



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**



2-0002775

(51) **C07K 14/78; A61K 9/00; C07K 1/36; A61K (13) Y
2020.01 38/00; C07K 1/34**

-
- (21) 2-2021-00287 (22) 19/10/2018
(67) 1-2018-04660
(45) 25/01/2022 406 (43) 25/04/2019 373A
(73) Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Nhà A13, 18 đường Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố
Hà Nội
(72) Nguyễn Thúy Chinh (VN); Thái Hoàng (VN); Vũ Quốc Mạnh (VN); Nguyễn Vũ
Giang (VN); Trần Đại Lâm (VN); Vũ Quốc Trung (VN).
-

(54) **PHƯƠNG PHÁP CHIẾT TÁCH COLAGEN TỪ VẢY CÁ NƯỚC NGỌT VIỆT NAM,
COLAGEN THU ĐƯỢC TỪ PHƯƠNG PHÁP NÀY VÀ VẬT LIỆU TỔ HỢP CHỨA
COLAGEN NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết tách collagen từ hỗn hợp vảy cá nước ngọt Việt Nam gồm các bước sau: Làm sạch vảy cá, loại bỏ chất béo và protein trong vảy cá bằng hỗn hợp NaOH và Ca(OH)₂, kết hợp khuấy siêu âm tốc độ cao; tách khoáng bằng hỗn hợp axit HCl và H₂SO₄; tách collagen bằng dung dịch axit axetic, thẩm tích thu collagen tinh khiết.

Sáng chế cũng đề cập đến collagen được chiết tách từ hỗn hợp vảy cá nước ngọt Việt Nam có độ tinh khiết > 99%, là collagen loại I, đường kính sợi 0,5-1 μm, có chứa 20 axit amin; có trình tự axit amin: SEQ ID NO: 1-5. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến vật liệu tổ hợp ở dạng hạt được tạo ra bằng phương pháp gel ion hóa, vật liệu này bao gồm (% khối lượng):

- Collagen 35-45
- Carrageenan 35-45, và
- Allopurinol 10-30.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp chiết tách collagen từ vảy cá nước ngọt Việt Nam và các sản phẩm collagen thu được từ phương pháp này. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến ứng dụng collagen trong chế tạo vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Collagen là một protein có cấu trúc bậc 4 điển hình, do các đơn vị tropocollagen cấu trúc bậc 3 tổ hợp theo các hướng dọc và ngang làm collagen có nhiều mức cấu trúc. Collagen là loại protein cấu trúc chính yếu, chiếm khoảng 25% - 35% tổng lượng protein trong cơ thể ở các động vật có xương sống. Collagen được phân bố trong các bộ phận như da, cơ, gân, sụn, răng, hệ thống mạch máu của động vật và có mặt trong các lớp màng liên kết bao quanh các cơ và là thành phần chính của dây chằng và gân. Collagen được trích ly chủ yếu từ da, xương của các loài gia súc và lợn.

Hiện nay, collagen, đặc biệt là collagen từ cá (da cá, vảy cá) hiện đang được quan tâm nghiên cứu như một loại vật liệu sinh học mới thay thế collagen từ động vật vì nguồn collagen từ cá này an toàn, vừa giải quyết được vấn đề phế thải từ cá sau khi chế biến đồng thời mang lại hiệu quả kinh tế cho ngành thủy sản.

Trong số những nguồn thay thế, cá cung cấp một nguồn nguyên liệu thô tốt nhất vì:

- Dễ tìm, sẵn có để sử dụng.
- Không có sự lây truyền bệnh.
- Không gặp phải trở ngại về mặt tôn giáo.
- Có khả năng thu được collagen với hiệu suất cao.

Khoảng 70% tổng trọng lượng cơ thể của cá bị bỏ đi dưới dạng các phế phẩm như da, xương, vây, đầu, vảy, ruột, v.v. trong suốt quá trình chế biến. Việc tận dụng những chất thải này có thể nâng giá trị kinh tế của các loài cá lên. Collagen trong da, vảy, xương và vây chiếm phần lớn trong tổng lượng collagen trong cơ thể cá.

Trong các công trình nghiên cứu, qui trình thu nhận collagen gồm 3 giai đoạn chính:

❖ Giai đoạn phá vỡ tế bào:

Các phân tử collagen không có khả năng đi qua màng tế bào, vì vậy cần phá vỡ cấu trúc tế bào để chuyển collagen vào dung dịch. Các biện pháp được sử dụng có thể là các biện pháp cơ học như tiến hành nghiền với bột thủy tinh hoặc cát thạch anh, sau đó tiến hành đồng hóa (homogenizator). Thiết bị này có chày thủy tinh gắn với mô-tơ quay và có thể điều chỉnh tốc độ quay theo yêu cầu. Các tế bào nằm giữa chày thủy tinh và thành cối sẽ bị phá vỡ.

Sử dụng các dung môi hữu cơ như butanol, axeton kết hợp với các chất tẩy rửa. Các hóa chất này giúp cho việc phá vỡ các bào quan của tế bào.

❖ Giai đoạn tách chiết collagen:

Sau khi phá vỡ cấu trúc tế bào, việc tách chiết collagen được tiến hành dễ dàng hơn, collagen có thể được chiết tách bằng axit hoặc bằng enzym, quá trình tách chiết collagen được thực hiện trong các reactor ở nhiệt độ lạnh và trong điều kiện vô trùng, kết hợp khuấy trộn liên tục để đảm bảo collagen thu được có chất lượng tốt.

❖ Giai đoạn tinh sạch collagen:

Trong dịch chiết thô, ngoài collagen còn có các protein tạp, các lipit, muối khoáng, để loại các thành phần này cần sử dụng các biện pháp khác nhau.

Để loại muối khoáng thường dùng phương pháp thẩm tích hoặc li tâm. Thẩm tích là sự khuếch tán vi phân qua màng vốn không thấm đối với những chất keo hòa tan (protein, một số polysacarit) nhưng thấm đối với các dung dịch tinh thể (các muối của hợp chất hữu cơ có trọng lượng phân tử thấp). Để loại các protein tạp có thể tiến hành kết tủa phân đoạn bằng muối trung tính hoặc các dung môi hữu cơ hay dùng các phương pháp sắc ký trao đổi ion, điện di, phương pháp lọc gel.

WO2015/151030 A1 đề cập đến quy trình chiết tách collagen/gelatin từ rong biển. US 6,271,350 B1 và WO 2010/074552 A1 đề cập đến collagen chiết tách từ da cá. TW20040132627 đề cập đến collagen chiết tách từ vảy cá bằng phương pháp enzym. EP 2 644 620 B1 đề cập đến collagen chiết tách từ vảy cá rô phi bằng các dung dịch kiềm và axit, và ứng dụng tạo màng trong suốt từ collagen không phải dạng sợi. WO 2017/122216 A1 đề cập đến collagen chiết tách từ vảy cá nước ngọt bằng các dung dịch kiềm và axit, và ứng dụng tạo các sản phẩm chitosan – collagen với các hình thái khác nhau.

Ấn phẩm “Preparation and Characterisation of Collagen from Freshwater Fish Scales” (Food and Nutrition Sciences, 2011, 2, 818-823) đề cập phương pháp tách chiết collagen từ vảy cá chép theo các bước như làm sạch sơ bộ, khử protein bằng dung

dịch NaCl 10% trong 24 giờ, khử khoáng bằng dung dịch HCl 0,4M trong 90 phút và tách collagen bằng cách ngâm vảy đã khử khoáng trong axit axetic 0,5M trong 2 ngày. Ngoài ra, tài liệu này còn mô tả quá trình thủy phân mẫu collagen và mô tả thành phần axit amin của mẫu collagen.

Ấn phẩm “Saponin Isolation as Main Ingredients of Insecticide and Collagen Type I from Crown of Thorn-Starfish (*Acanthaster planci*)” (IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 89 (2017) 012032) đề cập đến phương pháp chiết tách collagen loại I từ loài sao biển gai *A. planci* (“Crown of Thorn-Starfish). Tài liệu này cũng mô tả rằng hiệu suất phân tách tốt nhất với dung môi $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0,2M. Ngoài ra, tài liệu này còn mô tả thành phần axit amin của collagen thu được.

Ấn phẩm: “Extraction of Collagen from Fish Waste and Determination of its amino acid composition” (ICAMS 2014 – 5th International Conference on Advanced Materials and Systems, 7 pages) trình bày phương pháp tách chiết collagen từ phế phẩm cá, bao gồm vảy cá, phương pháp này về cơ bản bao gồm các bước: bảo quản phế phẩm cá bằng cách sử dụng muối; điều chế sản phẩm thủy phân collagen bằng cách thủy phân bằng enzym-axit và enzym-bazơ; xác định thành phần collagen thu được. Ngoài ra, tài liệu này còn mô tả rằng sản phẩm thủy phân collagen có thể thu được bằng cách thủy phân bằng các đơn axit (H_2SO_4 , HCl hoặc H_3PO_4), thủy phân bằng đơn bazơ (NaOH, KOH hoặc $\text{Ba}(\text{OH})_2$), thủy phân bằng enzym hoặc vi khuẩn.

Ấn phẩm “Technology for Extracting Effective Components form Fish Scale” (Journal of Food Science and Engineering 7 (2017) 351-358) mô tả các kỹ thuật chiết tách hiệu quả các thành phần, bao gồm collagen và hydroxyapatit, từ vảy cá, ví dụ, kỹ thuật tách chiết collagen bằng axit, kỹ thuật tách chiết collagen bằng kiềm, kỹ thuật tách chiết collagen bằng enzym. Tài liệu này còn mô tả rằng để tối ưu hóa tỷ lệ/hiệu suất thu được collagen, có thể sử dụng các phương pháp hỗ trợ, ví dụ, siêu âm, vi sóng, hoặc siêu vi hạt.

Có thể thấy các sáng chế và ấn phẩm này không mô tả một cách cụ thể collagen với thành phần axit amin, trình tự axit amin, đường kính sợi như được mô tả theo sáng chế, và do đó collagen nêu trong đơn được xem là đáp ứng điều kiện tính mới so với các sáng chế và ấn phẩm nêu trên. Ngoài ra các sáng chế và ấn phẩm này chưa đề cập đến collagen chiết tách từ hỗn hợp vảy cá nước ngọt Việt Nam. Mỗi một đa dạng sinh học sẽ tác động đến sự trưởng thành của cá nước ngọt là khác nhau. Ở các nhiệt độ và môi trường sống khác nhau sẽ dẫn đến thành phần và cấu tạo của vảy cá là khác nhau. Do vậy, sáng chế này đề cập đến phương pháp chiết tách collagen từ hỗn hợp vảy cá nước ngọt Việt Nam và collagen, thu được từ phương pháp này là các sản phẩm hoàn

toàn mới. Đồng thời, sáng chế cũng đề cập đến ứng dụng collagen trong chế tạo vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế được đề xuất để giải quyết các vấn đề nêu trên.

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp chiết tách collagen từ vảy cá nước ngọt Việt Nam, collagen thu được từ phương pháp này, cụ thể như sau:

- Phương pháp chiết tách collagen gồm các bước sau:

+ Làm sạch vảy cá nước ngọt, loại bỏ chất béo và protein trong vảy cá bằng dung dịch chứa hỗn hợp NaOH 0,2M và Ca(OH)₂ bão hòa theo tỷ lệ khối lượng 20:9 kết hợp khuấy siêu âm tốc độ cao.

+ Tách khoáng bằng hỗn hợp dung dịch axit HCl 0,2M và H₂SO₄ 0,5M theo tỷ lệ thể tích 1:2.

+ Tách collagen bằng dung dịch axit axetic 0,5M, thẩm tích thu collagen tinh khiết.

- Collagen thu được từ phương pháp này là collagen loại I, độ tinh khiết > 99 %, có chứa 20 axit amin với hàm lượng cụ thể trong bảng 2. Collagen có đường kính sợi 0,5 – 1 μm. Collagen là các protein được chọn từ nhóm bao gồm: Hypothetical protein cypCar_00045321, partial [Cyprinus carpio] (khối lượng phân tử 115674 Da); Collagen type I alpha 2 [Carassius auratus] (khối lượng phân tử 127652 Da); Collagen type I alpha 1 [Ctenopharyngodon idella] (khối lượng phân tử 138104 Da); Collagen alpha-1(I) chain isoform X1 [Pygocentrus nattereri] (khối lượng phân tử 137928 Da); Hypothetical protein cypCar_00006571 [Cyprinus carpio] (khối lượng phân tử 136996 Da);

Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất ứng dụng collagen trong chế tạo vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt bằng phương pháp gel ion hóa. Cụ thể là, hạt vật liệu tổ hợp chứa các thành phần dưới đây tính theo % khối lượng:

- Vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt:

+ Collagen	35-45
+ Carrageenan	35-45
+ Allopurinol	10-30

Mô tả vắn tắt hình vẽ kèm theo

Hình 1. Ảnh hiển vi điện tử (SEM) của mẫu collagen thu được theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “tính theo % khối lượng” được dùng trong phần mô tả, trừ khi có quy định khác, được hiểu là tính theo % khối lượng của hạt vật liệu tổ hợp theo sáng chế.

- Collagen được chiết tách từ vảy cá nước ngọt theo phương pháp sau:

(i) hỗn hợp vảy cá nước ngọt được thu gom từ các chợ, rửa với nước sạch, phơi khô, bảo quản trong túi bóng sạch;

(ii) khuấy hỗn hợp vảy cá trong dung dịch hỗn hợp NaOH 0,2M và Ca(OH)₂ bão hòa trong 8 giờ bằng máy khuấy cơ học kết hợp khuấy siêu âm tốc độ cao, sau đó, lọc, rửa với nước sạch để thu được vảy cá hỗn hợp đã được xử lý protein và tạp chất; trong đó tỷ lệ khối lượng của NaOH và Ca(OH)₂ là 20:9.

(iii) khuấy vảy cá hỗn hợp thu được ở bước (ii) trong dung dịch hỗn hợp axit HCl 0,2M và H₂SO₄ 0,5M theo tỷ lệ thể tích là 1:2 để tách khoáng bằng máy khuấy cơ học trong 20 phút, sau đó lọc tách phần dung dịch và phần vảy đã tách khoáng, rửa vảy với nước cất thu được vảy cá đã tách khoáng;

(iv) khuấy vảy cá hỗn hợp thu được ở bước (iii) trong dung dịch axit axetic 0,5 M trong 24 giờ bằng máy khuấy cơ học kết hợp khuấy siêu âm tốc độ cao. Lọc thu dung dịch collagen trong axit axetic, phần chất rắn được thu gom để xử lý chôn lấp;

(v) thêm NaCl rắn vào dung dịch collagen trong axit axetic ở bước (iv), làm lạnh dung dịch để thu collagen từ dung dịch trên. Chiết bằng phễu chiết thu được collagen thô;

(vi) collagen thô được hòa trong axit axetic 1M và kết tinh lại bằng NaCl rắn;

(vi) tiến hành thẩm tích collagen thô ở (vi) bằng màng thẩm tích trong 48 giờ để thu collagen tinh khiết;

(vii) đông khô collagen ở (vi) ở nhiệt độ -20°C thu được collagen tinh khiết ở dạng màng khô, xốp, màu trắng ngà.

Vảy cá nước ngọt sử dụng trong sáng chế là các loại vảy cá trôi, vảy cá chép, vảy cá trắm, vảy cá rô phi, vảy cá diếc, vảy cá quả thu gom tại các chợ trên địa bàn tỉnh Vĩnh Phúc và Hà Nội. Có thể tùy ý sử dụng vảy cá nước ngọt thu gom trên các địa bàn khác.

Các hóa chất được sử dụng theo sáng chế bao gồm NaOH (rắn, độ tinh khiết > 99%), Ca(OH)₂ (rắn, độ tinh khiết > 99%), HCl (lỏng, nồng độ 36,5 %), H₂SO₄ (lỏng, nồng độ 98 %), NaCl (rắn, độ tinh khiết > 99%), axit axetic (lỏng, nồng độ 99,5 %) là các sản phẩm thương mại của Trung Quốc có sẵn trên thị trường.

Màng thẩm tích là sản phẩm thương mại có sẵn trên thị trường.

Nước cất sử dụng trong sáng chế này là nước cất một lần.

Theo một phương án của sáng chế, collagen thu được từ phương pháp nêu trên có các đặc tính kỹ thuật như sau:

+ Cấu trúc: Collagen thu được của sáng chế có cấu trúc dạng sợi, đường kính sợi 0,5 – 1 μm , các sợi collagen tập trung thành bó sợi, kích thước 2,5-4 μm (hình 1). Các nhóm chức trong collagen là NH, amit bậc 1, amit bậc 2, amit bậc 3, CH no (xác định bằng phổ hồng ngoại).

+ Thành phần: Collagen thu được của sáng chế có chứa các nguyên tố C, O, N, S (bảng 1).

Bảng 1. Thành phần các nguyên tố trong collagen thu được của sáng chế được xác định bằng phương pháp phổ tán xạ năng lượng tia X (EDX).

Nguyên tố	% Khối lượng	% Nguyên tử
C	55,41 \pm 1,62	61,34 \pm 1,64
O	28,55 \pm 0,56	23,74 \pm 0,53
N	15,46 \pm 1,17	14,68 \pm 1,15
S	0,58 \pm 0,10	0,24 \pm 0,04

+ Hàm lượng axit amin: Collagen thu được của sáng chế có chứa 20 axit amin (bảng 2).

Bảng 2. Hàm lượng các axit amin trong dung dịch collagen thu được của sáng chế xác định bằng phương pháp thử H.HD.QT.046 (Sắc ký lỏng hiệu năng cao - HPLC)

STT	Axit amin	Đơn vị	Hàm lượng
1	Threonin	mg/mL	1,704
2	Prolin	mg/mL	0,487
3	Axit glutamic	mg/mL	0,550
4	Arginin	mg/mL	0,425
5	Serin	mg/mL	0,357
6	Alanin	mg/mL	0,218
7	Glyxin	mg/mL	0,140
8	Axit aspartic	mg/mL	0,099
9	Cystin	mg/mL	0,059
10	Histidin	mg/mL	0,047
11	Lysin	mg/mL	0,043
12	Leuxin	mg/mL	0,039
13	Phenylalanin	mg/mL	0,028
14	Valin	mg/mL	0,026
15	Isoleuxin	mg/mL	0,022

16	Methionin	mg/mL	0,020
17	Tryptophan	mg/mL	0,012
18	Tyrosin	mg/mL	0,007

+ Kết quả điện di SDS-PAGE đã pha loãng mẫu collagen cho thấy kiểu băng điển hình của collagen Type 1 với 2 băng vạch có giá trị khối lượng phân tử ước lượng lần lượt là 129kDa và 139kDa.

+ Kết quả xác định trình tự axit amin dựa trên cơ sở dữ liệu NCBIprot đã xác định và nhận diện được 5 protein thuộc nhóm protein da-vảy (collagen) của họ cá có hệ số bắt cặp lớn bao gồm:

1/ Protein: hypothetical protein cypCar_00045321, partial [Cyprinus carpio]

- + Số protein trong cơ sở dữ liệu: KTF73577.1
- + Điểm số protein: 318
- + Khối lượng (M_r) (Da) 115674
- + pI được tính toán: 9,18
- + Trình tự axit amin: SEQ ID NO. 1

2/ Protein: collagen type I alpha 2 [Carassius auratus]

- + Số protein trong cơ sở dữ liệu: BAG72201.1
- + Điểm số protein: 294
- + Khối lượng (M_r) (Da) 127652
- + pI được tính toán: 9,41
- + Trình tự axit amin: SEQ ID NO. 2

3/ Protein : collagen type I alpha 1 [Ctenopharyngodon idella]

- + Số protein trong cơ sở dữ liệu: ADK35755.1
- + Điểm số protein: 231
- + Khối lượng (M_r) (Da): 138104
- + pI được tính toán: 5,44
- + Trình tự axit amin: SEQ ID NO. 3

4/ Protein: collagen alpha-1(I) chain isoform X1 [Pygocentrus nattereri]

- + Số protein trong cơ sở dữ liệu: XP_017540674.1

- + Điểm số protein: 149
- + Khối lượng (M_r) (Da): 137928
- + pI được tính toán: 5,46
- + Trình tự axit amin: SEQ ID NO. 4

5/ Protein: hypothetical protein cypCar_00006571 [Cyprinus carpio]

- + Số protein trong cơ sở dữ liệu: KTG43775.1
- + Điểm số protein: 101
- + Khối lượng (M_r) (Da): 136996
- + pI được tính toán: 5,60
- + Trình tự axit amin: SEQ ID NO. 5

Theo một phương án của sáng chế, vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt chứa các thành phần dưới đây tính theo % khối lượng:

+ Collagen	35-45
+ Carrageenan	35-45
+ Allopurinol	10-30

Collagen sử dụng để chế tạo vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt trong sáng chế này là collagen được chiết tách từ hỗn hợp vảy cá nước ngọt Việt Nam theo phương pháp trên. Hàm lượng collagen trong vật liệu tổ hợp dạng hạt nêu trên chiếm 35-45 % khối lượng. Nếu sử dụng lượng collagen dưới 35 %, vật liệu thu được có dạng màng, không ra được dạng hạt. Nếu lượng collagen trên 45 %, vật liệu thu được bị hút ẩm và chảy, không ra được dạng hạt.

Carrageenan sử dụng để chế tạo vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt trong sáng chế này là sản phẩm thương mại có sẵn trên thị trường. Hàm lượng carrageenan trong vật liệu tổ hợp dạng hạt nêu trên chiếm 35-45 % khối lượng. Nếu sử dụng lượng carrageenan dưới 35 % hay trên 45 %, vật liệu thu được có dạng màng, không ra được dạng hạt.

Allopurinol sử dụng để chế tạo vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt trong sáng chế này là sản phẩm thương mại có sẵn trên thị trường. Hàm lượng allopurinol trong vật liệu tổ hợp dạng hạt nêu trên chiếm 10-30% khối lượng.

Nếu sử dụng lượng allopurinol dưới 10 % hoặc trên 30 %, vật liệu thu được có kích thước hạt lớn và cỡ hạt không đồng đều.

Vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt được chế tạo theo phương pháp sau:

- (i) Collagen được hòa tan trong axit axetic 5 % sử dụng máy khuấy từ;
- (ii) Carragennan được hòa tan trong nước cất sử dụng máy khuấy từ;
- (iii) Allopurinol được hòa tan trong dung dịch NaOH sử dụng máy khuấy từ;
- (iv) Đổ dung dịch thu được ở (iii) vào dung dịch thu được ở (ii), khuấy siêu âm trên thiết bị khuấy siêu âm tốc độ cao ở tốc độ 20000 vòng/phút trong thời gian 30 phút. Tiếp theo, thêm dung dịch KCl 1% vào dung dịch này và đun nóng dung dịch đến nhiệt độ 70°C để thực hiện quá trình gel hóa carrageenan. Sau đó, để nguội dung dịch về đến nhiệt độ phòng.
- (v) Nhỏ từ từ dung dịch thu được ở (i) vào dung dịch thu được ở (iv) với tốc độ 0,5ml/phút, khuấy siêu âm ở tốc độ 20000 vòng/phút trong thời gian 60 phút thu được dung dịch trong suốt.
- (vi) Dung dịch thu được ở (v) được để vào ngăn đá tủ lạnh, sau đó đông khô ở nhiệt độ -20°C trong 48 giờ thu được vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt.

Các đặc trưng của collagen và nanohydroxyapatit thu được ở sáng chế này được so sánh với các vật liệu tương tự thể hiện trong Bảng 4 và Bảng 5 dưới đây.

Bảng 4. Các đặc trưng của collagen của sáng chế

STT	Tính chất	Theo sáng chế này	Vật liệu tương tự (collagen của sáng chế WO 2017/122216 A1)
1	Loại collagen	Loại I	Loại I
2	Các nhóm chức trong collagen	-N-H, -C-H, -C=O, -NH ₂ , -C-O-	-N-H, -C-H, -C=O, -NH ₂ , -C-O-
3	Đường kính sợi collagen	400-500 nm	-
4	Thành phần nguyên tử trong collagen	C, O, N, S	-

5	Axit amin trong collagen	20 axit amin (Threonin, Prolin, Axit glutamic, Arginin, Serin, Alanin, Glyxin, Axit aspartic, Cystin, Histidin, Lysin, Leuxin, Phenylalanin, Valin, Isoleuxin, Methionin, Tryptophan, Tyrosin)	17 axit amin (Axit aspartic, Glyxin, Hydroxyprolin, Axit glutamic, Alanin, Prolin, Lysin, Valin, Isoleuxin, Methionin, Leuxin, Serin, Threonin, Tyrosin, Histidin, Phenylalanin, Arginin)
6	Khối lượng phân tử ước lượng (kDa)	115 - 139	120- 150
7	Trình tự axit amin	SEQ ID NO : 1-5	-

Từ kết quả ở bảng 4 cho thấy collagen của sáng chế có một số đặc điểm khác biệt so với collagen thu được từ các sáng chế hay ấn phẩm khác. Cụ thể collagen thu được của sáng chế có đường kính sợi 0,5-1 μm , có chứa 20 axit amin với hàm lượng cụ thể trong bảng 2; có trình tự axit amin: SEQ ID NO : 1-5;

Các đặc trưng của vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt thu được ở sáng chế này được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5: Các đặc trưng của collagen/carrageenan/allopurinol của sáng chế

STT	Tính chất	Trị số đo được	Vật liệu tương tự (allopurinol)
1	Trạng thái/hình dạng	Dạng bột/hình cầu	Dạng bột/hình que
2	Các nhóm chức trong vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt	-CO-NH-, -N=C-N, -C=N, -C=O, -C-H, -C-N, -O-H, -N-H	-CO-NH-, -N=C-N, -C=N, -C=O, -C-H, -C-N
3	Đường kính vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt	1-9 μm	1-50 μm
4	Độ tan của vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt trong dung dịch đệm pH	54-85	12-13

7,4 sau 30 giờ ngâm (%)		
-------------------------	--	--

Từ bảng 5 có thể thấy kết hợp collagen cùng carrageenan để mang được chất allopurinol có kích thước hạt nhỏ hơn đáng kể và độ tan tốt hơn 3-6 lần so với được chất ban đầu.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất 2 g collagen

Hỗn hợp vảy cá (vảy cá trôi, vảy cá chép, vảy cá trắm, vảy cá rô phi, vảy cá diếc, vảy cá quả thu gom tại các chợ trên địa bàn tỉnh Vĩnh Phúc và Hà Nội) được rửa sạch với nước và phơi khô dưới nắng. Cân 1 kg vảy cá khô cho vào bình nhựa có chứa 10 lít dung dịch hỗn hợp NaOH 0,2M và Ca(OH)₂ bão hòa (khối lượng NaOH là 80 gam, khối lượng Ca(OH)₂ là 36 gam). Lắp thiết bị khuấy cơ, khuấy liên tục hỗn hợp có chứa vảy cá ở trên trong 8 giờ. Sau đó, lọc thu vảy cá, phần dung dịch đổ vào bình khác để xử lý trung hòa trước khi thải ra môi trường. Vảy cá được rửa sạch bằng nước đến môi trường trung tính. Sau đó, thêm 4 lít hỗn hợp dung dịch axit HCl 0,2M và H₂SO₄ 0,5M (thể tích dung dịch HCl/H₂SO₄ = 1/2) vào vảy cá ở trên, khuấy hỗn hợp trong 20 phút. Lọc thu vảy cá và phần dịch lọc để riêng. Vảy cá tiếp tục được rửa sạch với nước thường, sau đó rửa nước cất. Thêm 3 lít dung dịch axit axetic 0,5 M vào vảy cá ở trên, khuấy hỗn hợp liên tục trong 24 giờ.

Phần vảy cá khuấy với dung dịch axit axetic 0,5M ở phía trên sau 24 giờ được đem đi lọc trên phễu lọc hút chân không. Phần vảy cứng còn lại được gom riêng để đem đi chôn lấp. Phần dịch lọc được lọc 2 lần, sau đó làm lạnh dịch lọc bằng đá, thêm NaCl rắn (khối lượng bằng 10 % khối lượng dịch lọc) vào dịch lọc ở trên thu được collagen kết tủa bông màu trắng nổi lên phía trên bề mặt dung dịch. Dùng phễu chiết thu collagen thô. Collagen thô được hòa tan trong axit axetic 1M và kết tinh lại bằng NaCl 10%. Tiến hành thẩm tích collagen thô ở trong 48 giờ để thu collagen tinh khiết. Đông khô collagen ở nhiệt độ -20°C thu được collagen tinh khiết ở dạng màng khô, xốp, màu trắng ngà. Khối lượng collagen tinh khiết thu được là 2g.

Ví dụ 2: Chế tạo 5 g vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt.

Hòa tan 2 g collagen trong 200 ml dung dịch axit axetic 5 % thu được dung dịch 1. Hòa tan 2 g carrageenan trong 50 ml nước cất thu được dung dịch 2. Hòa tan 1 g allopurinol trong 20 ml dung dịch NaOH 1M thu được dung dịch 3. Đổ dung dịch 3 vào dung dịch 2, khuấy dung dịch hỗn hợp này trên thiết bị khuấy siêu âm tốc độ cao ở tốc độ 20000 vòng/phút trong thời gian 30 phút. Tiếp theo, thêm 3 ml dung dịch KCl 1% vào dung dịch này và đun nóng dung dịch đến nhiệt độ 70°C để thực hiện quá trình gel hóa carrageenan. Sau đó, để nguội dung dịch về đến nhiệt độ phòng thu được dung

dịch 4. Nhỏ từ từ dung dịch 1 vào dung dịch 4 với tốc độ 0,5ml/phút, tiếp tục khuấy siêu âm ở tốc độ 20000 vòng/phút trong thời gian 60 phút thu được dung dịch trong suốt. Để dung dịch trên vào ngăn đá tủ lạnh, sau đó đông khô ở nhiệt độ -20°C trong 48 giờ thu được vật liệu tổ hợp collagen/carrageenan/allopurinol dạng hạt.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Collagen thu được ở sáng chế này có một số đặc trưng, tính chất nổi bật về kích thước, hàm lượng axit amin và trình tự axit amin so với các loại collagen được ở các sáng chế hay ẩn phẩm khác. Điểm đặc biệt trong phương pháp chiết tách collagen đó là việc sử dụng các dung dịch hỗn hợp $\text{NaOH} + \text{Ca}(\text{OH})_2$ và $\text{HCl} + \text{H}_2\text{SO}_4$ kết hợp khuấy siêu âm tốc độ cao trong quá trình chiết tách thu collagen. Đồng thời, sáng chế sử dụng nguồn nguyên liệu ban đầu là hỗn hợp các loại vảy cá nước ngọt Việt Nam để chiết tách đồng thời collagen. Việc sử dụng hỗn hợp các loại vảy cá nước ngọt phù hợp với các hoạt động buôn bán tại các chợ, các quầy thực phẩm, các công ty thực phẩm ở nước ta vì khi sơ loại vảy cá, người ta không tách riêng từng loại vảy cá mà để lẫn lộn các loại vảy này với nhau. Thông thường các các loại vảy cá này được thải trực tiếp ra môi trường mà không qua xử lý, phân loại. Điều này góp phần gia tăng ô nhiễm môi trường vì các loại vảy cá này chứa các chất béo và protein dễ bị phân hủy tạo ra mùi khó chịu. Vì vậy, việc xử lý vảy cá để tạo ra các sản phẩm có ích như collagen có ý nghĩa về mặt khoa học và thực tiễn. Việc làm này giúp giảm thiểu ô nhiễm môi trường từ vảy cá. Về mặt kinh tế, giá thành 250 mg collagen được chiết tách từ da cá do công ty hóa chất Sigma Aldrich cung cấp là khoảng 13 – 14 triệu đồng. Như vậy, chiết tách được collagen theo sáng chế sử dụng các hóa chất rẻ tiền, sẵn có sẽ mang lại hiệu quả kinh tế đáng kể cho ngành công nghiệp thủy sản.

Việc ứng dụng collagen trong chế tạo vật liệu tổ hợp mang được chất cũng cho thấy các được chất được mang bởi collagen kết hợp 1 số polyme thiên nhiên khác có kích thước nhỏ hơn đáng kể so với được chất ban đầu. Điều này giúp cải thiện độ tan và sinh khả dụng của được chất khi được mang bởi các polyme.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp chiết tách collagen từ các loại vảy cá nước ngọt Việt Nam bao gồm các bước:

(i) hỗn hợp vảy cá nước ngọt được thu gom từ các chợ, rửa với nước sạch, phơi khô, bảo quản trong túi bóng sạch;

(ii) khuấy hỗn hợp vảy cá trong dung dịch chứa hỗn hợp NaOH 0,2M và Ca(OH)₂ bão hòa trong 8 giờ bằng máy khuấy cơ học kết hợp khuấy siêu âm tốc độ cao, sau đó, lọc, rửa với nước sạch để thu được vảy cá hỗn hợp đã được xử lý protein và tạp chất; trong đó tỷ lệ khối lượng của NaOH và Ca(OH)₂ là 20:9;

(iii) khuấy vảy cá hỗn hợp thu được ở bước (ii) trong dung dịch chứa hỗn hợp axit HCl 0,2M và H₂SO₄ 0,5M theo tỷ lệ thể tích là 1:2 để tách khoáng bằng máy khuấy cơ học trong 20 phút, sau đó lọc tách phần dung dịch và phần vảy đã tách khoáng, rửa vảy với nước cất thu được vảy cá đã tách khoáng;

(iv) khuấy vảy cá hỗn hợp thu được ở bước (iii) trong dung dịch axit axetic 0,5 M trong 24 giờ bằng máy khuấy cơ học kết hợp khuấy siêu âm tốc độ cao; Lọc thu dung dịch collagen trong axit axetic, phần chất rắn được thu gom để xử lý chôn lấp;

(v) thêm NaCl rắn vào dung dịch collagen trong axit axetic ở bước (iv), làm lạnh dung dịch để thu collagen từ dung dịch trên; Chiết bằng phễu chiết thu được collagen thô;

(vi) collagen thô được hòa trong axit axetic 1M và kết tinh lại bằng NaCl 10% rắn;

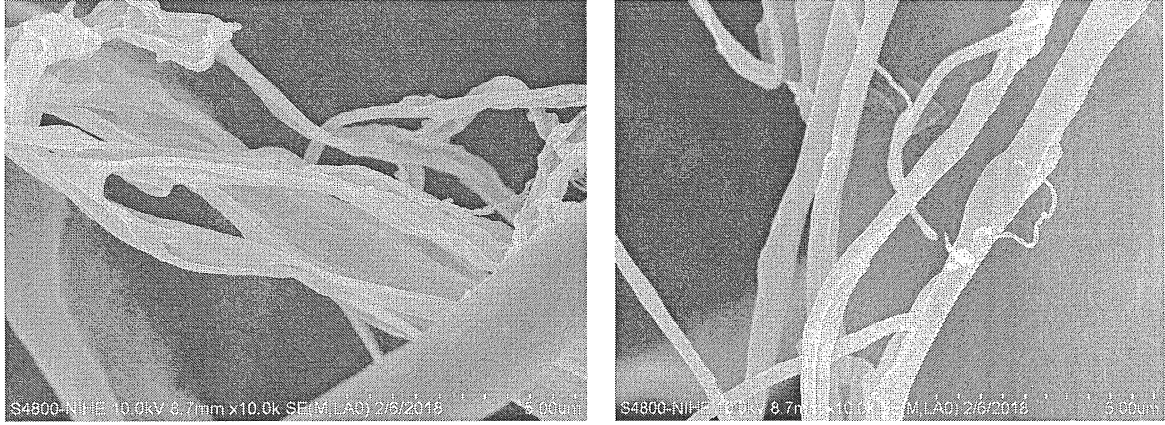
(vi) tiến hành thẩm tích collagen thô ở (vi) bằng màng thẩm tích trong 48 giờ để thu collagen tinh khiết;

(vii) đông khô collagen ở (vi) ở nhiệt độ -20°C thu được collagen tinh khiết ở dạng màng khô, xốp, màu trắng ngà.

2. Collagen được chiết tách từ hỗn hợp vảy cá nước ngọt Việt Nam thu được bằng phương pháp theo điểm 1, trong đó, collagen này có độ tinh khiết > 99%, là collagen loại I, đường kính sợi 0,5-1 μm, chứa 20 loại axit amin; có trình tự axit amin là hỗn hợp của các protein có trình tự SEQ ID NO: 1-5.

3. Vật liệu tổ hợp ở dạng hạt được tạo ra bằng phương pháp gel ion hóa, vật liệu này có thành phần bao gồm (% khối lượng):

- collagen theo điểm 2	35-45
- carrageenan	35-45, và
- allopurinol	10-30.



Hình 1

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Viện kỹ thuật nhiệt đới (VN)
- <120> PHƯƠNG PHÁP CHIẾT TÁCH COLAGEN TỪ VẢY CÁ NƯỚC NGỌT VIỆT NAM, COLAGEN THU ĐƯỢC TỪ PHƯƠNG PHÁP NÀY VÀ VẬT LIỆU TỔ HỢP CHỨA COLAGEN NÀY
- <130> 1-2018-04660
- <160> 5
- <170> Patent trong phiên bản 3.3
- <210> 1
- <211> 1227
- <212> Protein
- <213> Cá nước ngọt
- <220>
- <223> collagen Hypothetical protein cypCar_00045321, partial [Cyprinus carpio]

<400>

1	MGPQGFQGH	GEPGEPGQAG	AVGSRGPPGP	PGKNGDDGNN	GRPGKPGDRG
51	VPGAQGARGF	PGTPGLPGMK	GHRGYTGLDG	RKGEPGAAGL	KGENGAAGSN
101	GTPGQRGARG	LPGERGRVGP	SGPAGARGAD	GNTGPAGPAG	PLGAAGPPGF
151	PGAPGPKGEI	GPAGPTGPPG	PQQQRGEPGT	NGAVGPVGGP	GNPGANGING
201	AKGAAGTPGV	AGAPGFPGPR	GGPGPQGPSG	ASGPRGLAGD	PGPVGVKGD
251	GVKGEPGSSG	PQGPPGPSGE	EGKRGSTGEQ	GPTGAVGLRG	PRGMPPGARGA
301	TGTPGARGPP	GDAGRAGEPG	LVGARGLPGS	PGSSGPPGKE	GPVGLPQQDG
351	RSGPPGPTGP	RGQPGNIGFP	GPKGASGEAG	KPGEKGPSGP	TGLRGLPGPD
401	GNNGPAGPVG	LAGAPGEKGE	QGPSGAPGFQ	GLPGPAGPVG	EAGKPGDRVS
451	IHGSDSTQLM	QFLVHLHNTG	CIVSCKSLQI	FNISQQGIPG	DQGVSGPAGV
501	KGERGNPGPA	GASGAQGPIG	ARGVAGTPGP	DGNKGEPGAA	GAAGAPGHQG
551	AAGMPGERGT	AGTPGPKGEK	GELGYRGLG	NAGRDGARGA	PGPSGPPGPA
601	GANGDKGETG	SFGPPGPAGP	RGSPGERGES	GPAGPSGFAG	PPGADGQTGQ
651	RGEKGPAGGK	GDAGPPGPAG	PVGNTGPLGA	AGPAGPPGAR	GDSGPPGLTG
701	FPGAAGRVP	PGPAGIVGPP	GLTGAPGKDG	PRGARGDVGP	AGPPGENGLI
751	GPPGLAGEKG	SPGEAGPAGA	PGSAGPQQQL	GSQGFSGLP	SRGDRGLPGG
801	PGAVGEPGRV	GPAGAPGPRG	PIGNIGMPGM	TGPQGEAGRE	GSPGNDGPPG
851	RPGAAGLKGD	RGEPGSPGTA	GPVGAPGPNG	PSGAVGRPGN	RGESGPSGSV
901	GPAGAVGARG	APGPAGPRGE	KGVAGDKGER	GMKGLRGHPG	LQGMPPGNH
951	SGDSGPAGIA	GPAGPRGPAG	PNGPPGKDGS	NGMPGAIGPP	GHRGPPGHVG
1001	PSGPPGSPGL	PGPAGPAGGG	YDTSGGYDEY	RADQASLRAK	DYEVDATIKS
1051	LNTQIENLLS	PEGSKKNPAR	TCRDIRLSHP	EWSSGFYWID	PNQGCAMDAI
1101	KAYCDFSTGQ	TCIHPHESI	PRKNWYRGSQ	EKKHIWFGET	INGGTEFGYN
1151	DETLSPQSMA	TQLAFMRLLA	NQAVQNITYH	CKNSIAYMDA	ENGNLKKAVL
1201	LQGSNDVELR	AEGNSRFTFS	VLEDGCS		

- <210> 2
- <211> 1352
- <212> Protein
- <213> Cá nước ngọt
- <220>
- <223> collagen type I alpha 2 [Carassius auratus]

<400>

1	MLSFVDTRIL	LLLAVTSYLA	SCQSGLRGPK	GPRGERGPKG	PDGKPGRPGH
51	PGPPGPPGPP	GLGGNFAAQY	DGAKGPEPGP	GPIGLMGRPG	PSGPPGAPGP
101	QGFQGHAGEP	GEPGQAGAVG	SRGPPGPPGK	NGDDGNNGRP	GKPGDRGVPG
151	AQGARGFPPT	PGLPGMKGHR	GYTGLDGRKG	ELGAAGLKGE	NGAAGANGTP
201	GQRGARGLPG	ERGRVGPSPG	AGARGADGNT	GPAGPAGPLG	AAGPPGFPGA
251	PGPKGEIGAA	GPTGSPGPQG	QRGEPGTNGA	VGPAGPPGNP	GANGINGAKG
301	AAGTPGVAGA	PGFPGPRGGP	GPQGPSGASG	PRGLAGDPPG	VGVKGDSDGVK
351	GEPGSSGPQG	PPGPSGEEGK	RGSTGEQGAT	GPAGLRGPRG	AAGTRGLPGM
401	AGRSRPMGMP	GARGATGSPG	ARGPPGDAGR	AGEPGLTGAR	GLPGSPGSSG
451	PPGKEGPVGP	SGQDGRSGPP	GPTGPRGQPG	NIGFPGPKGA	TGEAGKPGEK
501	GPAGPTGLRG	LPGPDGNNGP	AGPVGLAGAP	GEKGEQGPSG	APGFQGLPGP
551	AGPVGEGAKP	GDRGIPGEQG	ASGPAGVKGE	RGGPGPAGAA	GAQGPAGARG
601	PAGTPGPDGN	KGEPGAAGAA	GGPGHQGAAG	MPGERGTAGT	PGPKGEKGEQ
651	GYRGLEGNAG	RDGARGAPGP	SGPPGPAGAN	GDKGETGSFG	PPGPAGQRGT
701	PGERGESGPA	GPSGFAGPPG	ADGQTGQRGE	KGPAGGKGDV	GPPGPAGPAG
751	NTGPLGAAGP	AGPPGARGDS	GPPGLTGFPG	AAGRVGPPGP	AGIVGPSGPT
801	GAPGKDGPRG	ARGDVGPAGP	PGENLIGPP	GLAGEKGSFG	EPGPQGAPGS
851	AGPQQQLGSQ	GFNGLPGSRG	DRGLPGGPGA	VGEPGRVPGA	GAPGPRGPIG
901	NIGMPGMTGP	QGEAGREGSP	GNDGPPGRPG	AAGLKGDGRG	PGSAGPSGPA
951	GAPGPNGPSG	AAGRPNRGE	SGPSGSAGPA	GAAGARGAPG	PAGPRGEKGV
1001	AGDKGERGMK	GLRGHPGLQG	MPGPNGPSGD	SGPAGIAGPA	GPRGPAGPNG
1051	PPGKDGNSGM	PGAIGPPGQR	GPPGYVGPSP	PPGSPGLPGP	AGPAGGGYDT
1101	SGGYDEYRAD	QGSLRAKDYE	VDAIKSLNT	QIENLLSPEG	SKKNPARTCR
1151	DIRLSHPEWS	SGFYWIDPNQ	GCTMDAIKAY	CDFSTGQTCI	HPHPESIPRK
1201	NWYRGSQEKK	HIWFGETING	GTEFGYNDET	LSPQSMATQL	AFMRLLANQA
1251	VQNITYHCKN	SIAYMDAENG	NLKKAVLLQG	SNDVELRAEG	NSRFTFSVLE
1301	DGCSRHTGQW	SKTVIEYRTN	KPSRPLIDI	APLDIGGADQ	EFGLDIGPVC
1351	FK				

<210> 3

<211> 1448

<212> Protein

<213> Cá nước ngọt

<220>

<223> collagen type I alpha 1 [Ctenopharyngodon idella]

<400>

1	MFSFDIRLA	LLLSATVLLA	RGQGEDDRTG	GSCTLDGQVY	NDRDVWKPEP
51	CQICVCDST	VMCDEVICED	TTDCPNPVI	HDECCPVC	DDFQEPSVEG
101	PRGTPGEKGD	RGPAGPPGND	GIPGQPLPG	PPGPPGPPGL	GGNFSPQMSG
151	GFDEKSGGAM	AVPGPMGPMG	PRGPPGPPGT	PGPQGFTGPP	GEPGEAGAPG
201	PMGPRGAAGP	PGKNGEDGES	GKPRGPRGERG	PPGPQGARGF	PGTPGLPGIK
251	GHRGFSGLDG	AKGDTGPSGP	KGEAGAPGEN	GTPGAMGPRG	LPGERGRAGP
301	PGAAGARGND	GAAGAAGPPG	PTGPAGPPGF	PGGPGAKGEV	GPQGARGAEG
351	PQGARGEAGN	PGPAGPAGPA	GNNADGAAG	PKGSPGTPGI	AGAPGFPPGR
401	GPPGPSGAAG	APGPKGNTGE	VGAPGAKGEA	GAKGEAGAQQ	VQGGPPGPPGE
451	EGKRGARGEP	GAAGGRGPPG	ERGAPGARGF	PGADGSAGPK	GAPGERGGPG
501	VVGPKGATGE	PGRNGEPGMP	GSKGMTGSPG	SPGPDGKTGP	SGTPGQDGRP
551	GPPGPVVGARG	QPGVMGFPGP	KGAAGEAGKP	GERGVMGAVG	ATGAPGKDGD
601	VGAPGAPGPA	GPAGERGEQG	PAGPPGFQGL	PGPQGATGEP	GKSQEQQVPG
651	EAGAPGPAGS	RGDRGFPPGER	GAPGPAGPAG	ARGSPGSAGN	DGAKGDAGAP
701	GAPGAQPPG	LQMPGERGA	AGLPGLKGD	GDQGAAGTDG	APGKDGIRGM
751	TGPIGPPGPA	GAPGDKGETG	APGLVGPTGA	RGPPGERGET	GAPGPAGFAG
801	PPGADGLPGA	KGEAGDNGAK	GDAGSPGPAG	ATGAPGPQGP	VGATGPKGAR
851	GAAGPPGATG	FPGAAGRVP	PGPAGNAGPP	GPPGPGGKEG	QKGNRGETGP
901	AGRTGEVGAP	GPPGAPGEKG	TPGAEGPTGP	AGIPGPQIA	GQRGIVGLPG
951	QRGERGFPL	PGPSGEPGKQ	GPSGSPGERG	PPGPMGPPGL	AGPPGEPGRE

1001	GTPGNEGSAG	RDGAPGPKGD	RGETGAAGTP	GAPGPPGAPG	PVGPAGKTGD
1051	RGESGPAGPA	GAAGPAGPRG	PAGPAGARGD	KGETGEAGER	GMKGHRGFTG
1101	MQGPPGPPGP	SGEPGPAGAS	GPAGPRGPAG	SSGPAGKDGM	SGLPGPIGPP
1151	GPRGRNGEIG	PAGPPGAPGP	PGPPGPSGGG	FDIGFIAQPQ	EKAPDPFRHF
1201	RADDANVMRD	RDLEVDTTLK	SLSQQIESIM	SPDGTKKNPA	RTCRDLKMCH
1251	PDWKSGEYWI	DPDQGCNQDA	IKVYCNMETG	ETCVYPTTEST	IPKKNWYTSK
1301	NIKEKKHVWF	GEAMTDGFQF	EYGSEGSKAE	DVNIQLTFLR	LMSTEASQNI
1351	TYHCKNSIAY	MDQASGNLKK	ALLLQGSNEI	EIRAEGNSRF	TYSVTEDGCT
1401	SHTGAWGKTV	IDYKTTKTSR	LPIIDIAPMD	VGAPNQEFGI	EVGPVCFI

<210> 4

<211> 1352

<212> Protein

<213> Cá nước ngọt

<220>

<223> collagen alpha-1(I) chain isoform X1 [Pygocentrus nattereri]

<400>

1	MFSFVDIRLA	LLLSATVLLA	RGQGEDDRTG	SSCTLDGQVY	NDRDVWKPEP
51	CQICVCDSGT	VMCDEVICED	TSDCANPIIP	PDECCPICPD	DEYQEPRVEG
101	PKGMPGEKGD	RGPAGPPGND	GIPGQPGLPG	PPGPPGPPGL	GGNFSPQMSG
151	GFDEKSGGMP	IPGPMGPMGP	RGPPGPAGIP	GPQGFTGPPG	EPGEAGAPGP
201	MGPRGAAGPP	GKNGEDGESG	KPGRPGERGP	PGPQGARGFP	GTPGLPGIKG
251	HRGFSGLDGA	KGDGGPAGPK	GEPGAAGENG	TPGAMGPRGL	PGERGRAGPP
301	GAAGARGNDG	AAGAAGPPGP	TGPAGPPGFP	GGPGAKGEVG	AQGTRGAEGP
351	QGARGEPGNP	GPAGPAGPAG	NNGADGAPGL	KGAPGASGIA	GAPGFPGRG
401	PPGAAGTPGA	PGPKGNTGEA	GAPGAKGEAG	VKGESGAPGV	QGGPPPGEE
451	GKRGARGEPG	AAGVRGPAGE	RGAPGARGFP	GADGAAGPRG	APGERGGPGV
501	VGAKGATGEP	GRNGEPMMPG	SKGMTGSPGS	PGPDGKTGPA	GAPGQDGRPG
551	PPGPGGARGQ	PGVMGFPGPK	GAAGEAGKPG	ERGVMGAIGV	PGAPGKDGDV
601	GAPGAPGPAG	PSGERGEQGP	AGPPGFQGLP	GPQGATGEPG	KSGEQGVPE
651	AGAPGVAGSR	GDRGFPGERG	APGAAGPAGP	RGSPGAAGND	GAKGETGAAG
701	APGAQGGPGL	QGMPGERGAA	GLPGLKDRG	DQGAKGADGA	AGKDGIRGMT
751	GPIGPPGPAG	AQGDKGEPGA	GGPVGPTGAR	GPPGERGETG	APGPAGFAGP
801	PGADGQPGAK	GEPGDTGAKG	DAGAPGAAGA	TGAPGPQGPV	GATGPKGARG
851	AAGPPGATGF	PGAAGRVPGP	GPAGNSGPPG	PPGPSGKEGP	KGNRGETGSP
901	GRPGEIGAAG	PPGPSGEKGT	PGAEGAPGPS	GIPGPQGIAG	QRGIVGLPGQ
951	RGERGFPGLP	GSSGEPGKQG	PGGPSGERGP	PGPMGPPGLA	GPPGEPGREG
1001	TPGNEGAAGR	DGAVGPKGDR	GETGASGAPG	APGPPGAPGP	IGPAGKTGDR
1051	GEAGPAGPAG	ASGPAGPRGP	AGPAGARGDK	GETGEAGERG	MKGHRGFTGM
1101	QGPPGPPGPS	GESGPAGASG	PAGPRGPAGS	AGSPGKDGIS	GLPGPIGPPG
1151	PRGRTGEIGP	AGPPGPPGPP	GPPGPSGGGF	DIGFIAQPQE	KAPDPFRHFR
1201	ADDANVMRDR	DLEVDTTLKS	LSQQIESIRS	PDGTTKKNPAR	TCRDLKMCHP
1251	DWKSGEYWID	PDQGCNQDAI	KVNCNMETGE	TCVYPAQAEI	PKKNWYTSKN
1301	IKEKKHVWFG	EAMTDGFQFE	YGGEESKAED	VNIQLTFLRL	MSTEASQNIT
1351	YHCKNSIAYM	DQATGNLKKA	LLLQGSNEIE	IRAEGNSRFT	YSVTEDGCTS
1401	HTGAWGKTVI	DYKTTKTSRL	PIIDIAPMDV	GAPNQEFGIE	VGPVCFI

<210> 5

<211> 1352

<212> Protein

<213> Cá nước ngọt

<220>

<223> hypothetical protein cypCar_00006571 [Cyprinus carpio]

<400>

1	MFSFVDIRLA	LLLSATVLLA	RGQGEDDRTG	GSCTLDGQVY	NDRDVWKPEP
51	CQICVCDSGT	VMCDEVICED	TAHCSNPVIP	HDECCPVCPD	DEFKEPGVEG

101	PRGPAGEKGD	RGLPGPPGND	GIPGQPGLPG	PPGPPGPPGL	GGNFSPQMSG
151	GYDEKSGGAM	AVPGPMGPMG	PRGPPGPPGS	SGPQGFTGPP	GEPGEAGAPG
201	PMGPRGAAGP	PGKNGEDGES	GKPGRPGERG	PPGAQQGARGF	PGTPGLPGIK
251	GHRGFSGLDG	AKGDTGPAGP	KGEPGAPGEN	GTPGAMGPRG	LPGERGRAGP
301	PGAAGARGND	GAAGAAGPPG	PTGPAGPSGF	PGGPGAKGEV	GAQGARGAEG
351	PQGARGEPGN	PGPAGAAGPA	GNNGADGAPG	LKGAPGAPGI	AGAPGFPGPR
401	GPSGPAGAAG	APGPKGNTGE	VGAPGAKGEA	GAKGEAGAQQ	VQGPPGPSGE
451	EGKRGPRGEP	GSAGARGPPG	ERGAPGARGF	PGADGSAGPK	GATGERGGPG
501	IVGPKGATGE	PGRNGEPGMP	GSKGMTGSPG	SPGPDGKTGA	TGTPGQDGRP
551	GPPGPVGARG	QPGVMGFPGP	KGAAGEAGKP	GERGVMGALG	ATGAPGKDGD
601	VGAPGAPGPA	GPTGERGEQG	PAGPPGFQGL	PGPQGATGEP	GKSQEQQVPG
651	EAGAPGPAGS	RGDRGFPER	GAPGPAGPAG	ARGSPGSAGN	DGAKGDAGAP
701	GAPGAQQPPG	LQGMPGERGA	AGLPGLKGDR	QMNRMALIK	TDNKFLSKGD
751	QGAKGTDGAP	GKDGIRGMTG	PIGPPGPAGA	PGDKGETGAP	GLVGPNGARG
801	PPGERGETGA	PGPAGFAGPP	GADGLPGAAG	EPGDNGAKGD	SGPPGPAGAT
851	GAPGPQGPVG	STGPKGARGA	AGPPGATGFP	GAAGRVGPPG	PAGNAGPPGP
901	SGAPGKEGQK	GNRGETGPSG	RTGEIGAAGP	PGAPGEKGTG	GAEGPPGSAG
951	IPGPQGIAGQ	RGIVGLPGQR	GERGFPLPG	QSKVGILCIN	HGKAFILFI
1001	MPFRESLANK	DLLVPLVND	LLDPWDPLDW	LDLLVSLVVR	ELQVMRVLDD
1051	VMVLLDQRVT	VVRLALLALP	VLLDLLVLLD	PLALLERLVI	VESLALLVLP
1101	VLLALLVPVD	PLCNVFIQGP	AGARGDRGET	GEAGERGMKG	HRGFTGMQGP
1151	PGPPGPSGEP	GPAGASGPAG	PRGPPGSSGA	AGKDGMSGLP	GPIGPPGPRG
1201	RNGEIGPAGP	PGPPGLPGPP	GPSGGGFDIG	FIAQPVEKAP	DPFRSYRADD
1251	ANVMRDRDLE	VDTTLKSLSQ	QIESIISPDG	TKKNPARTCR	DLKMCHPDWK
1301	SGEYWIDPDQ	GCNQDAIKVY	CNMETGETCV	YPAESSIPKK	NWYTSKNIKE
1351	KKHVWFGEAM	TDGFQSHTGA	WGKTVIDYKT	TKTSRLPIID	IAPMDVGAPN
1401	QEFGIEVGPV	CFL			