Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ
Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học
ISSN 1859-2333 | e-ISSN 2815-5599

DOI:10.22144/ctujos.2024.430

NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT PROTEIN THỦY PHÂN TỪ GELATIN DA CÁ RÔ PHI (*Oreochromis niloticus*) BẰNG ENZYME THERMOASE GL30

Nguyễn Thị Như Hạ, Nguyễn Thị Thùy Trang và Lê Thị Minh Thuỷ*
Trường Thuỷ sản, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam
**Tác giả liên hệ (Corresponding author): ltmthuy@ctu.edu.vn*

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 27/02/2024
Sửa bài (Revised): 26/04/2024
Duyệt đăng (Accepted): 07/06/2024

Title: *Research on the extraction of hydrolysate protein from tilapia fish skin gelatin (Oreochromis niloticus) by using Thermoase GL30 enzyme*

Author(s): *Nguyen Thi Nhu Ha, Le Thi Minh Thuy* and Nguyen Thi Thuy Trang*

Affiliation(s): *College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University, Viet Nam*

TÓM TẮT

Nghiên cứu tách chiết protein thủy phân từ gelatin da cá rô phi được thực hiện nhằm xác định chế độ thủy phân gelatin bằng enzyme Thermoase GL30 để thu được protein thủy phân có chất lượng tốt. Bột gelatin được thủy phân bằng enzyme Thermoase GL30 nồng độ 0,3% ở 60°C trong 1 giờ, protein thủy phân thu được có độ nhớt, hiệu suất thu hồi và độ sáng lần lượt là 16,8 mPa.s; 96,4% và L= 93,1. Protein thủy phân từ gelatin da cá rô phi có hàm lượng amino acid kỵ nước là 596 đơn vị/1.000 đơn vị tương ứng với hoạt tính chống oxy hóa (DPPH) 73,2%. Bên cạnh đó, phổ FTIR cho thấy mối quan hệ chặt chẽ giữa số bước sóng trong vùng amide I và vùng amide III đặc biệt là sự ổn định của cấu trúc xoắn bậc ba. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể tận dụng da cá rô phi để sản xuất protein thủy phân chất lượng cao.*

Từ khóa: *Enzyme Thermoase GL30, gelatin da cá rô phi, hoạt tính chống oxy hóa, phổ FTIR, protein thủy phân*

ABSTRACT

Research on the extraction of protein hydrolysate from tilapia fish skin gelatin was investigated to determine the production process for the gelatin hydrolysis by Thermoase GL30 enzyme to obtain the highest quality of protein hydrolysate. Gelatin powder was hydrolyzed with 0.3% Thermoase GL30 enzyme at 60°C for 1 hour to collect the protein hydrolysate products with viscosity, recovery yield, and color were 16.8 mPa.s; 96.4% and L= 93.1, respectively. The protein hydrolysate from tilapia fish skin had hydrophobic amino acid of 596 residue/1.000 residues and showed a correlation with the highest antioxidant activity (DPPH) 73.2%. Besides, FTIR spectra showed a close relationship between wavelength numbers in the amide I and amide III regions, especially the stability of the triple helix structure. The results showed that tilapia fish skin could be used to produce high quality hydrolyzed protein.*

Keywords: *Antioxidant activity, FTIR spectroscopy, hydrolysate protein, Thermoase GL30 enzyme, tilapia fish skin gelatin*

1. GIỚI THIỆU

Cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) là một trong những loài cá nuôi quan trọng ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, đặc biệt gần đây cá rô phi được xem như nguồn thực phẩm của thế kỷ XXI (Prabu et al., 2019). Hiện nay, Việt Nam đứng vị trí thứ 8 trong bảng xếp hạng các quốc gia có sản lượng cá rô phi lớn của thế giới (Vietnam Agriculture, 2019). Diện tích nuôi cá rô phi ở Việt Nam trong năm 2020 ước tính đạt khoảng 33.000 ha, thể tích nuôi lồng bè trên sông và hồ chứa 1,5 triệu m^3, sản lượng 300.000 tấn (Vietfish Magazine, 2022**)**. Cá rô phi là nguồn thực phẩm giàu các chất dinh dưỡng, vitamin, khoáng chất và được chế biến các mặt hàng như cá rô phi đông lạnh, chả cá, surimi... Hơn 60% các sản phẩm phụ này bao gồm da, đầu, xương được loại ra trong quá trình chế biến (Tinrat & Sila-Asna, 2017). Trong đó, da cá rô phi là nguồn nguyên liệu tiềm năng để sản xuất protein thuỷ phân, góp phần nâng cao giá trị kinh tế cho nguồn phụ phẩm này.

Protein thủy phân trở thành một thành phần chức năng được ứng dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm và dược phẩm (Etemadian et al., 2021). Trong công nghiệp thực phẩm, công nghệ sản xuất các sản phẩm từ bơ và sữa protein thủy phân đóng vai trò quan trọng trong việc tạo độ căng mọng. Ngoài ra, trong các sản phẩm phomat, người ta bổ sung thêm hàm lượng protein thủy phân ngăn chặn sự mất nước (Bình & Hồng, 2018). Protein thủy phân cũng đã được thử nghiệm và bổ sung vào các loại thực phẩm khác nhau như bổ sung vào ngũ cốc, sản phẩm thịt và cá, các món tráng miệng hay bánh quy giòn (Kristinsson & Rasco, 2000). Trong y học và dược phẩm: Protein thủy phân được dùng như một chất kiểm soát huyết áp cao, chống đông máu, chống oxy hóa, chống ung thư và có tác động tích cực trong việc giảm nguy cơ mắc bệnh tim mạch, duy trì sức khỏe cơ thể và ngăn ngừa bệnh tật (Etemadian et al., 2021).

Quá trình thủy phân protein làm giảm kích thước peptide (Chalamaiah et al., 2012). Protein thủy phân là sản phẩm thu được sau quá trình thủy phân protein bằng việc sử dụng enzyme, acid hoặc kiềm (Pasupuleti et al., 2010). Quá trình thủy phân bằng enzyme phá vỡ protein bằng cách sử dụng các enzyme phân giải protein cụ thể để tạo ra các phần hòa tan và không hòa tan (Molla & Hovannisyan, 2011). Đã có một số nghiên cứu khoa học trước đây về sử dụng enzyme để sản xuất các sản phẩm protein thủy phân như: sử dụng enzyme Alcalase để thủy phân thu hồi sản phẩm protein từ da cá trắm cỏ (Wasswa et al., 2007); sử dụng enzyme Alcalase để thủy phân và thu hồi sản phẩm protein từ da cá lóc (Nguyen & Le, 2022); hay thủy phân phụ phẩm cá ngừ vây vàng bằng cách sử dụng enzyme Protamex (Nguyen et al., 2011). Tuy nhiên, chưa có bất kì nghiên cứu khoa học nào về việc sử dụng enzyme Theromoase GL30 để thủy phân gelatin và thu hồi sản phẩm protein thủy phân từ da cá rô phi. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm tận dụng được các nguồn phụ phẩm từ các nhà máy chế biến thủy sản để tạo ra các sản phẩm có giá trị kinh tế cao và góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tại phòng thí nghiệm của Khoa Khoa học và Công nghệ Chế biến Thuỷ sản – Trường Thuỷ sản, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Nguyên vật liệu thí nghiệm

Da cá rô phi được mua tại nhà máy chế biến thủy sản Huy Nam, tỉnh Kiên Giang, sau khi thu gom được cấp đông ở nhiệt độ -20°C ± 2°C và đóng thùng vận chuyển về phòng thí nghiệm thuộc Khoa Khoa học và Công nghệ Chế biến Thủy sản, Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ, thời gian vận chuyển không quá 6 giờ. Da cá được xử lý để loại các tạp chất, sau đó được rửa sạch để ráo nước, cắt nhỏ với kích thước 2 cm x 1 cm, đặt vào túi PE (100 g/túi) và được bảo quản trong tủ đông ở nhiệt độ -20°C ± 2°C.

Trước khi tiến hành thí nghiệm, da cá rô phi được rã đông ở nhiệt độ phòng trong khoảng 1 giờ và để ráo. Da cá được tiền xử lý bằng cách ngâm qua NaOH 0,1 M với tỷ lệ da cá: dung dịch (w/v) là 1/8 trong 1 giờ để loại nitơ phi protein, sau đó được rửa trung tính và ngâm trong butanol 10% với tỷ lệ 1/10 trong 24 giờ để loại lipid (Le & Nguyen, 2019). Kết thúc quá trình ngâm, mẫu được rửa bằng nước sạch nhiều lần cho đến khi đạt được pH trung tính. Sau đó, da được nấu chiết để thu hồi gelatin ở nhiệt độ 70°C trong 2 giờ, tỷ lệ nấu da cá: nước cất (w/v) là 1:7 (Huynh, 2022). Kết thúc quá trình nấu chiết, dung dịch gelatin thu được lọc qua 2 lớp vải lọc để thu lấy dịch chiết, dịch chiết được đem ly tâm với tốc độ 4.000 vòng trong 20 phút ở 20°C. Sau đó, mẫu được cấp đông tách nước (6 - 7 giờ), sấy ở nhiệt độ 60°C trong 12 giờ và nghiền mịn thu được bột gelatin. Gelatin thành phẩm thu được từ da cá rô phi có độ nhớt 17,2 mPa.s, độ hòa tan 95,7% và độ bền gel là 168g.

Thermoase GL30 là một chế phẩm protease, có nguồn gốc từ vi khuẩn *Geobacillus stearothermophilus*, được cung cấp bởi công ty Amano enzyme -Nhật Bản. Là một loại enzyme xúc

tác thủy phân protein nhiệt độ thích hợp ở 60 - 70°C, hoạt động ở pH ổn định 5,0 - 8,5 trong 1 - 3 giờ với hoạt tính 300.000 U/mL (Amano enzyme, Nhật Bản).

2.3. Bố trí thí nghiệm

2.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme Thermoase GL30 đến quá trình thủy phân gelatin từ da cá rô phi

Tiến hành thí nghiệm: Da cá rô phi được tiền xử lý nấu chiết gelatin như mô tả trong mục 2.2 để thu được bột gelatin. Sáu mươi gram bột gelatin da cá rô phi được hòa tan trong 1500 mL nước cất (Tkaczewska et al., 2020), khuấy bằng mấy khuấy từ ở nhiệt độ 60°C trong 30 phút. Sau đó, dung dịch gelatin hoà tan được tiến hành thủy phân bằng cách bổ sung enzyme Thermoase GL30 với 3 mốc nồng độ (0,1% , 0,3%, 0,5%) ở 60°C bằng bể điều nhiệt trong thời gian 1 giờ (Amano enzyme, Nhật Bản). Kết thúc quá trình thủy phân, mẫu được bất hoạt enzyme ở 95°C trong 5 phút, sau đó mẫu được đem đi ly tâm ở 4.000 vòng trong 15 phút ở 20°C và cấp đông 12 giờ. Mẫu thủy phân được sấy đông khô ở -40°C trong 48 giờ. Các mẫu thu được tiến hành phân tích độ nhớt (mPa.s), hoạt tính chống oxy hóa, đánh giá sự theo dõi màu sắc (L^*, a^*, b^*), cân để tính hiệu suất thu hồi. Từ đó, nồng độ enzyme thích hợp được chọn cho quá trình thủy phân gelatin từ da cá rô phi. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại, khối lượng mỗi mẫu 60 g.

2.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân bằng enzyme Thermoase GL30 đến chất lượng protein thủy phân từ da cá rô phi

Tiến hành thí nghiệm: Dung dịch gelatin được thủy phân bằng enzyme Thermoase GL30 ở nồng độ tốt nhất (kết quả thí nghiệm ở mục 2.3.1.), được tiếp tục thủy phân ở các mốc nhiệt độ (50°C, 60°C, 70°C) bằng bể điều nhiệt trong thời gian 1 giờ (Amano enzyme, Nhật Bản). Sau đó, mẫu được bất hoạt enzyme ở 95°C trong 5 phút. Kết thúc quá trình nấu, mẫu được ly tâm ở 4.000 vòng trong 15 phút, nhiệt độ 20°C và được cấp đông trong 12 giờ. Sau đó, mẫu được đem sấy đông khô trong 48 giờ và tiến hành phân tích các chỉ tiêu như: hiệu suất thu hồi, hoạt tính chống oxy hóa, độ nhớt và đánh giá sự theo dõi màu sắc (L^*, a^*, b^*). Từ kết quả phân tích, ta chọn ra nhiệt độ thuỷ phân thích hợp nhất để thu được protein thủy phân có chất lượng tốt nhất. Mẫu tối ưu được tiến hành phân tích quang phổ hồng ngoại FTIR và hàm lượng amino acid. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại, khối lượng mỗi mẫu 60 g.

2.4. Phương pháp phân tích

Xác định hàm lượng ẩm (%) bằng phương pháp sấy, hàm lượng protein (%) bằng phương pháp Kjeldahl, hàm lượng khoáng (%) bằng phương pháp đốt và hàm lượng lipid (%) bằng phương pháp Soxhlet (AOAC, 2000).

Xác định hiệu suất thu hồi (%) bằng phương pháp kiểm tra khối lượng, được tính theo công thức:

$$\text{HSTH}(\%)=\frac{\text{khối lượng sản phẩm}}{\text{khối lượng nguyên liệu}}x100.$$

Đo màu: 5g mẫu bột protein thủy phân được trải đều trên tờ giấy trắng sau đó tiến hành đo bằng thiết bị Colorimeter PCE-CSM 2 (Trung Quốc), các giá trị L^* (màu trắng đến màu đen), a^* (màu đỏ đến xanh lá cây) và b^* (màu vàng đến màu xanh da trời) được ghi nhận (Sae-leaw & Benjakul, 2015). Sự chênh lệch màu sắc (ΔE^*) được tính bằng công thức như sau: $\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$. Trong đó: ΔL^*, Δa^* và Δb^* là sự khác biệt giữa tham số màu tương ứng của mẫu và của chuẩn trắng.

Đo độ nhớt (mPa.s): hòa tan bột protein thủy phân trong nước cất ở nhiệt độ 60°C trong 10 phút, nồng độ 6,67%. Máy đo độ nhớt Brookfield DV (RVDV-11CP, Mỹ) được sử dụng. Tốc độ vòng quay của đĩa là 100 rpm và nhiệt độ môi trường duy trì ở 7 ± 1°C (sử dụng nước đá) trong suốt quá trình đo độ nhớt, thể tích dung dịch cho mỗi lần đo 5 mL. Dữ liệu thu được là trung bình của ba lần đo (Jamilah et al., 2011).

Quang phổ hồng ngoại (phổ FTIR) của mẫu protein thủy phân tối ưu được thu thập bằng Bruker chế độ ALPHA. Dữ liệu được thực hiện bởi chương trình phần mềm OPUS 7,5 (Bruker, Ettingen, Đức). Quang phổ được ghi nhận từ máy quang phổ 5ALPHA FT-IR của Bruker Optics phạm vi bước sóng từ 4.000 đến 400 cm^{-1} (Thuy et al., 2014).

Hoạt tính chống oxy hoá: đo bằng phương pháp DPPH, hút 2 mL dung dịch protein thuỷ phân (10 mg/mL) phối trộn với 1,5 mL dung dịch DPPH (0,2 mM) trong ethanol 95%, lắc đều. Sau đó ủ tối 30 phút độ hấp thụ của hỗn hợp được đo ở bước sóng 517 nm (Wu et al., 2003) với một số điều chỉnh phù hợp. Hoạt tính oxy hóa được tính theo công thức: $DPPH\ (\%) = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \times 100$ với A_{blank} là mẫu đối chứng, A_{sample} là mẫu protein thủy phân với DPPH.

Thành phần amino acid: 100 mg protein thủy phân được hòa tan trong dung dịch oxy hóa ủ lạnh 16 giờ ở 0°C. Sau đó thêm $Na_2S_2O_5$ vào dung dịch

tiến hành nung ở 110°C trong 23 giờ. Kết thúc quá trình nung, mẫu được thêm vào hệ thống phân tích amino acid (Biochrom 32+, USA) để phân tích amino acid (Thuy et al., 2022).

2.5. Xử lý số liệu

Số liệu thu thập được tính trung bình ± độ lệch chuẩn, sử dụng chương trình Microsoft Excel 2013. Sự khác biệt của các yếu tố giữa các nghiệm thức được phân tích bằng ANOVA một nhân tố với mức ý nghĩa 95% và phép thử Duncan ($p < 0,05$) bằng chương trình SPSS 20.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần hóa học của da cá rô phi

Việc hiểu rõ bản chất nguồn nguyên liệu giúp đề xuất cũng như định hướng các phương thức xử lý, chế biến sản phẩm phù hợp một cách dễ dàng. Thành phần hóa học của nguyên liệu cũng ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng sau cùng của sản phẩm. Kết quả phân tích thành phần hóa học của da cá rô phi trước và sau khi tiền xử lý bằng NaOH 0,1M và butanol 10% bao gồm ẩm độ, protein, lipid và khoáng được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hóa học của da cá rô phi (tính theo căn bản khô)

Thành phần hóa học	Hàm lượng (%)	
	Da cá rô phi trước khi tiền xử lý	Da cá rô phi sau khi tiền xử lý
Protein	87,97±0,562	80,89±0,65
Lipid	7,63±0,149	5,07±0,13
Khoáng	4,54±0,326	4,62±0,39

Số liệu thống kê được trình bày dưới dạng trung bình độ±độ lệch chuẩn (n=3).

Các số liệu phân tích về thành phần hóa học của da cá rô phi (Bảng 1) cho thấy trong da cá ban đầu hàm lượng protein 87,97%, lipid 7,63% và khoáng là 4,54%. Để nâng cao chất lượng protein thủy phân thì quá trình tiền xử lý để loại các tạp chất không phải protein và khử lipid là một trong những bước rất quan trọng để nâng cao hiệu quả trích ly và chất lượng sản phẩm được đảm bảo tốt, bên cạnh đó lipid trong da cá cao dễ gây nên sự oxy hóa, ảnh hưởng đến mùi và màu sắc của sản phẩm (Sae-leaw et al., 2016). Kết quả Bảng 1 cho thấy hàm lượng protein trong da cá rô phi giảm từ 87,97 xuống còn 80,89% khi ngâm da cá rô phi trong dung dịch NaOH 0,1M với thời gian 1 giờ, bên cạnh đó thì hàm lượng lipid cũng giảm từ 7,63 xuống còn 5,07% khi ngâm da cá trong dung dịch butanol 10% trong 24 giờ.

Kết quả nghiên cứu trên cho thấy việc loại nitơ phi protein và loại lipid ra khỏi nguyên liệu phụ thuộc vào một số yếu tố như hàm lượng lipid trong nguyên liệu ban đầu, độ pH và độ nhớt của dung dịch ngâm nguyên liệu (Nolse & Undeland, 2009). Bên cạnh đó, việc tiền xử lý cũng giúp da cá trở nên trương nở giúp quá trình tách chiết proten thủy phân đạt hiệu quả cao và góp phần loại bỏ các thành phần không mong muốn nhằm nâng cao hiệu quả tách chiết và chất lượng sản phẩm protein thủy phân (Ahmad & Benjakul, 2011).

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme Thermoase GL30 đến hiệu quả thủy phân gelatin từ da cá rô phi

3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme Thermoase GL30 đến hiệu quả thủy phân gelatin từ da cá rô phi

Trong quá trình thủy phân một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng protein thủy phân là nồng độ enzyme, kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến các đặc tính của protein thủy phân từ gelatin da cá rô phi được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Hoạt tính chống oxy hóa, độ nhớt và hiệu suất thu hồi protein thủy phân từ da cá rô phi bằng enzyme Theromoase GL30 ở các nồng độ enzyme khác nhau

Nồng độ enzyme Thermoase GL30 (%)	Hoạt tính chống oxy hóa (DPPH%)	Độ nhớt (mPa.s)	Hiệu suất thu hồi (%)
0,1	68,6±0,475^{a}	16,9±0,092^{b}	91,3±1,390^{a}
0,3	72,9±0,306^{c}	16,6±0,271^{b}	96,1±0,424^{b}
0,5	71,2±0,263^{b}	11,6±0,141^{a}	97,5±1,150^{b}

Số liệu thống kê được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn với n=3. Những chữ cái (a, b và c) khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95.

Kết quả thí nghiệm ở Bảng 2 cho thấy cùng một điều kiện thủy phân với nhiệt độ 60°C trong 1 giờ bằng enzyme Thermoase GL30, khi tăng nồng độ enzyme Thermoase GL30 từ 0,1 lên 0,3% thì hoạt

tính chống oxy hóa của protein thủy phân tăng từ 68,6 lên 72,9% và độ nhớt không có sự khác biệt thống kê giữa 2 nồng độ enzyme này. Nguyên nhân hoạt tính chống oxy hóa tăng có thể được dự đoán là do protein thủy phân chứa các gốc amino acid kỵ nước, các amino acid kỵ nước này có mối quan hệ với đặc tính chống oxy hóa (Mendis et al., 2005) nên khi tổng lượng amino acid kỵ nước tăng thì hoạt tính chống oxy hóa tăng. Lí giải này được kiểm chứng ở thí nghiệm sau, khi mẫu tối ưu được phân tích amino acid. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ enzyme Thermoase GL30 lên 0,5% thì hoạt tính chống oxy hóa giảm còn 71,2% và độ nhớt cũng giảm từ 16,4 xuống còn 11,6 mPa.s. Hoạt tính chống oxy hóa của protein thủy phân có liên quan đến mức độ thủy phân, thời gian thủy phân và trọng lượng phân tử. Khi tăng nồng độ enzyme thì DPPH giảm có thể giải thích được rằng khi có mặt protein thủy phân cho thấy hỗn hợp các peptide và amino acid có thể ngăn chặn DPPH bằng cách ghép đôi điện tử đơn của các gốc DPPH (Pezeshk et al., 2019). Nguyên nhân độ nhớt giảm do chịu ảnh hưởng của kích thước phân tử chuỗi peptide (Bigi & Rubini, 2004) dưới tác dụng của enzyme với nồng độ cao các chuỗi α và β của gelatin bị cắt đứt dẫn đến hình thành các mạch peptide có kích thước ngắn nên độ nhớt của protein thủy phân giảm (Tran et al., 2006).

Kết quả protein thủy phân từ gelatin da cá rô phi bằng enzyme Thermoase GL30 có độ nhớt và hoạt tính chống oxy hóa cao hơn so với các sản phẩm protein thủy phân khác từ da cá khi sử dụng các nguồn enzyme khác như: dùng enzyme Protamex với nồng độ 5% ở 50°C trong 3 giờ thủy phân gelatin từ da cá chép có hoạt tính oxy hóa là 18,80% (Tkaczewska et al., 2020). Hay nghiên cứu dùng enzyme Alcalase 5% ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 1 giờ để thủy phân protein từ da cá hồi thu được hoạt tính chống oxy hóa 59,75% và độ nhớt là 13,3 mPa.s (Thủy và ctv., 2023). Theo công bố của các nghiên cứu khác khi sử dụng enzyme Alcalase thì hoạt tính Alcalase khoảng 825 U/mL (Nguyen et al., 2022) và khi so sánh với enzyme Thermoase GL30 có hoạt tính 300.000 U/mL (Amano enzyme, Nhật Bản), chính vì vậy mà khi sử dụng enzyme Thermoase GL30 với nồng độ thấp hơn rất nhiều so với những nghiên cứu sử dụng enzyme Alcalase nhưng vẫn đạt hiệu quả chống oxy hóa và độ nhớt cao hơn.

Hiệu suất thu hồi protein tăng từ 91,3 lên 97,5% khi tăng nồng độ enzyme Thermoase GL30 từ 0,1 lên 0,5% và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở 2 nồng độ 0,3 và 0,5%. Hiệu suất thu hồi tăng là do enzyme là chất xúc tác sinh học nên tốc độ phản ứng tăng nhanh khi dư thừa cơ chất, do đó khi tăng nồng độ enzyme thì tốc độ phản ứng tăng và dẫn tới hiệu suất thu hồi của protein thủy phân cũng tăng (Ung, 2019). Hiệu suất thu hồi của nghiên cứu này gần tương đương với nghiên cứu dùng enzyme Alcalase thủy phân da cá ngừ vây vàng thu được hiệu suất thu hồi là 96,42% (Nguyen & Tran, 2019) và cao hơn khi so với hiệu suất thu hồi của da cá chẽm khi sử dụng hỗn hợp Papain 3% và Alcalase 2% có hiệu suất thu hồi đạt 51% (Benjakul et al., 2017).

Bên cạnh những chỉ tiêu trên thì màu sắc cũng là chỉ tiêu quan trọng ảnh hưởng rất lớn đến tính ứng dụng của protein thủy phân và kết quả đo màu sắc của protein thủy phân từ da cá rô phi ở các nồng độ thủy phân khác nhau được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Màu sắc và độ sáng của protein thủy phân từ da cá rô phi ở các nồng độ enzyme thủy phân khác nhau

Nồng độ enzyme Thermoase GL30 (%)	Màu sắc			
	(L)*	*(a*)*	*(b*)*	*(ΔE*)*
0,1	89,6±1,66[a]	2,55±0,203[b]	12,8±0,505[b]	14,7±0,669[b]
0,3	93,1±0,076[b]	1,46±0,731[a]	9,26±1,07[a]	9,73±1,070[a]
0,5	94,7±0,609[b]	1,19±0,025[a]	9,52±0,161[a]	9,33±0,317[a]

Số liệu thống kê được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn với n=3. Những chữ cái (a và b) khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy ở cùng một nhiệt độ thủy phân khi tăng nồng độ từ 0,1 lên 0,5% thì độ sáng L^* tăng từ 89,6 lên 94,7 bên cạnh đó thì cường độ màu ΔE^* có xu hướng giảm, do độ sáng L^* tỉ lệ nghịch với cường độ đo màu nên ΔE^* càng nhỏ thể hiện độ sáng L^* càng cao. Nguyên nhân dẫn đến màu sắc thay đổi có thể là do trong quá trình chiết tách khi tăng nồng độ enzyme thì một phần sắc tố có trong nguyên liệu đã được loại bớt (Truong et al., 2021). Một số nghiên cứu về protein thủy phân từ da cá cũng cho sự thay đổi màu sắc rõ rệt (tăng giá trị L^*) như: nghiên cứu collagen thủy phân từ da cá hồi bằng Alcalase 4% và Papain 3% ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 4 giờ có L^*=84,52 (Nilsuwan et al., 2021), hay nghiên cứu collagen từ da cá chẽm có độ sáng L^*=65,41 (Jamilah et al., 2013). Sự chênh lệch

màu sắc trên là do sự phụ thuộc vào nguồn nguyên liệu, các sắc tố có sẵn nguyên liệu cũng như nguồn enzyme khác nhau nên dẫn đến sự ảnh hưởng đến màu sắc của các sản phẩm protein thủy phân.

Kết quả Bảng 2 và Bảng 3 cho thấy khi thủy phân gelatin từ da cá rô phi bằng enzyme Thermoase GL30 với nồng độ 0,3% cho hoạt tính chống oxy hóa, độ nhớt tốt nhất và hiệu suất thu hồi, độ sáng protein thủy phân tương đối cao nên được chọn làm nồng độ thích hợp để bố trí thí nghiệm tiếp theo.

3.2.2. Ảnh hưởng nhiệt độ thủy phân bằng enzyme Thermoase GL30 đến chất lượng protein thủy phân từ da cá rô phi

Nhiệt độ thủy phân là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng protein thủy phân. Các thông số về hoạt tính chống oxy hóa, độ nhớt và hiệu suất thu hồi của sản phẩm protein thủy phân từ da cá rô phi ở các nhiệt độ khác nhau được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Hoạt tính chống oxy hóa, độ nhớt và hiệu suất thu hồi protein thủy phân từ da cá rô phi bằng enzyme Theromoase GL30 ở các nhiệt độ thủy phân khác nhau

Nhiệt độ thủy phân (°C)	Hoạt tính chống oxy hóa (DPPH%)	Độ nhớt (mPa.s)	Hiệu suất thu hồi (%)
50	69,9±0,474^{a}	14,9±0,636^{b}	92,4±0,378^{b}
60	73,2±0,423^{b}	16,8±0,704^{c}	96,4±0,764^{c}
70	70,1±1,950^{a}	10,8±0,364^{a}	90,8±0,551^{a}

Số liệu thống kê được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn với n=3. Những chữ cái (a và b) khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%.

Qua các số liệu thống kê từ Bảng 4 có thể thấy rằng, cùng một điều kiện thủy phân bằng enzyme Thermoase GL30 0,3% trong thời gian 1 giờ khi tăng nhiệt độ thủy phân từ 50 lên 60°C thì hoạt tính chống oxy hóa tăng từ 69,9 lên 73,2% và độ nhớt tăng từ 14,9 lên 16,8 mPa.s. Khi tăng nhiệt độ lên lên 70°C thì hoạt tính chống oxy hóa giảm từ 73,2 xuống 70,1% và độ nhớt giảm từ 16,8 xuống còn 10,8 mPa.s. Hoạt tính oxy hóa giảm là do khi có mặt protein thủy phân thì hỗn hợp các peptide và amino acid có thể đã ngăn chặn DPPH bằng cách ghép đôi điện tử đơn của các gốc DPPH (Pezeshk et al., 2019). Độ nhớt giảm là do ảnh hưởng nhiều vào cấu trúc bậc 3 của collagen và trong quá trình thủy phân gelatin cấu trúc bậc 3 của protein bị phá vỡ nên độ nhớt thấp. Tùy vào từng loại enzyme và điều kiện thủy phân của enzyme cũng ảnh hưởng nhiều đến độ dài của chuỗi polypeptide và đặc tính của các sản phẩm protein thủy phân (Liua et al., 2012).

Protein thủy phân từ gelatin da cá rô phi bằng enzyme Thermoase GL30 cho kết quả hoạt tính chống oxy hóa và độ nhớt cao hơn một số nghiên cứu khi dùng các nguồn enzyme khác như: dùng enzyme Trypsin ở 40°C với nồng độ 2% trong thời gian 2 giờ để thủy phân phụ phẩm cá hồi có hoạt tính chống oxy hóa là 70,34% (Tran et al., 2017). Hay nghiên cứu khác khi thủy phân gelatin từ da cá lóc bằng enzyme Alcalase 2% trong 3 giờ đạt độ nhớt 7,01 mPa.s (Nguyen & Le, 2022). Ngoài ra, khi thủy phân gelatin từ da cá vược bằng Flavourzyme 5% ở nhiệt độ 50°C trong 1 giờ và thu được hoạt tính chống oxy hóa là 44,9% (Tekle et al., 2022).

Còn hiệu suất thu hồi thì khi tăng nhiệt độ từ 50 lên 60°C thì hiệu suất thu hồi tăng từ 92,4 lên 96,4% và khi tăng nhiệt độ thủy phân lên 70°C thì hiệu suất thu hồi giảm 96,4 xuống còn 90,8%. Nhiệt độ thủy phân là nhân tố ảnh hưởng đến khả năng xúc tác của enzyme cũng như các phản ứng hóa học, tốc độ phản ứng của enzyme tăng khi nhiệt độ tăng. Tuy nhiên, enzyme có bản chất là protein nên tốc độ phản ứng của enzyme không phải lúc nào cũng tỉ lệ thuận với nhiệt độ thủy phân. Tốc độ phản ứng chỉ tăng đến một giới hạn nhiệt độ nhất định, vượt qua giới hạn đó tốc độ phản ứng giảm (Ung, 2019). Do đó, số liệu thí nghiệm cho thấy khi tăng nhiệt độ thủy phân lên 70°C thì hiệu suất thu hồi giảm xuống. Hiệu suất thu hồi tỉ lệ thuận với hoạt tính chống oxy hóa và độ nhớt, hiệu suất thu hồi càng cao khả năng chống oxy hóa càng lớn và độ nhớt càng cao (Nurilmala et al., 2020). Sản phẩm protein thủy phân từ da cá rô phi có hiệu suất thu hồi cao hơn so với với hiệu suất thu hồi của da cá ngừ vây vàng khi thủy phân bằng enzyme Alcalase 2% ở nhiệt độ 55°C trong 3 giờ chỉ đạt 22,6% (Nurilmala et al., 2020) và khi so với nghiên cứu của Nguyen & Le (2022) đã thủy phân da cá lóc bằng enzyme Alcalase với nồng độ 2% trong 3 giờ cho hiệu suất thu hồi là 98,6% cao hơn so với nghiên cứu này và tương tự như nghiên cứu thủy phân protein da cá hồi bằng enzyme Alcalase 5% trong 1 giờ ở 50°C có hiệu suất thu hồi đạt được là 96,1% (Le et al., 2023).

Màu sắc cũng là một chỉ tiêu quan trọng liên quan đến việc ứng dụng sản phẩm trong các lĩnh vực như công nghệ dược phẩm, mỹ phẩm (Le et al.,

2023). Sự thay đổi màu sắc của protein thủy phân từ da cá rô phi ở các nhiệt độ thủy phân khác nhau được trình bày ở Bảng 5.

Số liệu trình bày trong Bảng 5 cho thấy khi thủy phân bằng enzyme Thermoase GL30 dù ở nhiệt độ nào thì sản phẩm protein thủy phân từ da cá rô phi đều có màu sắc rất sáng, độ sáng trên 91,0. Cụ thể là khi nhiệt độ 50°C có độ sáng L^*=93,9 và khi tiếp tục nâng nhiệt lên 60°C và 70°C thì độ sáng của sản phẩm giảm dần cụ thể là 93,1 xuống còn 91,5 còn cường độ sáng L^* thì tỷ lệ nghịch với độ sáng ΔE^* tăng từ 10,4 lên 12,3. Nguyên nhân dẫn đến sự thay đổi về độ sáng trên là do sự giải phóng các amino acid tự do thông qua quá trình thủy phân gelatin bởi enzyme, các amino acid này kết hợp với các nhóm đường khử tạo phản ứng hóa nâu phi enzyme (maillard) (Zhang et al., 2019) và khi nhiệt độ thủy phân cao gây sẫm màu cho sản phẩm protein thủy phân. Độ sáng của protein thủy phân cũng chịu ảnh hưởng rất lớn bởi nhiệt độ thủy phân và nguồn enzyme sử dụng. Độ sáng của của protein thủy phân từ gelatin da cá rô phi của nghiên cứu này là 93,1 cao hơn so với nghiên cứu của Truong et al. (2021) khi thủy phân da cá lóc bằng enzyme Pepsin ở nồng độ 0,45% đạt được giá trị độ sáng L^*= 62,4. Hay khi thủy phân da cá lóc bằng enzyme Alcalase ở 50°C nồng độ 2% trong 3 giờ thì thu được độ sáng L^*=81,8 (Nguyen & Le, 2022). Bên cạnh đó, cũng có một số nghiên cứu thu được có màu sắc sáng hơn như nghiên cứu của Nurilmala et al. (2020) đã sử dụng enzyme Alcalase ở 55°C với nồng độ 2% trong 3 giờ để thủy phân protein từ da cá ngừ vây vàng và có kết quả độ sáng L^*= 96,7 cao hơn so với thủy phân gelatin từ da cá rô phi bằng enzyme Thermoase GL30 cho giá trị độ sáng tương đối cao L^*=93,1.

Bảng 5. Sự thay đổi màu sắc của protein thủy phân từ da cá rô phi bằng enzyme Thermoase GL30 ở nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ thủy phân (°C)	Màu sắc			
	(L)*	*(a*)*	*(b*)*	*(ΔE*)*
50	93,9±0,458^{b}	1,13±0,095^{a}	8,39±1,14^{a}	7,98±1,220^{a}
60	93,1±0,860^{b}	1,90±0,020^{c}	10,5±1,41^{ab}	10,4±1,040^{b}
70	91,5±0,261^{a}	1,57±0,60^{b}	11,9±0,406^{b}	12,3±0,254^{b}

Số liệu thống kê được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn với n=3. Những chữ cái (a, b và c) khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95%.

Số liệu được thể hiện ở Bảng 4 và Bảng 5 cho thấy protein thủy phân từ da gelatin da có rô phi bằng enzyme Thermoase GL30 ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 1 giờ có màu sắc đẹp và hoạt tính chống oxy hóa, độ nhớt cũng như hiệu suất thu hồi là tốt nhất.

Từ kết quả phân tích ở thí nghiệm 1 và thí nghiệm 2, chế độ thủy phân thích hợp để thu được sản phẩm protein thủy phân từ gelatin da cá rô phi có các hoạt tính sinh học cao là ở nhiệt độ 60°C và nồng độ enzyme Thermoase GL30 0,3% trong thời gian 1 giờ đây chính là điều kiện tối ưu để tiến hành thủy phân và thu mẫu để tiến hành phân tích các chỉ tiêu khác như amino acid và quang phổ hồng ngoại (FTIR).

3.3. Thành phần amino acid của protein thủy phân từ gelatin da cá rô phi

Hàm lượng amino acid của sản phẩm protein thủy phân từ gelatin da cá rô phi bằng enzyme Thermoase GL30 với nồng độ 0,3% ở 60°C trong thời gian 1 giờ được biểu thị bằng đơn vị trên 1.000 đơn vị được thể hiện trong Bảng 6.

Thành phần amino acid của protein thủy phân từ gelatin da cá rô phi có đầy đủ 18 loại amino acid. Trong đó thành phần chiếm tỉ lệ amino acid cao nhất là Glycine lên tới 324 (đơn vị/1.000 đơn vị). Kết quả của nghiên cứu này gần giống với kết quả nghiên cứu của Jridi et al. (2014) khi phân tích thành phần amino acid của collagen thủy phân từ nang mực cũng cho kết quả hàm lượng Glycine là 318 (đơn vị/1.000 đơn vị) và nghiên cứu của Le et al. (2023) khi thủy phân protein của da cá hồi bằng enzyme Alcalase có hàm lượng Glycine là 315 (đơn vị/1.000 đơn vị). Bên cạnh đó, hàm lượng Leucine, Phenylalanine và Tyrosine cũng chiếm tỷ lệ khá cao trong sản phẩm protein thủy phân, nguyên nhân các amino acid này cao có thể là do enzyme Thermoase GL30 đã thủy phân các liên kết của các peptide amino acid thơm hoặc béo dẫn đến việc tăng các hàm lượng Leucine, Phenylalanin và Tyrosine (Rao et al., 1998).

Theo Mendis et al. (2005), có 9 loại amino acid kỵ nước gồm: Glycine, Alanine, Valine, Isoleucine, Leucine, Phenylalanine, Methionine, Tryptophan và Proline. Đây là những amino acid có mối liên quan chặt chẽ đến khả năng chống oxy hóa của protein thủy phân. Kết quả cho thấy tổng hàm lượng amino

aicd kỵ nước trong nghiên cứu này là 596 (đơn vị/1.000 đơn vị) tương đương với hoạt tính chống oxy hóa là 73,2%, cao hơn gelatin thủy phân từ da cá ngừ vây vàng bằng enzyme Alcalase (Nurilmala et al., 2020) với tổng lượng amino acid kỵ nước là 535,8 (đơn vị/1.000 đơn vị) và có hoạt tính chống oxy hóa đạt 56,05%. Điều này cho thấy protein thủy phân có hàm lượng tổng lượng amino acid kỵ nước càng cao thì khả năng chống oxy hóa càng tốt. Lý giải cho khả năng chống oxy hóa của các amino acid kỵ nước là do trong quá trình thủy phân các amino acid có vòng thơm giàu electron ở chuỗi bên và các amino acid có nguyên tử nitơ trong chuỗi bên chẳng hạn như Histidine, Lysine và Arginine dễ bị oxy hóa do nguyên tử nitơ có một cặp electron đơn độc nên các amino acid này cũng có thể bị các chất oxy hóa tấn công (Xu et al., 2017). Những lí giải trên cho thấy hoạt tính chống oxy hóa có mối liên quan chặt chẽ đến cấu trúc, thành phần amino acid và tính chất kỵ nước của amino acid (Alemán et al., 2011).

Bảng 6. Thành phần amino acid của protein thủy phân từ da cá rô phi bằng enzyme Thermoase GL30 0,3% ở 60°C trong 1 giờ

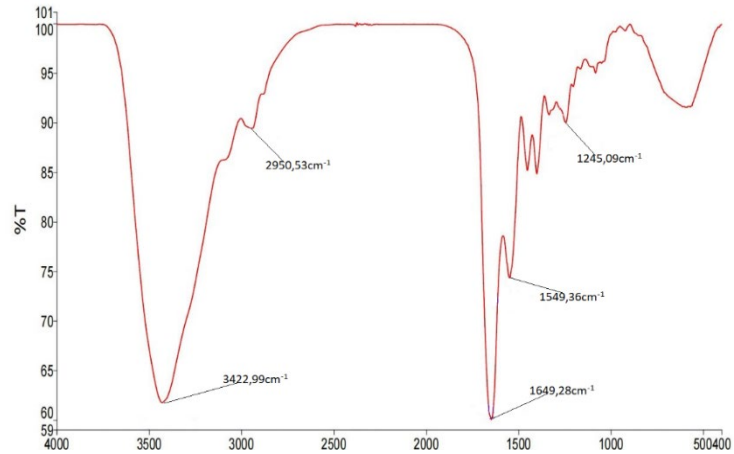
STT	Amino acid	Hàm lượng	STT	Amino acid	Hàm lượng
1	Aspartic acid	47	11	Isoleucine	24
2	Threonine	26	12	Leucine	19
3	Serine	41	13	Phenylalanine	11
4	Glutamic acid	86	14	Lysine	33
5	Glycine	324	15	Histidine	15
6	Alanine	93	16	Arginine	57
7	Valine	13	17	Hydroxyproline	99
8	Cystein	ND	18	Proline	100
9	Methionine	6	19	TAA*	1.000
10	Tryptophan	6	20	THAA*	596

Ghi chú: (*) TAA: Total amino acid (tổng hàm lượng amino acid). THAA: Total hydrophobic amino acid (tổng hàm lượng amino acid kỵ nước). Kết quả được tính theo số amino acid/1.000 amino acid tổng số. ND: means not detected.*

3.4. Quang phổ hồng ngoại (FTIR)

Phổ FTIR của sản phẩm protein thủy phân từ gelatin da cá rô phi bằng enzyme Thermoase GL30 với nồng độ enzyme 0,3% ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 1 giờ được trình bày ở Hình 1.

Quang phổ hồng ngoại (phổ FTIR) giúp nhận diện các nhóm chức có trong phân tử protein thủy phân. Đối với cấu trúc phân tử protein hay protein thủy phân thì có 5 vùng đại diện cho các liên kết. Đầu tiên là vùng amide A thể hiện sự hình thành liên kết hydro liên quan đến nhóm –NH trong liên kết peptide và được tìm thấy trong khoảng bước sóng 3400 - 3440 cm^{-1} (Muyonga et al., 2004), cụ thể trong nghiên cứu này có bước sóng tại vùng amide A là 3422,99 cm^{-1}. Kết quả cho thấy vùng amide A vẫn còn nằm giới hạn cho phép điều này cho thấy các nhóm liên kết –NH trong peptide vẫn được giữ vững. Vùng liên kết thứ 2 là Amide B và vùng liên kết 3 là amide I (1600 - 1660 cm^{-1}) đều đóng vai trò quan trọng cho cấu trúc thứ cấp của protein với sự dao động kéo dài của nhóm cacbonyl trong peptide (Muyonga et al., 2004). Kết quả phân tích của protein thủy phân từ da cá rô phi của nghiên cứu này có bước sóng tại vùng amide B là 2950,53 cm^{-1} và amide I là 1649,28 cm^{-1}, điều này cho thấy cấu trúc thứ cấp của sản phẩm protein thủy phân từ da cá rô phi vẫn được giữ vững chưa bị phá vỡ dưới tác động của enzyme. Theo Muyonga et al. (2004), vùng amide II có bước sóng khoảng 1500 cm^{-1} và vùng amide III có bước sóng (1220 - 1320 cm^{-1}) có ảnh hưởng tới dao động uốn cong của nhóm –NH và dao động kéo căng của liên kết –CN amide II là dao động có liên quan đến cấu trúc xoắn bậc 3 của mẫu protein thủy phân. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy vùng amide II và amide III có bước sóng lần lượt là 1549,36 cm^{-1} và 1245,09 cm^{-1}, điều này cho thấy sản phẩm protein thủy phân từ da cá rô phi còn giữ được cấu trúc bậc 3 và không bị phá vỡ bởi tác động của phân tử enzyme. Dữ liệu phân tích phổ FTIR cho thấy sản phẩm protein thủy phân từ gelatin da cá rô phi bằng enzyme Thermoase GL30 có đầy đủ các nhóm chức năng collagen loại I và tương tự như báo cáo về collagen loại I từ da cá rô phi của Li et al. (2018) có vùng amide A với bước sóng là 3424,96 cm^{-1}, vùng amide B có bước sóng 2927,41 cm^{-1}, vùng amide I là 1646,91 cm^{-1}, vùng amide II là 1546,63 cm^{-1} và vùng amide III là 1241,93 cm^{-1}, hay tương tự như nghiên cứu collagen hòa tan bằng acid từ ba loại da cá nước ngọt của Thuy et al. (2020) có các nhóm chức năng bao gồm đỉnh amide A, amide B, amide I, amide II và amide III của collagen từ da cá rô phi với bước sóng lần lượt là 3447,24 cm^{-1}, 2933,22 cm^{-1}, 1647,48 cm^{-1}, 1527,92 cm^{-1} và 1253,74 cm^{-1}.



Hình 1. Phổ FTIR của sản phẩm protein thủy phân từ da cá rô phi

4. KẾT LUẬN

Thông số kỹ thuật phù hợp cho quá trình thủy phân gelatin da cá rô phi bằng enzyme Thermoase GL30 là nồng độ 0,3% ở nhiệt độ 60°C trong 1 giờ cho sản phẩm protein thủy phân từ da cá rô phi có màu sắc sáng đẹp với L^*=93,1, hoạt tính chống oxy hóa 73,2%, độ nhớt 16,8 mPa.s và hiệu suất thu hồi cao nhất đạt 96,4%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

Ahmad, M., & Benjakul, S. (2011). Charateristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretrement and extraction time. *Food Hydrocolloids*, *25*, 381-388. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.07.004

Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT-Food Science and Technology*, *44*(2), 407-413. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.09.003

Amano enzyme Nhật Bản. (2023). Thermoase GL30. Truy cập ngày 25/7/2023. Địa chỉ truy cập: http://www.amano-enzyme.co.jp/.

AOAC. (2000). Official Methods of Analysis. Association of offical analytical chemists Arlington.

Benjakul, S., Karnjanapratum, S., & Visessanguan, W. (2017). Production and Characterization of Odorless Antioxidative Hydrolyzed Collagen from Seabass (*Lates calcarifer*) Skin Without Descaling. *Waste and Biomass Valorization, 9*(4), 549-559. https://doi.org/10.1007/s12649-017-0008-9

Bigi, A., Panzavolta, S., & Rubini, K. (2004). Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, *25*(25), 5675-5680. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.033

Chalamaiah, M., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, *135*(4), 3020-3038. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100

Etemadian, Y., Ghaemi, V., Shaviklo, A.R., Pourashouri, P., Sadeghi Mahoonak, A.R. and Rafipour, F. (2021). Development of animal/ plantbased protein hydrolysate and its application in food, feed and nutraceutical industries: state of the art. *Journal of Cleaner Production*, 278, 123219. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123219

Huynh, N. N. N. (2022). *The research on the hydrolyzed collagen extraction from tilapia (Oreochromis niloticus) skin by Alcalase enzyme*. The university graduation thesis in seafood science and technology. College of Aquaculture and fisheries. Can Tho University (*in Vietnamese*).

Jamilah, B. Umi Hartina, M. R. Mat Hashim, D., & Sazilli, A. Q. (2013). Properties of collagen from barramundi (*Late calcarifer*) skin. *International Food Research Journal*, *20*, 835-842.

Jamilah, B., Tan, K. W., Umi Hartina, M. R., & Azizah, A. (2011). Gelatins from three cultured freshwater fish skins obtained by liming process. *Food Hydrocolloids*, *25*(5), 1256-1260. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.11.023

Jridi, M., Lassoued, I., Nasri, R., Ayadi, M. A., Nasri, M., & Souissi, N. (2014). Characterization and potential use of cuttlefish skin gelatin hydrolysates perpared by different microbial

proteases. *BioMed Research International*, *1*(14), 10-1155. https://doi.org/10.1155/2014/461728

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 657-666. https://doi.org/10.1021/jf990447v

Le, T. T. M., & Nguyen, T. V. (2019). The effect of treatment method and extraction condition on the quality of gelatin from tra catfish skin (*Pangasianodon hypophthalamus*). *Journal of Fisheries Science and Technology, 4*, 130-138 (*in Vietnamese*). https://doi.org/10.53818/jfst.04.2019.400

Le, T. T. M., Truong, T. T. M., & Tran, T. T. (2023). Production of protein hydrolysate product from salmon (*Salmo salar*) skin by enzyme alcalase. *Vietnam Journal of Agriculture & Rural Development, 1*, 344-352 (*in Vietnamese*). https://doi.org/10.53818/jfst.04.2019.400

Li, J., Wang, M., Qiao, Y., Tian, Y., Liu, J., Qin, S., & Wu, W. (2018). Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochemistry*, *74*,156-163. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.009

Liua, F., Liu, C. E., Lorena, D., Zhang, X., & Fu, Z. (2012). Evaluation of the antioxidant activity of collagen peptide additive extracted from cod skin. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, *13*(3 A), 1836-1841.

Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S. K. (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(3), 581-587. https://doi.org/10.1021/jf048877v

Molla, A. E., & Hovannisyan, H. G. (2011). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga Huso huso using Protamex. *International Aquatic Research*, *3*(2), 93-99.

Muyonga, J.H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. (2004). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, *85*(1), 81-89. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.06.006

Nguyen, B. C., & Tran, K. P. (2019). The removal of non-collagen composition in yellowfin tuna skin by NaOH solution. *Journal of Sciences Technology & Food*, *19*(1), 114-124 (*in Vietnamese*).

Nguyen, H. T. M., Sylla, K. S. B., Randriamahatody, Z., Donnay-Moreno, C., Moreau, J., Tran, L. T., & Bergé, J. P. (2011). Enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by-products using Protamex protease. *Food Technology and Biotechnology*, *49*(1), 48-55.

Nguyen, T. V., & Le, T. T. M. (2022). Extraction of hydrolyzed collagen from snakehead fish skin (*Channa striata*) by using organic acid and Alcalase. *Vietnam Journal of Agriculture & Rural Development, 14*, 61-68 https://doi.org/10.58902/tcnckhpt.v2i3.72

Nilsuwan, K., Chantakun, K., Chotphruethipong, L., & Benjakul, S. (2021). Development of hydrolysis and defatting processes for production of lowered fishy odor hydrolyzed collagen from fatty skin of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Foods*, *10*(10), 22-57. https://doi.org/10.3390/foods10102257

Nolse, H., & Undeland, I. (2009). The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: state of the art. *Food and Bioprocess Technology*, *2*, 1-27. https://doi.org/10.1007/s11947-008-0088-4

Nurilmala, M., Hizbullah, H. H., Karnia, E., Kusumaningtyas, E., & Ochiai, Y. (2020). Characterization and antioxidant activity of collagen, gelatin, and the derived peptides from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin. *Marine Drugs*, *18*(98), 1-12. https://doi.org/10.3390/md18020098

Pasupuleti, V. K., Holmes, C., & Demain, A. L. (2010). *Applications of protein hydrolysates in biotechnology*. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6674-0

Pezeshk, S., Ojagh, S. M., Rezaei, M., & Shabanpour, B. (2019). Fractionation of protein hydrolysates of fish waste using membrane ultrafiltration: Investigation of antibacterial and antioxidant activities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins, 11*(3), 1015-1022. https://doi.org/10.1007/s12602-018-9483-y

Prabu, E., Rajagopalsamy, C. B. T., Ahilan, B., Jeevagan, I. J. M. A., & Renuhadevi, M. (2019). Tilapia - an excellent candidate species for world aquaculture: A review. *Annual Research & Review in Biology*, *31*, 1-14. https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v31i330052

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(3), 597-635. https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998

Sae-leaw, T., & Benjakul, S. (2015). Physico-chemical properties and fishyodour of gelatin

from seabass (*Lates calcarifer*) skin stored in ice. *Food Bioscience*, *10*, 59-68. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.02.002

Sae-leaw, T., Benjakul, S., & O'Brien, N. M. (2016). Effects of defatting and tannic acid incorporation during extraction on properties and fishy odour of gelatin from seabass skin. *LWT-Food Science and Technology*, *65*, 661-667. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.060

Tekle, S., Bozkurt, F., Akman, P. K., & Sagdic, O. (2022). Bioactive and Functional properties of gelatin peptide fractions obtained from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) skin. *Food Science and Technology, 42*, 60-221. https://doi.org/10.1590/fst.60221

Thuy, L. T. M., Muoi, N, V., Truc, T. T., Takahashi, K., & Osako, K. (2020). Comparison of acid-soluble collagen characteristic from three important freshwater fish skins in Mekong Delta Region, Vietnam. *Journal of Food Biochemistry*, *44*(9), 13397. https://doi.org/10.1111/jfbc.13397

Thuy, L. T. M., Okazaki., E., & Osako, K. (2014). Isolation and characterization of acid – soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Viet Nam. *Food Chemistry*, *149*, 264-270. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.094

Thuy, L. T. M., Thanh, N. V., & Truc, T. T. (2022). The changing of gelatin properties from tra catfish skin (*Pangasianodon hypophthalamus*) by alkaline replacement to enzyme in pretreated process. *Ciência Rual*, *52*(9), e202-10519. https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210519

Tinrat, S., & Sila-Asna, M. (2017). Optimization of Gelatin Extraction and Physico-Chemical Properties of Fish Skin and Bone Gelatin: Its Application to Panna Cotta Formulas. *Current Research in Nutrition and Food Science*, *5*(3), 263-273. https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.5.3.11

Tkaczewska, J., Borawska-Dziadkiewicz, J., Kulawik, P., Duda, I., Morawska, M., & Mickowska, B. (2020). The effects of hydrolysis condition on the antioxidant activity of protein hydrolysate from *Cyprinus carpio* skin gelatin. *LWT - Food Science and Technology, 117*, 108616. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108616

Tran, A. K., Nguyen, T. H., Nguyen, V. K. H., Nguyen, L. T. H., & Pham, C. K. (2017). Study of Hydrolysis Conditions of Salmon Waste to Collect Antioxidant Peptides. *VNU Journal of Science. Natural Sciences and Technology*, *33*(1S), 7-13 *(in Vietnamese).*

Tran, L. T., Đo, P. M., & Nguyen, T. A. (2006). *Production of technical and medical products from aquatic waste*. Agricultural Publishing House, 162 trang (*in Vietnamese*).

Truong, T. T. M., Le, T. T. M., Nguyen, M, V., & Tran, T. T. (2022). Effects of enzyme concentration and hydrolysis time on the recovery of fish protein hydrolysate from snakehead (*Channa striata*) head by using different proteases. *Can Tho University Journal of Science, 58*(4), 78-86 (*in Vietnamese*). https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2022.166

Truong, T. T. M., Nguyen, Q. Đ., Tran, T. T., & Le, T. T. M. (2021). The study of the pre-treatment and collagen extraction conditions from snakehead fish (*Channa striata*) skin by using pepsin. *Can Tho University Journal of Science*, *57* (6), 178-188 (*in Vietnamese*). https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.185

Ung, T. M. A. (2019). Study on hydrolysis of protein obtained from Alcalase enzyme. *Vietnam Journal of Nutrition & Food*, *15*(4), 63-72 (*in Vietnamese*).

Vietfish Magazine. (2022). *Solving the problem of tilapia seed quality,* accessed 28/7/2023. Adress: https://thuysanvietnam.com.vn/giai-bai-toan-chat-luong-giong-ca-ro-phi/.

Vietnam Agriculture. (2019). *Vietnamese tilapia "swims" to the word. https://nongnghiep.vn/ca-ro-phi-viet-nam-boi-ra-the-gioi-d239663.html.*

Wasswa, J., Tang, J., Gu, X. H., &Yu an, X. Q. (2007). Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, *104*(4), 1698-1704. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.044

Wu, H. C., Shiau, C. Y., Chen, H. M. & Chiou, T. K. (2003). Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids their combination. *Journal of Food Research International*, *48*(2), 435-153. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.013

Xu, N., Chen, G., & Liu, H. (2017). Antioxidative categorization of twenty amino acids based on experimental evaluation. *Molecules*, *22*(12), 2066. https://doi.org/10.3390/molecules22122066

Zhang, Y., Dutilleul, P., Li, C., & Simpson, B. K. (2019). Alcalase-assisted production of fish skin gelatin rich in high molecular weight (HMW) polypeptide chains and their characterization for film forming capacity. *Lwt- Food Science and Technology, 110*, 117-125. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.012