 \div 110^{\circ}\text{C}$ sau đó xác định bằng phương pháp trọng lượng (TCVN 1990).

- Hàm lượng protein (g/100g) được xác định theo TCVN 3705 – 90, mẫu được chưng cất Kjeldahl chuyển tất cả các dạng Nitơ về NH_4^+ , đo hàm lượng NH_4^+ bằng phương pháp quang phổ tạo phức xanh indophenol với natrihypoclorit và phenol trong môi trường citrate kiềm với sự có mặt của xúc tác Natri nitroprusit, hàm lượng protein = $\text{N-T} \times 6,25$ (Coi protein chứa 16% là nitơ) (TCVN 1990).

- Hàm lượng lipid (g/100g) được xác định theo TCVN 3703 - 2009, mẫu được chiết Soxhlet sau đó cô đuổi dung môi, sấy ở 100°C rồi xác định hàm lượng cặn bằng phương pháp trọng lượng (TCVN 2009a).

- Hàm lượng tro (g/100g) được xác định theo TCVN 5105:2009 , nung mẫu độ ẩm ở $500 - 600^{\circ}\text{C}$ rồi xác định bằng phương pháp trọng lượng (TCVN 2009b).

- Hàm lượng cacbohydrate (g/100g) = $100 - \text{độ ẩm} - \text{protein} - \text{lipid} - \text{tro}$.

- Giá trị pH được tình bằng cách lấy mẫu collagen hoà tan trong nước cất, khuấy đều trong 12 giờ ở 4°C và xác định độ pH bằng máy đo pH.

✚ Phương pháp tán xạ ánh sáng động (Dynamic light scattering - DLS) xác định sự phân bố kích thước hạt collagen phân tử theo [67]

Có nhiều phương pháp khác nhau để xác định kích thước các tiểu phân trong hệ nano, trong đó DLS là một kỹ thuật được sử dụng phổ biến vì phương pháp dễ tiến hành, không cần công đoạn xử lý mẫu phức tạp, thời gian để đo mẫu ngắn và độ lặp kết quả tốt.

Phương pháp DLS xác định kích thước tiểu phân dựa trên sự tán xạ ánh sáng laze khi các tiểu phân chuyển động Brown trong môi trường phân tán. Các tiểu phân có kích thước nhỏ chuyển động nhanh hơn so với các tiểu phân có kích thước lớn hơn. Ánh sáng tán được phát hiện và ghi nhận bởi detector ở một góc nhất định.

Trong nghiên cứu này, mẫu collagen peptide được pha loãng và được phân tích bởi hệ thống phân tích kích thước Malvern Zetasizer ZS90 (Anh).

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

- Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính thống kê và độ chính xác của thí nghiệm.
- Các số liệu được xử lý, vẽ đồ thị và tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.
- Số liệu được xử lý bằng phương pháp thống kê phương sai (ANOVA) đơn yếu tố với độ tin cậy là 95%.
- Hiệu suất tách chiết collagen (H) được tính toán theo công thức:

+ Hiệu suất thu collagen ướt:

$$H_{\text{collagen}} (\%) = \frac{m_{\text{collagen qua ly tâm}}}{m_{\text{sữa muối đã dùng}}} \times 100; (m: \text{khối lượng, gam})$$

+ Hiệu suất thu collagen khô:

$$H_{\text{collagen}} (\%) = \frac{m_{\text{collagen đông khô}}}{m_{\text{sữa đã dùng}}} \times 100; (m: \text{khối lượng, gam})$$

+ Hiệu suất tách chiết collagen:

$$H_{\text{collagen}} (\%) = (m_{\text{collagen đông khô}}) / (m_{\text{collagen có trong nguyên liệu}}) \times 100;$$

Trong đó: m - khối lượng, gam

$$M_{\text{collagen có trong nguyên liệu}} = m_{\text{protein tổng trong nguyên liệu}} \times 60\% [68].$$

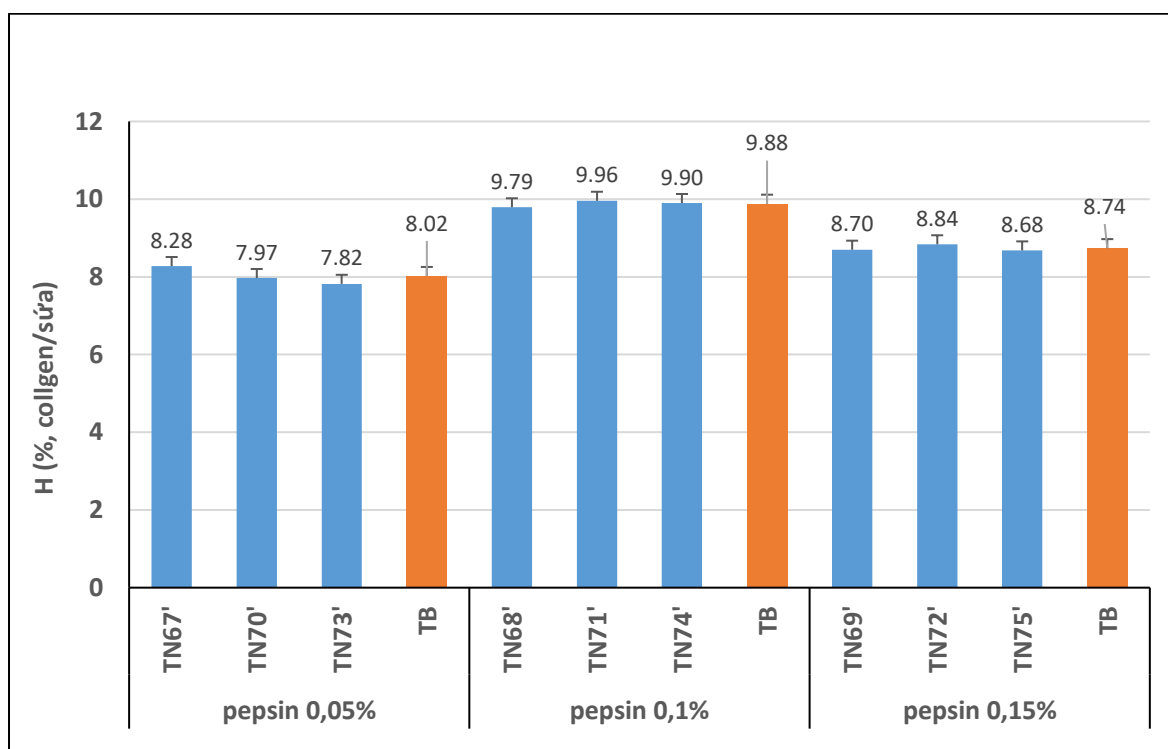
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu ứng dụng enzyme pepsin trong tách collagen từ sữa *R. hispidum*

3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme pepsin tới hiệu suất tách chiết collagen từ sữa *R. hispidum*

Các nghiên cứu tách chiết collagen bằng axit acetic hoặc axit acetic kết hợp axit lactic đã được thực hiện trên nhiều đối tượng, tuy nhiên nhiều nghiên cứu cho thấy hiệu suất chiết kém của axit [23] [11] [15], đặc biệt với nguyên liệu sữa [23]. Kết quả này có thể là do liên kết chéo cộng hóa trị giữa các phân tử tại các vùng telopeptide mà axit acetic không thể phân cắt [44]. Do đó, trong nghiên cứu này, thử nghiệm tách chiết collagen bằng axit acetic kết hợp enzyme pepsin ở các điều kiện khác nhau đã được nghiên cứu.

Kết quả thí nghiệm thay đổi nồng độ enzyme pepsin được thể hiện trên Hình 3.1.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme pepsin tới hiệu suất thu collagen từ sữa *R. hispidum*

Biểu đồ Hình 3.1 cho thấy, khi thay đổi nồng độ enzyme pepsin sử dụng sẽ cho hiệu suất thu collagen khác nhau. Cụ thể với 3 hàm lượng đã sử dụng,

pepsin 0,1% cho hiệu suất cao nhất đạt 9,88%. Nồng độ pepsin 0,15% và 0,05% cho hiệu suất thu hồi thấp hơn lần lượt là 8,74% và 8,02%. Như vậy, hiệu suất thu hồi collagen không có xu hướng đồng biến theo hàm lượng enzyme đã sử dụng. Từ kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố trên Bảng 3.1 cho thấy, tất cả các cặp thí nghiệm trên đều có giá trị $P_{\text{value}} < 0,05$ chứng minh sự sai khác giữa các thử nghiệm có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.1. Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố giữa các nồng độ enzyme pepsin thử nghiệm (giá trị $P=0,05$)

Nồng độ pepsin			
<i>P-value</i>	0,05M	0,1M	0,15M
0,05M		+	+
0,1M	1,69745E-06		+
0,15M	0,000405893	4,26E-07	

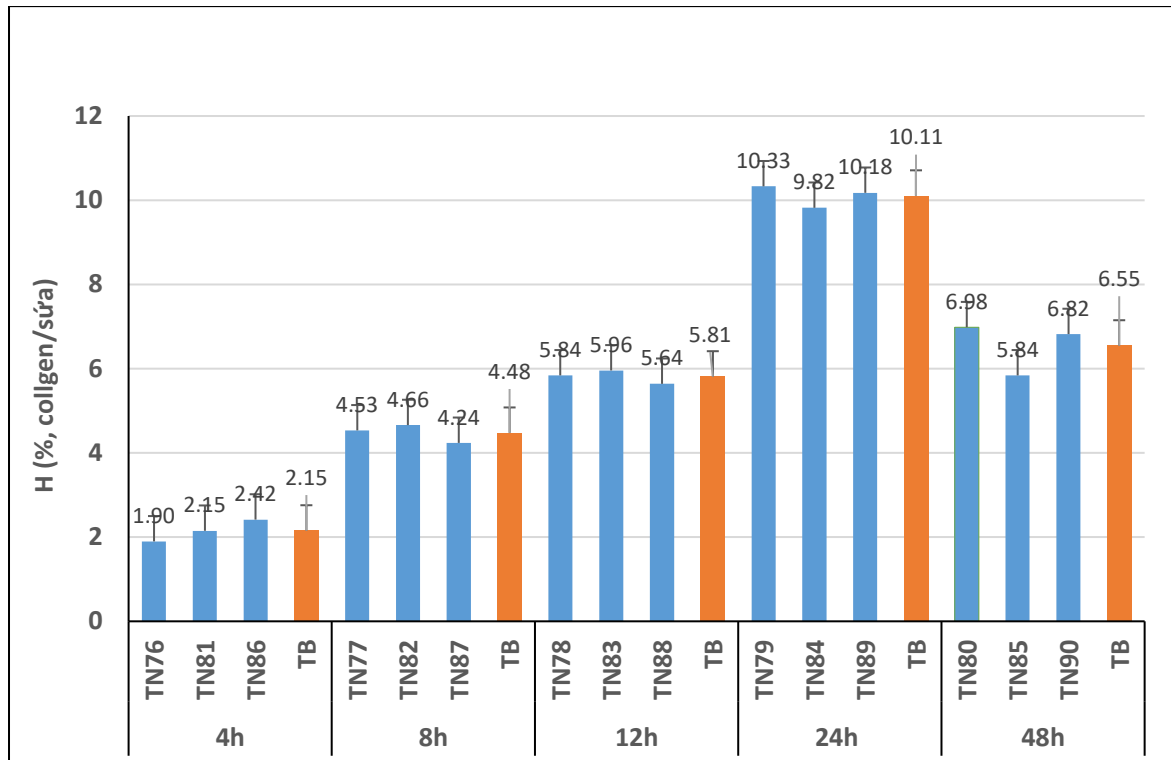
Bổ sung enzyme trong môi trường pH thích hợp sẽ tạo điều kiện để enzyme hoạt động tốt, giúp phân cắt các vùng liên kết chéo telopeptide mà không phá vỡ tính toàn vẹn của chuỗi xoắn 3 và do đó thủy phân một số protein không liên kết và tăng độ tinh khiết của collagen. Tuy nhiên, khi nồng độ enzyme cao hơn, hoặc thời gian xử lý dài hơn, enzyme có thể phân cắt các cầu liên kết giữa 3 chuỗi xoắn trong phân tử collagen, làm tăng quá trình hòa tan của collagen trong dung dịch chiết, thậm chí tiếp tục phân hủy các chuỗi xoắn, phân hủy collagen trong dung dịch chiết [57]. Điều này giải thích cho sự giảm hiệu suất thu collagen khi hàm lượng enzyme được sử dụng tăng lên.

Với các nghiệm thức thử nghiệm tương tự trên hai loài sứa khác, Barzideh và [23] và Nagai [15] cho kết quả hiệu suất chiết cao nhất khi sử dụng dung dịch CH_3COOH hòa tan enzyme pepsin 10% với tỷ lệ dung dịch: sứa (v:w) là 10:1. Tuy nhiên với các nguồn nguyên liệu khác nhau, hiệu suất thu collagen cũng khác nhau đáng kể như: dù sứa *Chrysaora* sp. 19% [23], dù sứa thùng (*Rhizostoma pulmo*) và sứa Trúng (*Cotylorhiza tuberculata*) < 10% [8]; chất nền ngoại bào sứa *Rhopilema asamushi* đạt 35,2% [15]; *Stomolophus meleagris* 46% [22]. Sự khác nhau đáng kể này là minh chứng rằng tùy thuộc mỗi nguồn

nguyên liệu đều cần các thử nghiệm kiểm chứng lại để tìm ra quy trình tách mang lại hiệu suất chiết cao nhất.

3.3.2. Ảnh hưởng của của thời gian tới hiệu suất tách chiết collagen từ sữa *R. hispidum* bằng enzyme pepsin

Kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của thời gian tới hiệu suất tách chiết collagen từ sữa bằng enzyme pepsin được thể hiện trên Hình 3.2.



Hình 3.2. Ảnh hưởng của thời gian sử dụng enzyme pepsin tới hiệu suất thu collagen từ sữa *R. hispidum*

Các kết quả thí nghiệm trên biểu đồ Hình 3.2 cho thấy, hiệu suất chiết tách collagen từ sữa biển bằng phương pháp hoá học kết hợp bổ sung enzyme pepsin phụ thuộc rất nhiều vào thời gian ngâm mẫu trong dung dịch. Trong khoảng thời gian ngâm mẫu từ 4h ÷ 24h, hiệu suất thu collagen có xu hướng tăng đáng kể từ 2,15% lên 10,11% (gấp gần 5 lần). Tuy nhiên, khi thời gian chiết tăng lên 48h thì hiệu suất thu collagen có xu hướng giảm chỉ còn 6,55%. Điều này cho thấy, khi enzyme phân hủy các liên kết cầu giữa các mạch xoắn thì hiệu suất thu collagen ban đầu tăng, khi càng tăng thời gian xử lý mẫu, enzyme phân hủy hết các cầu liên kết có thể sẽ tiếp tục phân hủy các chuỗi xoắn nên làm giảm hàm lượng collagen. Do vậy, ngâm mẫu sữa tách chiết trong dung môi có bổ

sung enzyme trong 1 khoảng thời gian nhất định, đủ để phân cắt các cầu liên kết giữa các chuỗi xoắn 3 của collagen, sau đó cần bổ sung dung dịch Na_2HPO_4 0,02M nhằm bất hoạt enzyme pepsin còn dư thừa trong dung dịch tách chiết. Trong đó, dung dịch tách chiết (dung dịch CH_3COOH có giá trị pH = 3÷5 hòa tan enzyme pepsin), khi bổ sung dung dịch Na_2HPO_4 0,02M có pH = 8,8 vào thì pH của dung dịch tách chiết sẽ tăng lên và tăng đến pH đẳng điện của collagen (pH = 5÷7), tại pH đẳng điện này thì các phân tử collagen bị kết tủa. Đây là phương thức hết sức quan trọng làm bất hoạt enzyme và làm tăng khả năng thu hồi sản phẩm collagen trong công nghệ tách chiết collagen từ sữa biển.

Bảng 3.2. Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố giữa các thời gian tách chiết thử nghiệm (giá trị $P=0,05$)

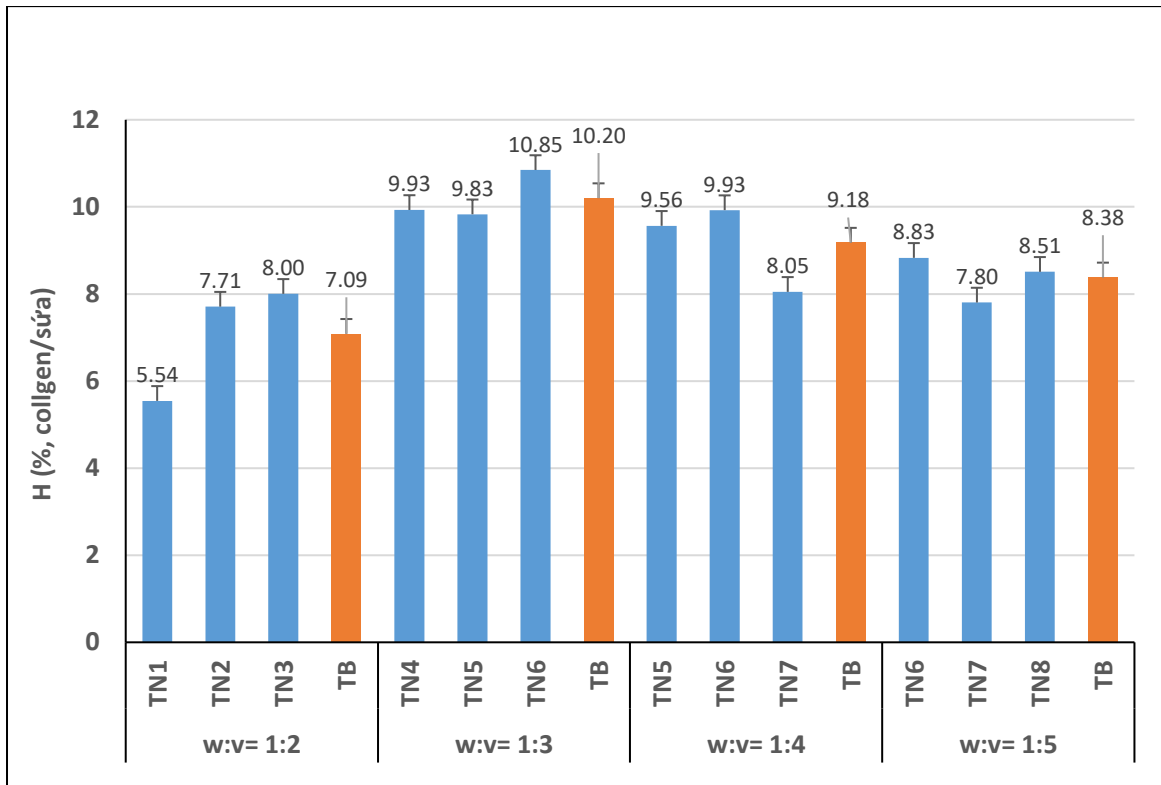
Thời gian chiết mẫu (giờ)					
<i>P-value</i>	4h	8h	12h	24h	48h
4h		+	+	+	+
8h	2,80749E-06		+	+	+
12h	1,02711E-07	1,92E-05		+	+
24h	3,0504E-09	1,49E-08	4,1E-08		+
48h	0,000244896	0,000245	0,030406	1,29E-05	

Kết quả kiểm định bằng ANOVA một yếu tố ($P=0,05$) cho thấy sự sai khác có ý nghĩa thống kê thực sự giữa các nghiệm thức thời gian khác nhau. Như vậy, kết quả thử nghiệm cho thấy thời gian ngâm mẫu 24h trong dung môi bổ sung enzyme pepsin 0,1% là cho hiệu suất thu collagen từ nguyên liệu sữa *R. hispidum* đạt cao nhất và nên được lựa chọn áp dụng.

Nghiên cứu [69] cũng sử dụng 0,1% pepsin khi thủy phân collagen loại I từ da dê cho thấy kết quả tương tự hiệu quả cũng đạt cao nhất khi thời gian thủy phân là 24h. Tuy nhiên, nhiều thử nghiệm khác cần thời gian dài hơn mới hiệu suất thu collagen cao nhất như 32h với cá trắm đốm (*Ctenopharyngodon idella*) [70], 48h với da cá chép (*Catla catla*) [71]. Có thể thấy, hiệu quả thủy phân collagen phụ thuộc vào nhiều yếu tố, ngoài điều kiện thủy phân còn có sự khác biệt giữa các nguồn nguyên liệu và phương pháp tiền xử lý trước khi thủy phân.

3.3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ sữa với thể tích dung môi enzyme pepsin tới hiệu suất tách chiết collagen từ sữa *R. hispidum*

Kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của tỷ lệ sữa với thể tích dung dịch enzyme pepsin trong CH_3COOH tới hiệu suất tách chiết collagen từ sữa *R. hispidum* được thể hiện trên Hình 3.3.



Hình 3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ giữa khối lượng sữa và thể tích dung môi enzyme pepsin tới hiệu suất thu collagen từ sữa *R. hispidum*

Kết quả thí nghiệm trên Hình 3.3 cho thấy tỷ lệ khối lượng sữa:thể tích dung môi enzyme pepsin có ảnh hưởng đến hiệu suất tách chiết collagen, tuy nhiên sự biến động giữa các nghiệm thức thử nghiệm là không lớn. Cụ thể, hiệu suất có xu hướng tăng khi tỷ lệ giảm từ 1:2 xuống 1:3, nhưng lại giảm dần khi tỷ lệ tiếp tục giảm xuống 1:4 và 1:5. Hiệu suất trung bình đạt cao nhất 10,2%. Do vậy, tỉ lệ 1:3 có thể được sử dụng trong quy trình tách chiết collagen bằng enzyme pepsin.

Để kiểm định sự khác biệt của hiệu suất tách chiết ở các ngưỡng của yếu tố thí nghiệm tỷ lệ có ý nghĩa thống kê thật sự hay không, các kết quả được

kiểm định theo tiêu chuẩn ANOVA một yếu tố với $P=0,05$. Kết quả kiểm định được thể hiện trên Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố giữa các tỷ lệ mẫu sữa và dung môi thử nghiệm (giá trị $P=0,05$)

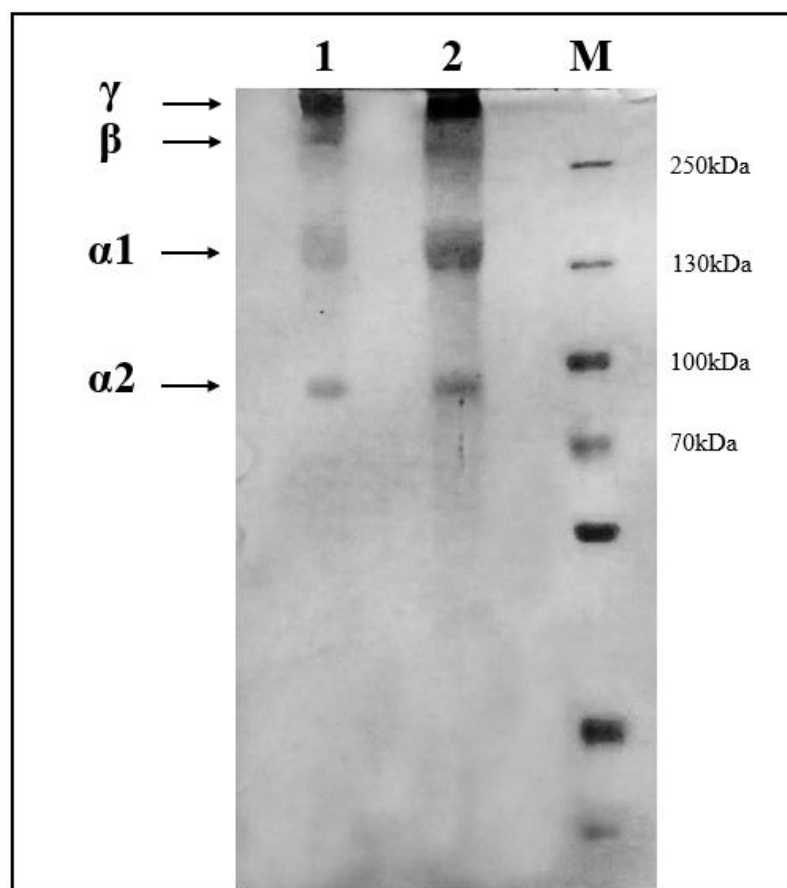
Tỷ lệ sữa: dung dịch pepsin (w:v)				
<i>P-value</i>	1:2	1:3	1:4	1:5
1:2		+	+	-
1:3	0,00192324		+	+
1:4	0,021972183	0,071026		+
1:5	0,07000954	0,001141	0,132764	

Kết quả kiểm định ANOVA một yếu tố trên Bảng 3.3 cho thấy, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hiệu suất thu collagen giữa tỷ lệ sữa: thể tích dung môi enzyme pepsin là 1:2 và 1:5. Các cặp thí nghiệm khác đều có giá trị $P_{\text{value}} < 0,05$. Điều này minh chứng rằng tỷ lệ 1:3 là tỷ lệ cho hiệu suất thu collagen thực sự cao nhất. Có thể thấy, các kết luận và các xu hướng biến động và sự khác biệt giữa các kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của yếu tố enzyme pepsin tới hiệu suất tách collagen ở trên đều có ý nghĩa, mang tính thống kê và hoàn toàn có giá trị sử dụng cho việc xây dựng quy trình tách chiết collagen.

3.2. Xác định một số đặc điểm của sản phẩm collagen

3.2.1. Đặc điểm thành phần và trọng lượng của collagen

Thành phần, trọng lượng phân tử của collagen và dạng collagen cũng như mức độ tinh sạch của sản phẩm collagen được tách chiết từ sữa *R. hispidum* đã được xác định dựa trên kết quả điện di SDS-PAGE.



Hình 3.4. Bản điện di SDS-PAGE của mẫu collagen tách chiết

(*M*-marker, protein chuẩn; 1-collagen từ quy trình chỉ sử dụng CH_3COOH , 2-collagen từ quy trình sử dụng CH_3COOH kết hợp enzyme pepsin)

Kết quả điện di SDS-PAGE trên Hình 3.5 cho thấy, trong sản phẩm collagen thu được có 4 loại protein có các trọng lượng phân tử lần lượt khoảng trên 250kDa, 250kDa, 140kDa và 100kDa. Trong đó hai dạng tiểu phân chuỗi α (band α_1 -140 kDa và α_2 -100 kDa) là dạng chính. Điều này xác định collagen tách chiết từ sứa *R. hispidum* theo quy trình nghiên cứu đa phần là collagen loại I. Thêm vào đó, một số nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng, động vật không xương sống biển bao gồm nhím biển _ *Paracentrotus lividus* [72] Sao biển _ *Acanthaster planci* [73] và mực _ *Uroteuthis duvauceli* [74] đều cho collagen loại I.

Ở quy trình sử dụng kết hợp CH_3COOH và enzyme pepsin, sản phẩm thu được có tỷ lệ chuỗi monome ($\alpha_1+\alpha_2$) cao hơn ở quy trình chỉ sử dụng axit acetic. Kết quả này cũng tương tự trong các nghiên cứu của [75] [45] trong các nghiên cứu về tách chiết collagen trên một số loài cá. Kết quả này chỉ ra rằng mức độ liên kết ngang trong các phân tử collagen tách chiết chỉ bằng axit cao

hơn trong các phân tử collagen tách chiết bằng axit kết hợp enzyme, vì các vùng đầu cuối -N và -C trong phân tử đã bị pepsin loại bỏ [76], và do đó chuỗi β và chuỗi γ được chuyển đổi dễ dàng thành chuỗi α .

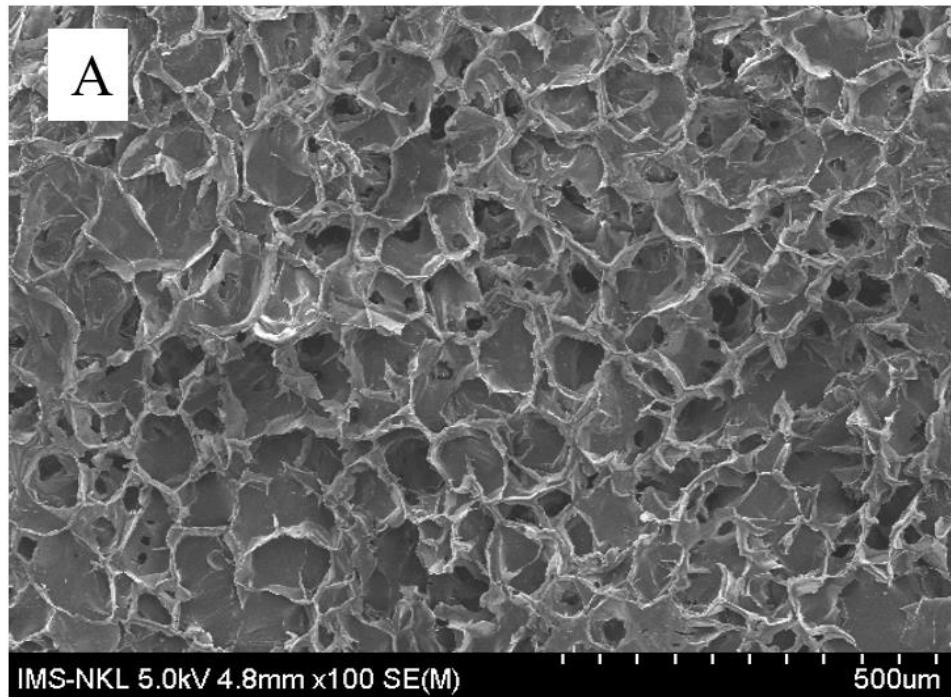
Mặt khác, theo [23], loại collagen chính tách chiết từ chân sứa *Chrysaora* sp. là collagen type II với ba chuỗi α 1 giống hệt nhau. Tuy nhiên, Nagai và cộng sự (2000) [15] đã chứng minh rằng collagen từ dịch ngoại bào sứa *Rhopilema asamushi* chứa hai chuỗi α khác nhau, α 1 và α 2. Ngoài ra, Miura & Kimura (1985) [77] đã tìm thấy chuỗi α 1, α 2 và α 3 trong collagen từ trung bì của loài *Stomolophus nomurai*. Collagen từ *Stomolophus meleagris* cũng chứa α 1, α 2 và α 3 [22]. Những khác biệt này là do sự biến đổi thành phần collagen cụ thể theo loài và bộ phận của sứa dùng để tách chiết.

Ngoài ra, kết quả SDS-PAGE còn cho thấy, mặc dù vẫn còn vạch màu mờ chạy dọc theo các giếng do mẫu chưa được xử lý qua bước tinh sạch nhưng không có hoặc có ít các band có trọng lượng dưới 100 kDa, điều này chỉ ra độ tinh khiết của mẫu collagen nghiên cứu tương đối tốt.

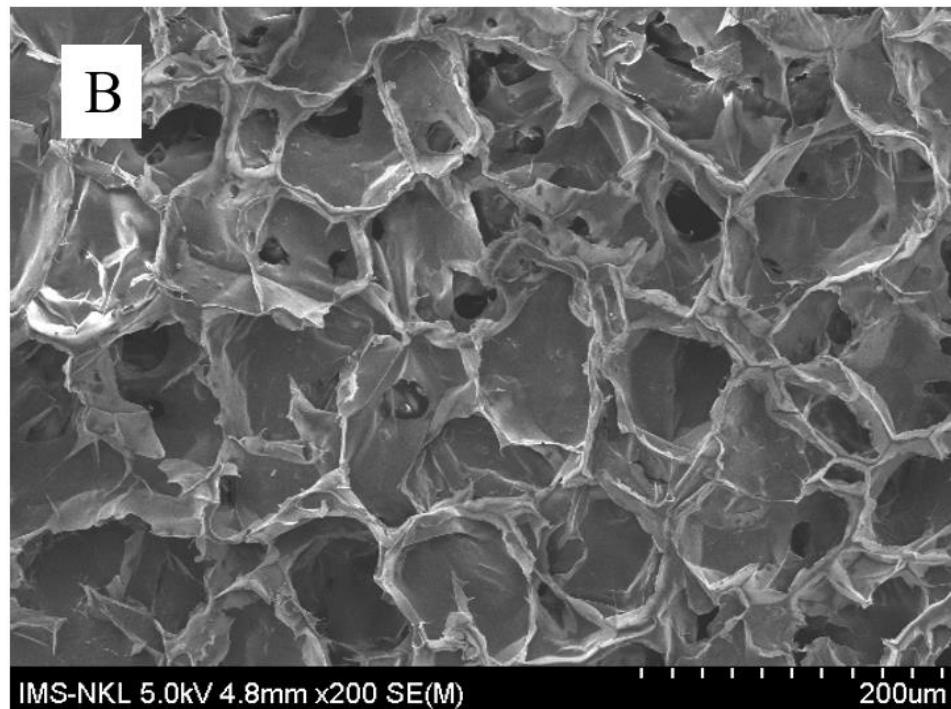
3.2.2. Đặc điểm của collagen dưới kính hiển vi quét (SEM)

Bột collagen từ sứa đã tách chiết thông qua các phương thức thử nghiệm enzyme pepsin đã được tinh sạch và quan sát, chụp ảnh ở mức độ phóng đại dưới kính hiển vi quét – SEM (Hitachi S-4800). Kết quả quan sát được thể hiện trên Hình 3.5.

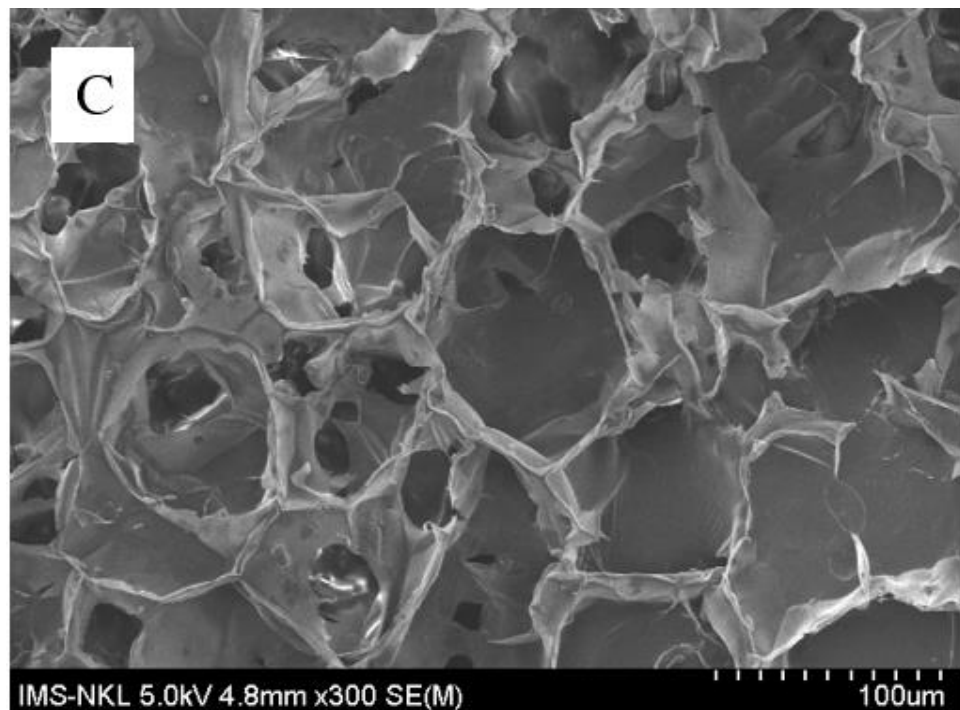
Hình ảnh SEM



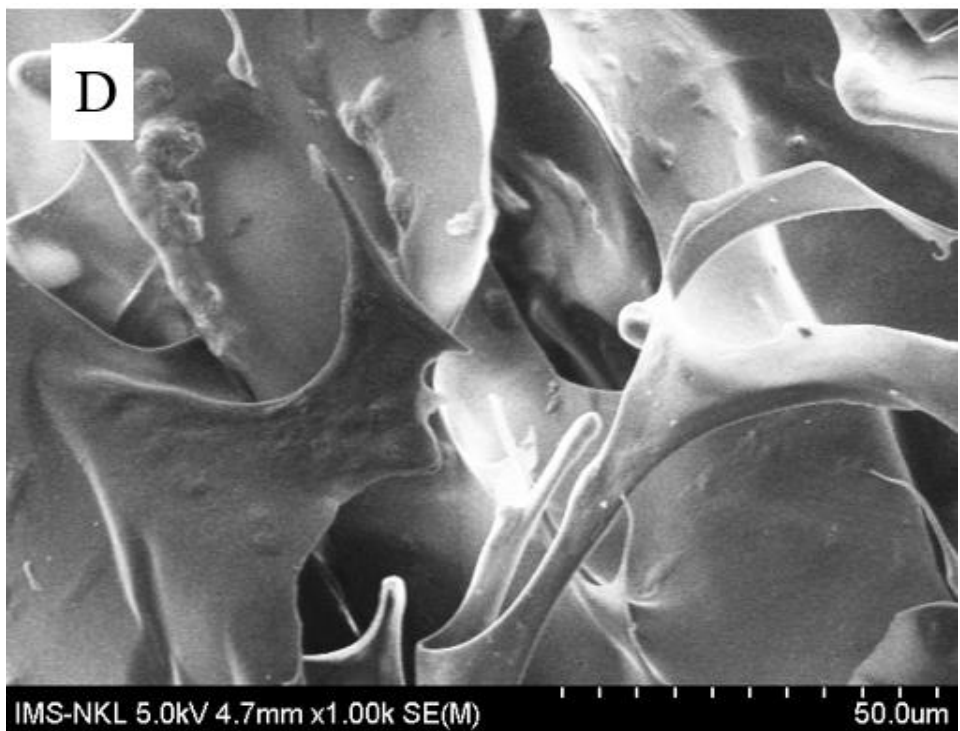
- Độ phóng đại: thước 500µm
- Bột collagen có cấu tạo xốp, tạo lỗ hình lục giác tương đối đều



- Độ phóng đại: thước 200µm
- Bột collagen có cấu tạo xốp, tạo lỗ hình lục giác tương đối đều, các thành lỗ tương đối phẳng



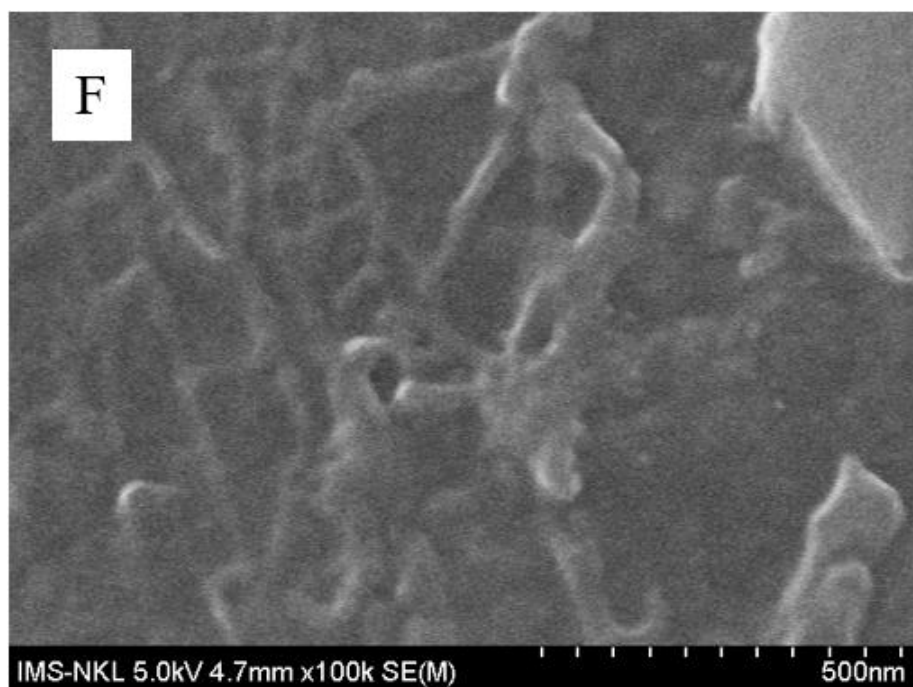
- Độ phóng đại: thước 100 μ m
- Các lỗ hình lục giác đan xen chéo xen kẽ nhau



- Độ phóng đại: thước 50 μ m
- Cấu trúc mặt thành và cạnh lỗ hình lục giác được quan sát rõ hơn với các cấu tạo dạng tấm



- Độ phóng đại: thước $1\mu\text{m}$
- Cấu trúc phân tử được quan sát rõ hơn nữa với hình ảnh các đường gân sợi đan xen lẫn nhau



- Độ phóng đại: thước 500 nm
- Cấu trúc các bó sợi collagen đan xen lẫn nhau

Hình 3.5. Ảnh chụp SEM cấu trúc bột collagen tách chiết từ sứa *R. hispidum*

Trên Hình 3.5. cho thấy, bột collagen dưới kính hiển vi quét - SEM có các đặc trưng ở các độ phóng đại khác nhau. Ở thước đo 500 μm (Hình 3.5.A), bột collagen có cấu tạo xốp, tạo lỗ hình lục giác tương đối đều. Thước 200 μm (Hình 3.5.B), 100 μm (Hình 3.5.C) cho thấy các lỗ được cấu tạo từ các tấm tương đối phẳng, thành lỗ có thể quan sát rõ. Ở thước đo 50 μm (Hình 3.5.D), các tấm được quan sát rõ ràng hơn. Đặc biệt ở thước 1 μm (Hình 3.5.E) và 500nm (Hình 3.5.F), nếu quan sát kỹ có thể thấy cả các cấu trúc dạng sợi to nhỏ khác nhau tương ứng các dạng sợi collagen mạch peptide đơn, cấu trúc dipeptide và cấu trúc tripeptide.

Có thể thấy bột collagen thu được gồm nhiều sợi liên kết với nhau, tạo thành mạng lưới sợi và xếp thành các lớp đồng nhất cấu trúc, tập hợp thành các tấm liên kết với nhau có trật tự và tạo thành các lỗ hình lục giác xen kẽ lẫn nhau tạo nên độ xốp của bột.

Các đặc điểm hình thái của bột và sợi collagen được tách chiết từ sữa *R. hispidum* cũng có đặc điểm chính tương tự như bột collagen được tách chiết từ một số loài sữa khác [15] [5] [23]. Nếu quan sát từ độ phóng đại lớn cho tới độ phóng đại nhỏ thì thấy các sợi collagen kết với nhau tạo thành các cấu trúc mạng lưới, tạo thành tấm phẳng mịn.

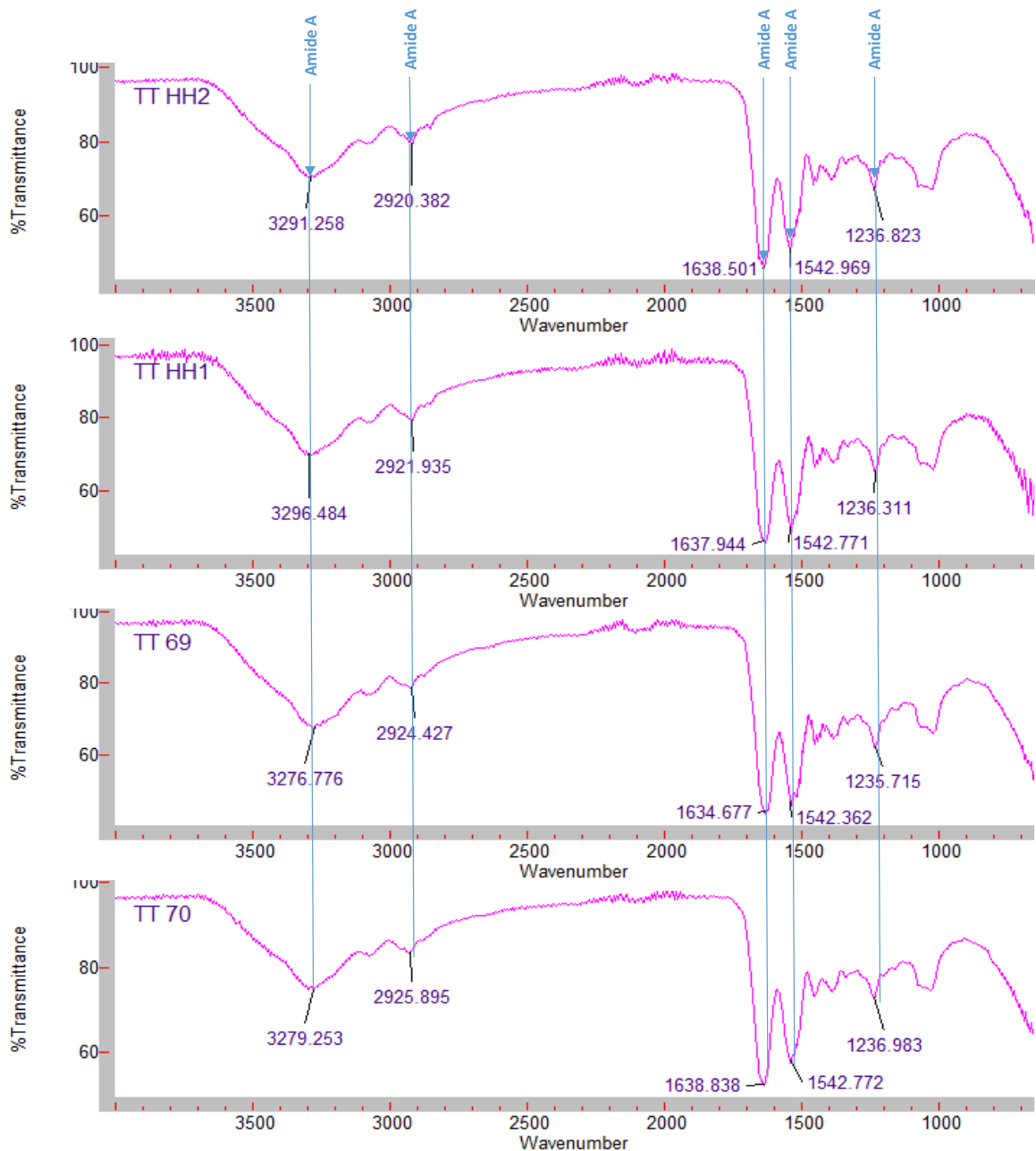
3.2.3. Đặc điểm phổ phân tử (FTIR) của collagen

Bột collagen từ sữa *R. hispidum* đã được tách chiết theo quy trình sử dụng enzyme pepsin đã được tinh sạch và đọc phổ phân tử trên máy Carry 630 FTIR. Kết quả các phổ được thể hiện trên Hình 3.6.

Từ kết quả trên Hình 3.6 cho thấy, quang phổ chuyển đổi hồng ngoại Fourier (FTIR) đã xác định sự khác biệt về cấu trúc thứ cấp và các nhóm chức năng (amide) của mẫu collagen từ nguyên liệu sữa, với phổ của collagen có 5 đỉnh hấp phụ tương ứng với Amide A, B và amide bậc I, II và III. Trong đó:

- ✓ Amide A thể hiện liên kết N-H, giúp ổn định cấu trúc xoắn của collagen
- ✓ Amide B liên quan đến sự kéo dài không đối xứng của nhóm CH_2 và NH^{3+}
- ✓ Amide bậc I thể hiện liên kết C=O, nhóm NH với nhóm COO^- , tương ứng cấu trúc bậc 2 của protein

- ✓ Amide II, III thể hiện liên kết C=N, tương ứng cấu trúc bậc 3 của protein



Hình 3.6. Dải phổ hấp thụ các mẫu collagen được đọc trên máy

Carry 630 FTIR

Mặt khác, khi so sánh giá trị các phổ hấp thụ của các amide giữa các mẫu collagen từ sữa nghiên cứu với các phổ hấp thụ của collagen từ các nguyên liệu khác cũng cho thấy, các phổ amide của collagen từ sữa nằm trong ngưỡng phổ hấp thụ của protein cũng như nằm trong dải phổ tương tự của các amide

cấu trúc phân tử từ collagen được tách chiết của các nguồn nguyên liệu khác. Kết quả này được thể hiện rõ trong bảng số liệu Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Dải phổ hấp phụ của amide phân tử collagen từ sữa *R. hispidum* và từ các nguyên liệu biển khác [23]

Vùng	Đỉnh sóng hấp phụ (cm^{-1}) collagen từ các nguyên liệu khác nhau				
	Cá đò biển sâu	Cá mập tre	Sữa <i>Chrysaora</i> sp.	Sữa <i>R. hispidum</i>	Dải phổ protein
Amide A	3322	3294	3314	3266-3296	3400–3440
Amide B	2927	2925	2924	2920-2924	3100
Amide I	1655	1635	1653	1634-1638	1600–1700
Amide II	1551	1541	1551	1542	1510–1580
Amide III	1240		1239	1234-1236	1200–1300

3.2.4. Đặc điểm thành phần và số lượng axit amin của collagen

Thành phần và hàm lượng các axit amin trong mẫu collagen được phân tích bằng phương pháp Sắc kí lỏng hiệu năng cao kết nối với detector huỳnh quang (High-performance liquid chromatography with fluorescence detection HPLC – FLD), kết quả được trình bày trong Bảng 3.3, đơn vị là số lượng axit amin/1000 axit amin.

Thành phần acid amin trong collagen tinh sạch từ sữa biển *R. hispidum* đã phát hiện được 17 loại axit amin, trong đó hàm lượng glycine chiếm cao nhất (217-224g/1000g). Kết quả phân tích trên một số loài sữa khác chỉ ra rằng Collagen từ sữa rất giàu glycine, proline, alanine và glutamic axit; chứa hàm lượng thấp hoặc không có cysteine và tryptophan (Bảng 3.5).

Bảng 3.5. Thành phần axit amin trong collagen từ thí nghiệm và một số loài sữa khác (g/1000g)

STT	Acid amine	<i>R. hispidum 1</i>	<i>R. hispidum 2</i>	<i>R. hispidum 3</i>	Sữa <i>Chrysaora</i> sp.1 [23]	Sữa [77]	Sữa [22]
1	Hydroxyproline	KPT	KPT	KPT	70	57	40
2	Aspartic acid	62	56	57	76	71	79
3	Serine	17	19	20	44	45	45
4	Glutamic acid	100	72	133	101	94	98
5	Glycine	217	224	224	320	344	309
6	Histidine	ND	ND	ND	ND	1	2
7	Arginine	53	63	66	58	57	52
8	Threonine	34	32	37	34	28	35
9	Alanine	67	48	73	87	77	82
10	Proline	112	74	111	79	79	82
11	Cysteine	ND	ND	ND	ND	1	–
12	Tyrosine	12	5	13	10	5	6
13	Valine	30	33	66	22	24	35
14	Methionine	6	6	6	16	8	4
15	Lysine	25	29	100	17	24	38
16	Isoleucine	21	33	40	23	16	22
17	Leucine	28	29	54	31	27	34
18	Phenylalanine	9	10	10	14	8	10
19	Tryptophan	KPT	KPT	KPT			
20	Hydrolysine	KPT	KPT	KPT			

Ghi chú: KPT – không phân tích, ND – không phát hiện

Glycine là loại axit amin quan trọng trong quá trình tổng hợp protein, purin, peptide, axit nucleic, porphyrin, hemoglobin, creatine, glucose, L-serine, ATP và các axit amin khác [78]. Hàm lượng tyrosine và histidine tương đối thấp trong collagen chiết xuất từ cá, gà, bò, tuy nhiên trong collagen chiết xuất từ sữa thì hàm lượng tyrosine cao hơn 1,5 - 3 lần.

Axit imino là hàm lượng tổng của proline và hydroxyproline. Hàm lượng imino của collagen chiết tách từ sữa biển là 112 g/1000g axit amin, thấp hơn so với collagen tách chiết từ da cá hồng mắt to (193 g/1000g axit amin) và collagen tách chiết từ da cá đuối (157 g/1000g axit amin) [60] [79]. Hàm lượng imino axit thay đổi theo loài và môi trường sống của chúng [80] [44] [60]. Collagen từ cá chứa 154-193g axit imino/1000 axit amin) ít hơn so với collagen từ động vật có vú (lợn, bò) (215-220g imino/1000 axit amin). Hàm lượng axit imino trong cá nước lạnh thấp hơn so với cá nước ấm. Imino axit góp phần vào sự ổn định của cấu trúc xoắn của collagen [76] [44]. Vòng pyrrolidine của proline và hydroxyproline hạn chế việc tạo thành cấu trúc của chuỗi polypeptide và giúp tăng cường cấu trúc xoắn ba [81]. Nhóm hydroxyl của hydroxyproline đóng vai trò trong việc ổn định chuỗi xoắn bằng liên kết hydro giữa các chuỗi thông qua cầu nối là phân tử nước cũng như liên kết hydro trực tiếp với một nhóm cacbonyl. Với hàm lượng axit imino trong thành phần thấp hơn so với các nguồn khác, collagen từ sữa dễ có khả năng bẻ gãy liên kết để tạo thành các phân tử có trọng lượng thấp hơn, từ đó có khả năng tạo sự đa dạng về thành phần phân tử collagen và nâng cao các hoạt tính của chúng.

Như vậy, chất lượng collagen tách chiết từ sữa có chất lượng về thành phần, số lượng axit amine tốt hơn so với nhiều loại collagen được tách chiết từ các nguồn nguyên liệu khác, và chính sự khác biệt về chất lượng này cũng góp phần tạo nên tính bền vững trong cấu trúc không gian của collagen, giúp làm tăng chất lượng và khả năng ứng dụng cho nhiều mục đích.

3.2.5. Một số đặc điểm khác của collagen

Một số đặc điểm về thành phần dinh dưỡng của collagen được tách chiết từ sữa *R. hispidum* trong nghiên cứu cũng được xác định, kết quả được thể hiện trên Bảng 3.6.

Từ kết quả trên Bảng 3.6 cho thấy, thành phần collagen tách chiết chủ yếu là protein, chiếm tới 89,01%, tiếp đến là hàm lượng carbohydrate (5,09%) và tro (1,84%). Đặc biệt là trong thành phần của collagen từ sữa không có lipid, trong khi collagen từ một số nguồn khác vẫn phát hiện thành phần lipid. Đây là một thông số có tính chất ưu việt trong quy trình tách chiết collagen từ sữa *R. hispidum*. Mặt khác, khi so sánh với collagen từ các nguyên liệu khác (gà, cá), collagen thu được có chất lượng khá tốt, độ ẩm đạt thấp nhất chỉ 4,06%, hàm lượng protein tương đối cao, lượng carbohydrate cũng thấp hơn so với collagen được tách chiết từ gà.

Bảng 3.6. Một số đặc điểm dinh dưỡng của collagen

Thông số	Đơn vị	Collagen trong nghiên cứu	Collagen từ gà [82]	Collagen từ da Cá Hồi [83]	Collagen từ đầu Cá Thu [84]
Độ ẩm	g/100g	4,06 ± 0,01	5,10 ± 0,06	74,2±0,2	7,7±1,4
Protein	g/100g	89,01 ± 2,14	70,84 ± 0,73	22,4±0,1	89,4±1,8
Lipit	g/100g	ND	1,02 ± 0,05	03,3±0,3	0,8±0,1
Tro (ash)	g/100g	1,84 ± 0,25	13,03 ± 0,16	00,3±0,1	1,6±0,5
Carbohydrate	g/100g	5,09	9,97		

3.3. Nghiên cứu thử nghiệm phân cắt collagen bằng enzyme tạo sản phẩm collagen peptide

3.3.1. Kết quả thử nghiệm phân cắt collagen tạo sản phẩm collagen peptide bằng enzyme alkaline protease

Dựa trên các kết quả nghiên cứu đã được công bố trong và ngoài nước về hướng nghiên cứu phân cắt collagen, luận văn đã thử nghiệm tạo sản phẩm collagen peptide dựa trên việc ứng dụng enzyme alkaline protease trong việc phân cắt mạch collagen. Dữ liệu về khối lượng collagen khô qua đông khô được so sánh với khối lượng sữa nguyên liệu, hàm lượng collagen có trong nguyên liệu để tính hiệu suất và thể hiện kết quả trên Bảng 3.7.

Bảng 3.7. Kết quả thử nghiệm phân cắt collagen thành collagen peptide

	Quy trình thử nghiệm	Quy trình đối chứng
Khối lượng nguyên liệu sữa (gam)	30	30
Collagen có trong nguyên liệu sữa theo lý thuyết (gam)	0,54	0,54
Bột collagen khô (gam)	0,39	0,50
Hiệu suất so với nguyên liệu sữa (%)	1,31	1,66
Hiệu suất so với collagen trong nguyên liệu (%)	72,46	91,95

Kết quả trên Bảng 3.7. cho thấy khi bổ sung thêm bước phân cắt tạo collagen peptide ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất thu collagen. Cụ thể, hiệu suất thu hồi lượng bột collagen qua phân cắt bằng enzyme alkaline protease đạt ~ 1,31% so với khối lượng nguyên liệu và đạt được 72,46% so với lượng collagen có trong nguyên liệu sữa theo tính toán lý thuyết. Trong khi đó, thử nghiệm 2 khi không có sử dụng thêm enzyme alkaline thì hiệu suất thu hồi collagen cao hơn đạt 1,66% so với khối lượng nguyên liệu và đạt được 91,95% so với lượng collagen có trong nguyên liệu sữa.

Collagen peptide được coi là nguyên liệu lý tưởng trong lĩnh vực thực phẩm chức năng do giá trị dinh dưỡng cao, hoạt tính hạ huyết áp cao và tính kháng nguyên thấp. Việc ứng dụng collagen peptide đã được quan tâm trong suốt hai thập kỷ qua trong ngành công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm. Mặc dù các nghiên cứu đã đạt được nhiều tiến bộ trong thủy phân collagen từ da cá, nhưng các nghiên cứu thủy phân collagen từ sữa là vô cùng ít ỏi. Mặt khác, chức năng của các sản phẩm thủy phân collagen tạo collagen peptide khác nhau vẫn chưa hoàn toàn rõ ràng và mối quan hệ giữa sự phân bố trọng lượng phân tử của sản phẩm thủy phân collagen và chức năng của chúng chưa được nghiên cứu nhiều.

Việc sử dụng enzyme alkaline protease tạo ra sản phẩm collagen có kích thước nhỏ hơn đã được chứng minh là có hiệu quả ở nhiều nghiên cứu trước đây. Theo [85], chủng *Aspergillus niger* LCF 9 có khả năng tổng hợp một loại alkaline proteinase mới có hoạt tính collagenase cao. Các thử nghiệm được thực hiện trên 9 loại collagen thương mại đã cho thấy enzyme này có thể thủy phân chuỗi collagen mà không giải phóng axit amin và giải phóng các peptide trọng lượng phân tử rất thấp, do đó rất tiềm năng được sử dụng trong thủy phân collagen tạo collagen peptide ứng dụng trong điều trị bệnh.

Nghiên cứu [86] đã thử nghiệm so sánh hiệu quả thủy phân collagen ở cá vảy nước ngọt của một số loại enzyme protease bao gồm: trypsin, protease trung tính, papain và alkaline protease. Kết quả cho thấy, trong số các loại protease được lựa chọn, alkaline protease là enzyme hiệu quả nhất để chiết xuất gelatin bằng cách thủy phân collagen vảy cá. Các điều kiện thủy phân tối ưu như sau: thời gian chiết 6h; nhiệt độ, 50°C; độ pH 9 và hàm lượng enzyme, 3% (w/w). Dưới những điều kiện thủy phân tối ưu này, sản lượng gelatin đạt được là 48,1 % (w/w). Gelatin được điều chế bằng thủy phân protease kiềm cho thấy hoạt tính nhũ tương cao hơn và chỉ số ổn định nhũ tương thấp hơn so với gelatin được điều chế bằng phương pháp chiết xuất khác.

Theo [64], collagen peptide có khả năng làm giảm đáng kể huyết áp. Tuy nhiên, thành phần dinh dưỡng tổng thể đã bị thay đổi. Do đó, hàm lượng của các peptide thu được sau quá trình thủy phân là rất quan trọng. Peptide mạch dài thể hiện hoạt tính hạ huyết áp yếu hơn so với peptide mạch ngắn. Khối lượng phân tử collagen tối thiểu để có tác động đến huyết áp dường như nằm trong khoảng từ 900 đến 1.900 Da. Đặc biệt, sự phân bố trọng lượng phân tử dưới 1.000 Da đã được chứng minh là yếu tố quyết định. Trên đối tượng là da cá tuyết Đại Tây Dương (*Gadus morrhua*), Huo và cộng sự (2009) đã xây dựng được quy trình tối ưu để thủy phân collagen và xác định được sự phân bố trọng lượng phân tử của các sản phẩm thủy phân. Theo đó, alkaline protease được bổ sung sau khi thu được dịch chiết collagen và trong 3 giờ ở nhiệt độ (50°C), pH (10,0), nồng độ cơ chất (75 g/L) và hàm lượng enzyme: cơ chất (3%). Các sản phẩm thu được có thể có trọng lượng phân tử chỉ từ 300-1500Da, phần lớn dưới 1200Da.

Cụ thể là enzyme alkaline protease phân cắt các vùng liên kết chéo telopeptide do đó giúp tạo ra sản phẩm protein ít hoặc không liên kết và tăng

độ tinh khiết của sản phẩm collagen [59]. Do collagen bị phân cắt tạo sản phẩm có kích thước nhỏ hơn nên qua quá trình thu hồi bị hao hụt nhiều hơn dẫn đến hiệu suất thu giảm đáng kể. Trong nghiên cứu này, tuy hiệu suất tách chiết không tăng (Bảng 3.7.) nhưng sản phẩm collagen (peptide hoặc phân tử) có khả năng tinh khiết hơn hay giảm tạp chất cũng như giảm tính kháng nguyên do telopeptide gây ra, điều này cũng đã được nhận định và đã được chứng minh [29] [25] [63]. Giá trị sinh học của các peptide khác nhau tùy thuộc vào quá trình chế biến, xử lý nhiệt, enzyme được sử dụng và điều kiện thủy phân bằng enzyme. Có thể thu được nhiều loại sản phẩm thủy phân collagen trong các điều kiện của quá trình thủy phân khác nhau, nhưng tính khả dụng sinh học của các sản phẩm thủy phân này không rõ ràng. Do đó, việc xác định sự phân bố trọng lượng phân tử của collagen peptide là hết sức cần thiết, nhằm đánh giá cả về hiệu quả kinh tế và khả năng ứng dụng của các sản phẩm, từ đó lựa chọn quy trình công nghệ phù hợp để định hướng các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo.

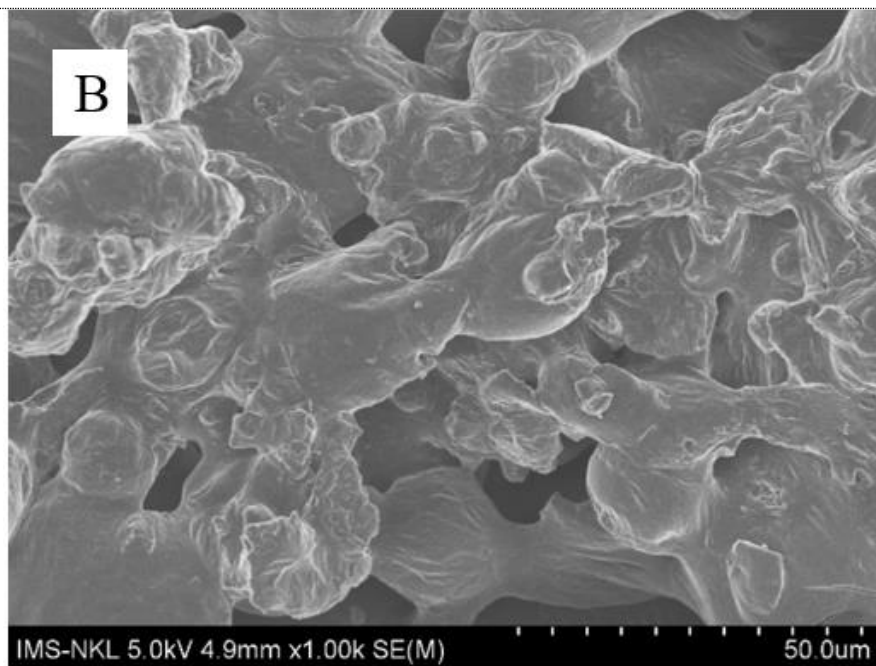
3.3.2. Đặc điểm sản phẩm collagen peptide dưới kính hiển vi quét (SEM)

Hai mẫu bột collagen sữa thu được từ quy trình có bổ sung bước phân cắt tạo collagen phân tử được tinh sạch và quan sát, chụp ảnh ở mức độ phóng đại dưới kính hiển vi quét – SEM (Hitachi S-4800). Kết quả quan sát được thể hiện trên Hình 3.7 và Hình 3.8.

Hình 3.7. và 3.8. cho thấy hình ảnh bột collagen phân tử dưới kính hiển vi điện tử quét. Ở thước 200 μm (Hình 3.8.B) và thước 100 μm (Hình 3.8.A) có thể thấy sản phẩm thu được phần lớn có dạng hình cầu kích thước 20-30 μm . Tuy nhiên, quan sát chi tiết hơn ở thước 50 μm (Hình 3.7.A, 3.7.B) quan sát được hình dạng của các tiểu phần chưa có sự đặc thù rõ ràng và thiếu sự đồng đều. Các tiểu phần có xu hướng bị kết tập thành các đám tiểu phần lớn hơn.

So sánh hai quy trình có thể thấy, với sản phẩm collagen từ quy trình chỉ sử dụng enzyme pepsin thông thường bột collagen có kết cấu lớn dạng lỗ xốp, độ phóng đại lớn hơn vẫn thấy các kết cấu dạng mảng nhưng liên kết chặt chẽ với nhau tạo thành cấu trúc tương đối đồng đều. Nhưng với quy trình bổ sung thêm một bước thủy phân nữa với enzyme alkaline protease, phân tử collagen đã bị phân cắt nhỏ hơn tạo sản phẩm hình cầu và kết cấu rời rạc và ít đồng nhất hơn.

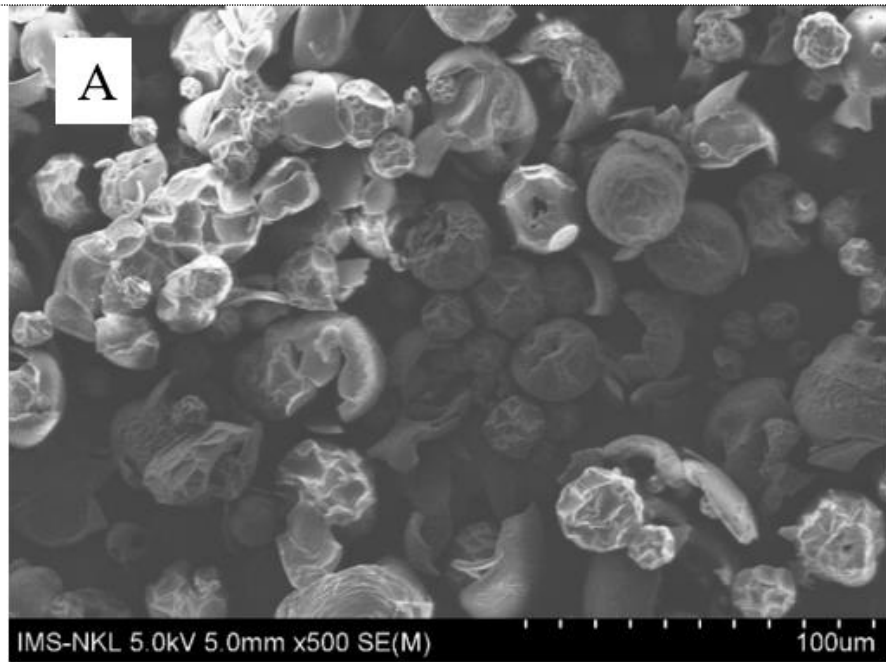
Hình ảnh SEM



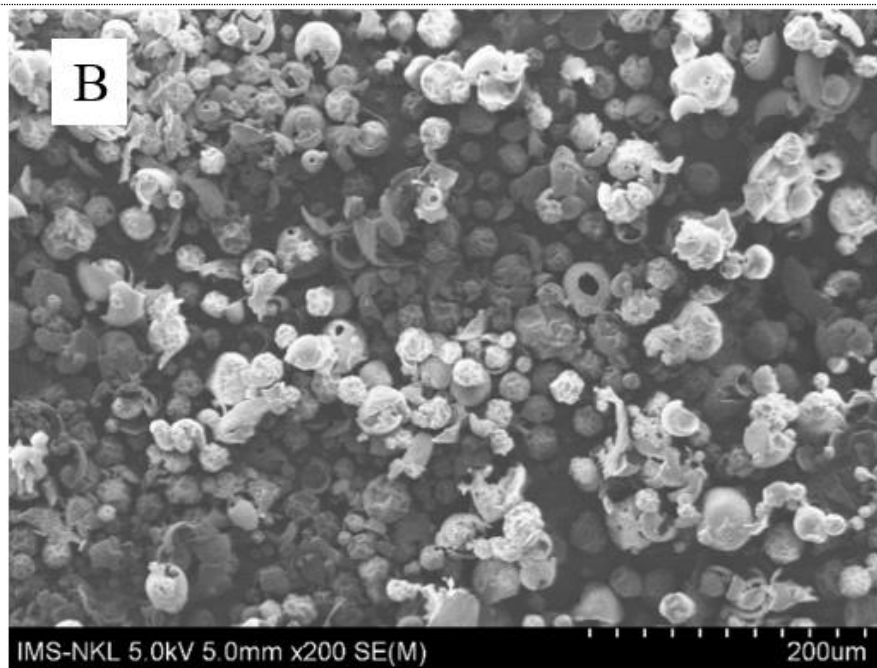
- Độ phóng đại: thước 50μm
- Các tiểu phân trong hệ collagen 1 có dạng hình cầu
- Phần lớn các tiểu phân bị kết tập vào nhau (aggregation) tạo thành các đám tiểu phân có kích thước lớn.

Hình 3.7. Ảnh chụp SEM của mẫu collagen 1

Hình ảnh SEM



- Độ phóng đại: thước 100 μ m



- Độ phóng đại: thước 200 μ m

- Các tiểu phân trong mẫu collagen 2 có dạng hình cầu

- Kích thước tiểu phân trong khoảng 20-30 μ m

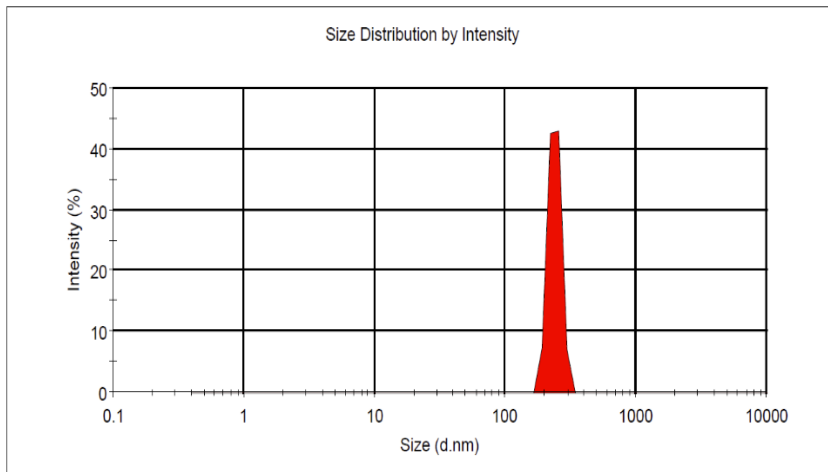
Hình 3.8. Ảnh chụp SEM của mẫu collagen 2

3.3.3. Đặc điểm phân bố kích thước hạt collagen peptide

Khi sử dụng cùng loại enzyme nhưng ở các điều kiện khác nhau có thể thu các sản phẩm thủy phân collagen khác nhau và hoạt động sinh lý của các sản phẩm thủy phân này cũng khác biệt. Vì vậy, điều quan trọng là phải tìm hiểu sự phân bố trọng lượng phân tử của các collagen thủy phân để nghiên cứu tính khả dụng sinh học của chúng [64]

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 1288	Peak 1: 238.2	100.0	25.71
PdI: 0.835	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.552	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

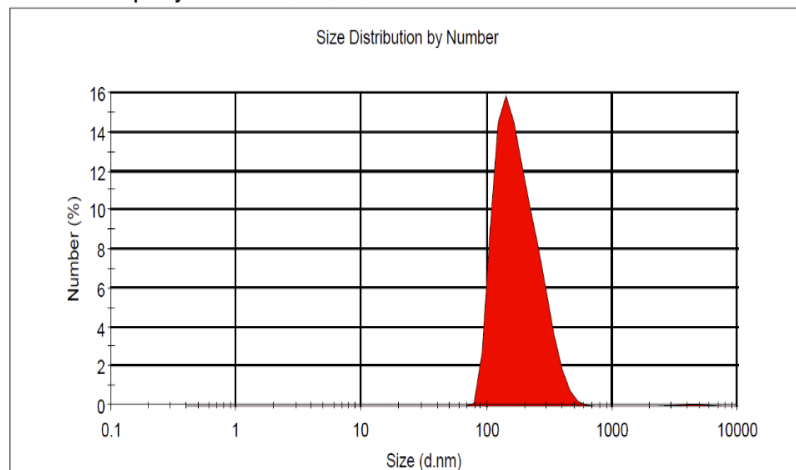
Result quality : **Refer to quality report**



Hình 3.9. Phân bố kích thước của hệ collagen 1

	Size (d.nm):	% Number	Width (d.nm...)
Z-Average (d.nm): 1188	Peak 1: 4243	0.3	1014
PdI: 0.954	Peak 2: 185.4	99.7	75.37
Intercept: 0.143	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : **Refer to quality report**



Hình 3.10. Phân bố kích thước của hệ collagen 2

Phương pháp DLS được sử dụng để kiểm tra đặc điểm phân bố kích thước hạt collagen phân tử. Hai mẫu bột collagen phân tử được thực hiện độc lập thu được kết quả như Hình 3.9. và 3.10.

Kết quả kiểm tra đặc điểm phân bố kích thước của hạt collagen phân tử thu được cho thấy cả 2 mẫu collagen phân tán rất tốt trong nước. Hình 3.9. và 3.10. cho thấy dựa trên cường độ tán xạ, kích thước hạt trung bình của mẫu collagen 1 là 1288nm trong khi dựa trên sự phân bố theo số lượng kích thước trung bình mẫu collagen 2 nhỏ hơn một chút là 1188nm. Điều này hoàn toàn dễ hiểu bởi phân bố kích thước theo độ tán xạ làm nổi bật các hạt có kích thước lớn hơn trong hệ trong khi phân bố theo số lượng làm nổi bật các hạt có kích thước nhỏ hơn. Tuy nhiên, độ phân bố kích thước mẫu vẫn còn tương đối rộng thể hiện hỗn hợp các collagen peptide thu được có nhiều kích thước khác nhau.

Mặt khác, kích thước trung bình các hạt thu được bằng phương pháp DLS nhỏ hơn rất nhiều kích thước quan sát được trên ảnh hiển vi điện tử quét (15 - 35 μm). Điều này được giải thích là do sự khác nhau về trạng thái tồn tại của hạt nano trong hai phương pháp phân tích. Đối với phương pháp FESEM, mẫu được chụp ở trạng thái khô, khi đó, các phân tử collagen sẽ tồn tại ở trạng thái chặt chẽ hơn, có khả năng kết dính giữa các hạt tạo thành các cụm hạt và dưới kính hiển vi sẽ quan sát thành các cụm hạt với kích thước lớn hơn. Trong khi đó, đối với phương pháp DLS, các tiểu phân tồn tại trong môi trường nước, các phân tử được phân tán tách rời, làm cho bán kính động học của hạt sẽ nhỏ hơn rất nhiều.

KẾT LUẬN

- Enzyme pepsin bổ sung vào quy trình tách collagen từ sứa *R. hispidum* đạt hiệu quả cao ở nồng độ pepsin 0,1%; tỷ lệ khối lượng sứa: dung môi enzyme là 1:3 và thời gian thủy phân là 24h.
- Đặc điểm thành phần axit amin, cấu trúc hình thái phân tử (SEM), phổ FTIR, thành phần dinh dưỡng của sản phẩm collagen có chất lượng tương đương và tốt hơn so với collagen tách chiết từ một số nguồn nguyên liệu khác.
- Enzyme alkaline protease phân cắt collagen tạo ra sản phẩm collagen peptide có kích thước nhỏ hơn (trung bình 1188-1288nm), có khả năng tan tốt trong nước và có tiềm năng cho phát triển ứng dụng vào đời sống.

KIẾN NGHỊ

Cần tiếp tục thử nghiệm thêm các điều kiện dùng enzyme ankaline protease phân cắt collagen để xây dựng hoàn thiện quy trình tạo collagen peptide có chất lượng và hiệu suất cao.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nishikawa, J., Thu, N. T., Ha, T. M., & Thu, P. T., Jellyfish fisheries in northern Vietnam, *Plankton and Benthos Research*, vol. 3, p. 227–234, 2008.
- [2] N. D. Thao, Nghiên cứu, đánh giá nguồn lợi sứa vùng ven biển Việt Nam, đề xuất giải pháp khai thác và bảo vệ, Bộ Nông Nghiệp và Phát triển Nông thôn, Hà Nội, 2011.
- [3] Avila Rodríguez, M. I., Rodríguez Barroso, L. G., & Sánchez, M. L., Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications, *Journal of cosmetic dermatology*, vol. 17, pp. 20-26, 2018.
- [4] Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., & Berthod, F., Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications, *Materials*, vol. 3, 2010.
- [5] Khong, N. M. H., Yusoff, F. M., Jamilah, B., Basri, M., Maznah, I., Chan, K. W., ... Nishikawa, J., Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes, *Food Chemistry*, vol. 251, pp. 41-50, 2018.
- [6] Senaratne, L. S., Park, P.-J., & Kim, S.K., Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin, *Bioresource technology*, vol. 97, pp. 191-197, 2006.
- [7] T. M. Hà, Nghiên cứu công nghệ ứng dụng enzyme trong sản xuất collagen từ nguồn lợi sứa biển Việt Nam, Bộ Công thương, Hà Nội, 2020.
- [8] Addad, S., Exposito, J.-Y., Faye, C., Ricard-Blum, S., & Lethias, C., Isolation, characterization and biological evaluation of jellyfish collagen for use in biomedical applications, *Marine Drugs*, vol. 9, pp. 967-983, 2011.
- [9] Lee, J. K., Kang, S. I., Kim, Y. J., Kim, M. J., Heu, M. S., Choi, B. D., & Kim, J. S., Marine Collagen as A Promising Biomaterial for Biomedical Application, *Marine drugs*, vol. 17, p. 467, 2019.

- [10] Gelse, K. , Pöschl, E., & Aigner, T., Collagens--structure, function, and biosynthesis, *Advanced drug delivery reviews*, vol. 55, pp. 1531-1546, 2003.
- [11] Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Shahidi, F., Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus* bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus*, *LWT - Food Science and Technology*, vol. 43, pp. 792-800, 2010.
- [12] Pati, F., Adhikari, B., & Dhara, S., Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability, *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 3737-3742, 2010.
- [13] Silva, T. H., Moreira-Silva, J., Marques, A. L. P, Domingues, A., Bayon, Y., & Reis, R. L., Marine origin collagens and its potential applications, *Marine Drugs*, vol. 12, 2014.
- [14] Balasubramanian, P., Prabhakaran, M. P., Sireesha, M., & Ramakrishna, S., Collagen in Human Tissues: Structure, Function, and Biomedical Implications from a Tissue Engineering Perspective BT - Polymer Composites – Polyolefin Fractionation – Polymeric Peptidomimetics – Collagens, A. A. e. al., Red., Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 173-206.
- [15] Nagai, T., Worawattanamateekul, W., Suzuki, N., Nakamura, T., Ito, T., Fujiki, K., ... Yano, T., Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish (*Rhopilema asamushi*), *Food Chemistry*, vol. 70, pp. 205-208, 2000.
- [16] Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X., & Konno, K., Properties of Collagen from skin, scale and bone of Carp (*Cyprinus carpio*), *Food Chemistry*, vol. 112, pp. 702-706, 2009.
- [17] Khan, S. B., Qian, Z.J., Ryu, B., & Kim, S.K., Isolation and biochemical characterization of collagens from seaweed pipefish, *Syngnathus schlegeli*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 14, pp. 436-442, 2009.

- [18] Nagai, N., Araki, Y., & Suzuki, N., Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*), *Food chemistry*, vol. 78, 2002.
- [19] Minh Thuy, L. T., Okazaki, E., & Osako, K., Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam, *Food chemistry*, vol. 149, p. 264–270, 2014.
- [20] Jeong, H.S., Venkatesan, J., & Kim, S.K., Isolation and Characterization of Collagen from Marine Fish (*Thunnus obesus*), *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 18, pp. 1185-1191, 2013.
- [21] Shanmugam, A. V., Ramasamy, P., Subhadrappa, N., & Sadhasivam, S., Extraction, structural and physical characterization of type I collagen from the outer skin of *Sepiella inermis* (Orbigny, 1848), *African journal of biotechnology*, vol. 11, pp. 14326-14337, 2012.
- [22] Nagai, T., Ogawa, T., Nakamura, T., Ito, T., Nakagawa, H., Fujiki, K., ... Yano, T., Collagen of edible jellyfish exumbrella, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 79, pp. 855-858, 1999.
- [23] Barzideh, Z., Latiff, A. A., Gan, C.-Y., Benjakul, S., & Karim, A. A., Isolation and characterisation of collagen from the ribbon jellyfish (*Chrysaora* sp.), *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 49, pp. 1490-1499, 2014.
- [24] Boute, N., Exposito, J.-Y., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Noro, N., Miyazaki, K., & Garrone, R., Type IV collagen in sponges, the missing link in basement membrane ubiquity, *Biology of the cell*, vol. 88, pp. 37-44, 1996.
- [25] Lin, Y.K. & Liu, D.C., Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet, *Food Chemistry*, vol. 94, pp. 621-625, 2006.
- [26] Swatschek, D., Schatton, W., Kellermann, J., Müller, W. E. ., & Kreuter, J., Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik*, vol. 53, pp. 107-113, 2002.

- [27] Browne, S., Zeugolis, D. I., & Pandit, A., Collagen: finding a solution for the source, *Tissue engineering*, vol. A, nr. 19, pp. 1491-1494, 2013.
- [28] Xu, C., Su, P., Chen, X., Meng, Y., Yu, W., Xiang, A. P., & Wang, Y., Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic Bioglass-Collagen-Phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, vol. 32, pp. 1051-1058, 2011.
- [29] Cao, H. & Xu, S.Y., Purification and characterization of type II collagen from chick sternal cartilage, *Food chemistry*, vol. 108, pp. 439-445, 2008.
- [30] R. Moskowitz, Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease, *Seminars in arthritis and rheumatism*, vol. 30, pp. 87-99, 2000.
- [31] Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C., Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid, *Food Chemistry*, vol. 114, pp. 976-983, 2009.
- [32] Chattopadhyay, S. & Raines, R.T., Collagen-Based Biomaterials for Wound Healing, *Biopolymers*, vol. 101, pp. 821-833, 2014.
- [33] You, K., Ma, C., Gao, H., Li, F., Zhang, M., Qiu, Y., & Wang, B., Research on the jellyfish (*Rhopilema esculentum* Kishinouye) and associated aquaculture techniques in China: Current status, *Aquaculture International*, vol. 15, pp. 479-488, 2007.
- [34] Zhuang, Y., Zhao, X., & Li, B., Optimization of antioxidant activity by response surface methodology in hydrolysates of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) umbrella collagen, *Journal of Zhejiang University. Science*, vol. 10, nr. B, pp. 572-579, 2009.
- [35] E. Adams, Invertebrate collagens, *Science (New York, N.Y.)*, vol. 202, pp. 591-598, 1978.
- [36] Salerno, A., Guarnieri, D., Iannone, M., Zeppetelli, S., Di Maio, E., Iannace, S., & Netti, P. A., Engineered μ -bimodal poly(ϵ -caprolactone) porous scaffold for enhanced hMSC colonization and proliferation., *Acta Biomaterialia*, vol. 5, pp. 1082-1093, 2009.
- [37] Hayashi, Y., Ikeda, T., Yamada, S., Koyama, Z., & Yanagiguchi, K. , The Application of Fish Collagen to Dental and Hard Tissue Regenerative

- Medicine, *Seafood Processing By-Products: Trends and Applications*, pp. 455-462, 2013.
- [38] Divya, P. V & Nandakumar, K., Local drug delivery - Periocol in periodontics, *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, vol. 19, pp. 74-80, 2006.
- [39] Panwar, M. & Gupta, S.H., Local Drug Delivery with Tetracycline Fiber : An Alternative to Surgical Periodontal Therapy, *Medical journal, Armed Forces India*, vol. 65, pp. 244-246, 2009.
- [40] Tang, C., Zhou, K., Zhua, Y., Zhang, W., Xie, Y., Wang, Z., Zhou, H., Yang, T., Zhang, Q. & Xua, B., Collagen and its derivatives: From structure and properties to their applications in food industry, *Food Hydrocolloids*, vol. 131, p. 107748, 2022.
- [41] Zhuang, Y., Sun, L.P., Zhao, X., & Li, B., Investigation of gelatin polypeptides of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) for their antioxidant activity in vitro, *Food Technology and Biotechnology*, vol. 48, pp. 222-228, 2010.
- [42] Xiang, L., & Cui, W., Biomedical application of photo-crosslinked gelatin hydrogels, *Journal of Leather Science and Engineering*, vol. 3, nr. 1, 2021.
- [43] P. Berillis, Marine Collagen: Extraction and Applications. Research Trends in Biochemistry, *Molecular Biology and Microbiology*, pp. 1-13, 2015.
- [44] Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M., Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*), *Food Chemistry*, vol. 93, pp. 475-484, 2005.
- [45] Ogawa, M., Portier, R. J., Moody, M. W., Bell, J., Schexnayder, M. A., & Losso, J. N., Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*PogoniaCromis*) and sheepshead sea bream (*Archosargus probatocephalus*), *Food Chemistry*, vol. 88, pp. 495-501, 2004.

- [46] Song, E., Yeon Kim, S., Chun, T., Byun, H.-J., & Lee, Y. M., Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility, *Biomaterials*, vol. 27, pp. 2951-2961, 2006.
- [47] Hackett, C., Grim, B. J., Stonawski, M., Skirbekk, V., Potančoková, M., & Abel, G., A Report on the Size and Distribution of the World's Major Religious Groups as of 2010, The Global Religious Landscape, Pewresearch center, 2012.
- [48] Heu, M. S., Lee, J. H., Kim, H. J., Jee, S. J., Lee, J. S., Jeon, Y.-J., ... Kim, J.-S., Characterization of Acid- and Pepsin-soluble Collagens from Flatfish Skin, *Food Science and Biotechnology*, vol. 19, pp. 27-33, 2010.
- [49] Sadowska, M., Kołodziejska, I., & Niecikowska, C., Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*), *Food Chemistry*, vol. 81, pp. 257-262, 2003.
- [50] León-López, A., Morales-Peñaloza, A., Martínez-Juárez, V. M., Vargas-Torres, A., Zeugolis, D. I., & Aguirre-Álvarez, G., Hydrolyzed Collagen-Sources and Applications, *Molecules*, vol. 24, nr. 22, p. 4031, 2019.
- [51] Sanchez A., Blanco M., Correa B., Perez-Martin R., Sotelo C., Effect of fish collagen hydrolysates on type I collagen mRNA levels of human dermal fibroblast culture, *Mar. Drugs*, vol. 16, nr. 144, 2018.
- [52] Villamil O., Váquiro H., & Solanilla J.F., Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties, *Food Chem*, vol. 224, pp. 160-171, 2017.
- [53] Sabeena Farvin K.H., Andersen L.L., Otte J., Nielsen H.H., Jessen F., & Jacobsen C. , Antioxidant activity of cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: Fractionation and characterisation of peptide fractions, *Food Chem*, vol. 204, p. 409–419, 2016.
- [54] Chen J., Li L., Yi R., Gao R., & He J., Release kinetics of Tilapia scale collagen I peptides during tryptic hydrolysis, *Food Hydrocoll*, vol. 77, p. 931–936, 2018.

- [55] Ahmed R., & Chun B.-S., Subcritical water hydrolysis for the production of bioactive peptides from tuna skin collagen, *J. Supercrit. Fluids*, vol. 141, p. 88–96, 2018.
- [56] Zavareze, E. da R., Silva, C. M., Salas-Mellado, M., & Prentice-Hernández, C., Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas, *Química Nova*, vol. 32, 2009.
- [57] Martins, V. G., Costa, J. A. V., & Prentice-Hernández, C., Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina, *Química Nova - QUIM NOVA*, vol. 32, 2009.
- [58] Ran, X.-G. & Wang, L.-Y., Use of Ultrasonic and Pepsin Treatment in Tandem for Collagen Extraction from Meat industry by-products, *Journal of the science of food and agriculture*, vol. 94, 2014.
- [59] Zhang, M., Liu, W., & Li, G., Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*), *Food Chemistry*, vol. 115, pp. 826-831, 2009.
- [60] 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.
- [61] Żelechowska, E., Sadowska, M., & Turk, M. Żelechowska, E., Sadowska, M., & Turk, M., Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*), *Food Hydrocolloids*, vol. 24, pp. 325-329, 2010.
- [62] M. Y. B. J. B. M. I. M. & K. M. Fatimah, A method for extracting collagen from aquatic animals, collagen and products containing it. USA Patent WO2015012682A2, 2013.
- [63] Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. & Kubota, E. H., Collagen extraction process, *International Food Research Journal*, vol. 23, pp. 913-922, 2016.
- [64] HUO, J., & ZHAO, Z. , Study on Enzymatic Hydrolysis of *Gadus morhua* Skin Collagen and Molecular Weight Distribution of

- Hydrolysates, *Agricultural Sciences in China*, vol. 8, nr. 6, pp. 723-729, 2009.
- [65] Felician, F. F., Yu, R.-H., Li, M.-Z., Li, C.-J., Chen, H.-Q., Jiang, Y., ... Xu, H.-M. , The wound healing potential of collagen peptides derived from the jellyfish *Rhopilema esculentum*, *Chinese Journal of Traumatology*, vol. 22, pp. 12-20, 2019.
- [66] U. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, vol. 227, pp. 680-685, 1970.
- [67] Tran Thi Hai Yen, Le Thi Huyen, Tran Hong Nhung, Le Thi Thu Trang, Pham Thi Minh Hue, Impact of Sample Concentration on the Determination of Particle Size of Nano Polymer Particles and Nano Liposomes by Dynamic Light Scattering, *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, vol. 35, nr. 2, 2019.
- [68] Hsieh, Y. H. P., Leong F., & Rudloe, J., Jellyfish as food, *Hydrobiologia*, vol. 451, pp. 11-17, 2001.
- [69] Wahyuningsih, R., Rusman, Nurliyani, Pertiwinigrum, A., Rohman, A., Fitriyanto, N. A., & Erwanto, Y., Optimization of Conditions for Extraction of Pepsin-Soluble Collagen from Indonesian Local “Kacang” Goatskin by Response Surface Methodology, *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, vol. 13, nr. 2, pp. 70-75, 2018.
- [70] Wang, L., 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 & Emerging Technologies*, vol. 9, nr. 4, pp. 604-607, 2008.
- [71] Pal, G. K., Nidheesh, T., & Suresh, P. V. , Comparative study on characteristics and in vitro fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*), *Food Research International*, vol. 76, nr. 3, pp. 804-812, 2015.
- [72] Benedetto, C., Barbaglio, A., Martinello, T., Alongi, V., Fassini, D., Cullorà, E., ... Sugni, M., Production, Characterization and Biocompatibility of Marine Collagen Matrices from an Alternative and

Sustainable Source: The Sea Urchin *Paracentrotus lividus*, *Marine Drugs*, vol. 12, nr. 9, pp. 4912-4933, 2014.

- [73] Tan, C. C., Karim, A. A., Latiff, A. A., Gan, C. Y., & Gan, C. Y. , Extraction and characterization of pepsin-solubilized collagen from the body wall of crown-of-thorns Starfish (*Acanthaster planci*), *International Food Research Journal* , vol. 20, nr. 6, pp. 3013-3020, 2013.
- [74] Delphi, L., Sepehri, H., Motevaseli, E., & Khorramizadeh, M. R., Collagen Extracted from Persian Gulf Squid Exhibits Anti-Cytotoxic Properties on Apple Pectic Treated Cells: Assessment in an In Vitro Bioassay Model, *Iran J Public Health*, vol. 45, nr. 8, pp. 1054-1063, 2016.
- [75] Wang, L., An, X., Xin, Z., Zhao, L., & Hu, Q. , Isolation and Characterization of Collagen from the Skin of Deep-Sea Redfish (*Sebastes mentella*), *Journal of Food Science*, vol. 72, nr. 8, pp. E450-E455, 2007.
- [76] Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., & Mann, S., Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*, *International journal of biological macromolecules*, vol. 32, pp. 199-204, 2003.
- [77] Miura, S. & Kimura, S., Jellyfish mesogloea collagen: Characterization of molecules as $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ heterotrimers, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 260, pp. 15352-15356, 1985.
- [78] Kimura, S., Miura, S., & Park, Y.H., Collagen as the Major Edible Component of Jellyfish (*Stomolophus nomural*), *Journal of Food Science*, vol. 48, pp. 1758-1760, 1983.
- [79] Mizuta, S., Hwang, J., & Yoshinaka, R., Molecular species of collagen from wing muscle of skate (*Raja kenoei*), *Food Chemistry*, vol. 76, p. 53–58, 2002.
- [80] Foegeding, E.A., Lanier, T.C., & Hultin, H.O., Characteristics of edible Muscle Tissues, *Food Chemistry*, pp. 902-906, 1996.

- [81] Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A., & Hara, K., Biochemical properties of acid-soluble collagen extracted from the skins of underutilised fishes, *Food Chemistry*, vol. 108, pp. 49-54, 2008.
- [82] Akram, A.N. & Zhang, C., Extraction of collagen-II with pepsin and ultrasound treatment from chicken sternal cartilage; physicochemical and functional properties, *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 64, 2020.
- [83] Lee, J. K., Kang, S. I., Kim, Y. J., Kim, M. J., Heu, M. S., Choi, B. D., & Kim, J.-S., Comparison of collagen characteristics of sea- and freshwater-rainbow trout skin, *Food Science and Biotechnology*, vol. 25, pp. 131-136, 2016.
- [84] Khiari, Z., Rico, D., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C., Comparison between gelatines extracted from mackerel and blue whiting bones after different pre-treatments, *Food Chemistry*, vol. 139, pp. 347-354, 2013.
- [85] Barthomeuf, C., Pourrat, H., & Pourrat, A. , Collagenolytic activity of a new semi-alkaline protease from *Aspergillus niger*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 73, nr. 3, pp. 233-236, 1992.
- [86] L. Jiang, Preparation of Fish-scale Gelatins by Mild Hydrolysis and Their Characterization, *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 21, pp. 564-567, 2013.
- [87] Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., & Kishimura, H., Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), *Food Chemistry*, vol. 124, nr. 1, pp. 97-105, 2011.
- [88] Mizuta, S., Yoshinaka, R., Sato, M., & Sakaguchi, M., Characterization of Collagen in the Muscle of Several Crustacean Species in Association with Raw Meat Texture, *Fisheries science*, vol. 60, pp. 323-328, 1994.
- [89] Zhang, Y., Liu, W., Li, G., Shi, B., Miao, Y., & Wu, X., Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), *Food Chemistry*, vol. 103, p. 906–912, 2007.