



(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)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)   
**2-0001753**

(51)<sup>7</sup> **C07K 14/78**

(13) **Y**

(21) 2-2016-00432

(22) 14.12.2010

(67) 1-2010-03347

(45) 25.07.2018 364

(43) 25.06.2012 291

(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA - ĐẠI HỌC QUỐC GIA THÀNH PHỐ HỒ  
CHÍ MINH (VN)**

268 Lý Thường Kiệt, phường 14, quận 10, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Phan Đình Tuấn (VN), Nguyễn Hoàng Dũng (VN), Mai Thanh Phong (VN), Nguyễn  
Thị Nguyên (VN), Lê Thị Thu Hương (VN), Ngô Hồng Bảo Châu (VN), Nguyễn  
Thị Diễm Phương (VN)

(54) **PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT VÀ TINH CHẾ COLAGEN TỪ DA CÁ TRA  
(PANGASIUS HYPOPTHALMUS)**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp tách chiết và tinh chế collagen từ da cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) bao gồm các bước: xử lý da cá để loại bỏ chất béo, chất màu và chất mùi; chiết collagen từ da cá bằng axit axetic kết hợp với enzym pepsin; và tinh chế collagen thô bằng phương pháp thẩm tích, sấy thăng hoa và dung môi CO<sub>2</sub> siêu tới hạn. Hiệu suất thu nhận collagen đạt 89%. Sản phẩm collagen thu được có phân tử lượng cao, sản phẩm không màu, không mùi và hàm lượng béo rất thấp, phù hợp với ứng dụng làm nguyên liệu cho sản xuất mỹ phẩm, thực phẩm và dược phẩm.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề xuất phương pháp tách chiết và tinh chế collagen từ da cá tra, được ứng dụng trong công nghiệp sản xuất mỹ phẩm. Sản phẩm collagen có thể được dùng làm nguyên liệu sản xuất mỹ phẩm, thực phẩm và dược phẩm.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Collagen là loại protein phổ biến nhất trong cơ thể (chiếm khoảng 1/4 tổng lượng protein), là protein chính của mô liên kết, là một trong các thành phần chính của da, cơ vân, sụn, dây chằng, gân, xương và răng; đóng vai trò quan trọng trong việc phát triển các mô trong cơ thể và củng cố thành mạch; cấu tạo bởi 21 axit amin, có cấu trúc ba vòng xoắn (triple helix) đặc trưng.

Collagen có các tính chất chức năng quan trọng như tính giữ ẩm, khả năng tạo nhớt, khả năng tạo gel, tạo nhũ tương, v.v., nên collagen được ứng dụng nhiều trong ngành công nghiệp mỹ phẩm, công nghiệp dược phẩm và công nghiệp chế biến thực phẩm.

Collagen có thể thu nhận từ các nguồn như da, xương của các loại gia súc (lợn, trâu và bò); da, xương, vây hoặc vảy của các loại cá hoặc từ da gà, da ếch, da mực, v.v.. Tuy nhiên ngày nay, đặc biệt từ năm 2000 đến nay các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu tách chiết collagen từ da cá vì một số lý do sau: da cá là nguồn nguyên liệu dễ tìm, 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 đồng thời collagen cá có khả năng hấp thụ vào máu nhanh hơn collagen từ các nguồn khác.

Nhìn chung các phương pháp thu nhận collagen từ trước đến nay đều trải qua ba quá trình chính:

Quá trình thứ nhất là quá trình xử lý da cá nhằm loại bỏ chất béo, chất màu và chất mùi: các hóa chất xử lý da cá có thể là các axit, bazơ, chất hoạt động bề mặt hoặc dung môi hữu cơ. Sau khi xử lý, da cá thu được có thành phần chủ yếu là protein, hàm lượng chất béo giảm đáng kể so với trước khi xử lý, da cá có màu trắng và mùi cá giảm nhiều.

Quá trình thứ hai là quá trình chiết collagen: da cá sau khi được xử lý được chiết bằng một trong các loại dung môi như axit axetic, axit lactic, axit xitric, axit HCl hay các bazơ như NaOH, KOH; hoặc sử dụng axit kết hợp với enzym.

Quá trình thứ ba là quá trình tinh chế: gồm các công đoạn tách muối và sấy thăng hoa.

Ở các nghiên cứu của những tác giả khác để loại bỏ chất béo người ta chỉ tiến hành ở quá trình xử lý (quá trình thứ nhất). Hàm lượng chất béo trong sản phẩm collagen đạt được sau khi tách bằng các phương pháp trên là 4 – 5%, trong khi yêu cầu hàm lượng chất béo trong các sản phẩm có khả năng ứng dụng trong mỹ phẩm, dược phẩm và thực phẩm phải đạt dưới 0,5%. Tuy nhiên, khi hàm lượng chất béo được tách ra càng nhiều thì lượng collagen trong da cá sau khi được xử lý càng thấp, dẫn đến hiệu suất thu hồi collagen thấp.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Mục đích của sáng chế là tách chiết và tinh chế collagen từ da cá tra với hiệu suất và chất lượng cao. Để đạt được mục đích đó, sáng chế đề xuất phương pháp tách chiết và tinh chế collagen từ da cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) bao gồm các bước xử lý da cá, chiết collagen và tinh chế collagen.

Phương pháp theo sáng chế đã được cải tiến ở bước xử lý da cá và tinh chế collagen. Như các kết quả phân tích cho thấy, phương pháp loại bỏ chất béo có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất thu nhận collagen. Trong sáng chế này, bước xử lý da cá được tiến hành loại bỏ chất béo bằng cách sử dụng hóa chất và dung môi hữu cơ đến một mức độ nhất định nhằm tránh tổn thất protein collagen, sau đó sử dụng một phương pháp mới để loại bỏ hoàn toàn chất béo trong collagen thô (collagen thu được sau công đoạn tách muối) đó là phương pháp tách chất béo bằng CO<sub>2</sub> ở trạng thái siêu tới hạn.

Sự gia tăng hiệu suất thu hồi collagen của sáng chế này được giải thích như sau:

Ở bước xử lý da cá, da cá tra nguyên liệu được ngâm trong dung dịch NaOH và chất hoạt động bề mặt LASNa (Natri linear ankyl benzen sulfat), với tỷ lệ 1/10 (khối lượng/thể tích) nhằm loại bỏ chất béo. Dưới tác động của lực cơ học kết hợp với NaOH làm da cá trương nở, đồng thời các liên kết protein – lipid bị phá vỡ làm cho các phân tử chất béo tách ra khỏi bề mặt da cá. LASNa là một chất hoạt động bề mặt, có vai trò phân tách các phân tử chất béo ra khỏi bề mặt da cá nhanh chóng và để ngăn cản sự bám trở lại của các phân tử chất béo lên bề mặt da cá. Ở bước này, cấu trúc da cá bị trương nở càng nhiều, chất béo được tách ra càng nhiều thì lượng protein thất thoát càng cao. Do đó, để giảm tỷ lệ thất thoát protein sáng chế chỉ tách chất béo đến một tỷ lệ nhất định, phần chất béo còn lại trong da cá sẽ được tách hoàn toàn ở bước tinh chế collagen bằng dung môi CO<sub>2</sub> ở trạng thái siêu tới hạn.

Dung môi CO<sub>2</sub> siêu tới hạn có các tính chất hóa lý rất đặc trưng như sức căng bề mặt thấp, độ linh động cao, độ nhớt thấp; có tỷ trọng xấp xỉ tỷ trọng của chất lỏng; có thể điều chỉnh khả năng hòa tan các chất khác bằng cách thay đổi nhiệt độ, áp suất hay kết hợp với chất trợ dung môi; có khả năng hòa tan các chất hữu cơ ở thể rắn cũng như lỏng; là một chất trơ, không độc với cơ thể và không ăn mòn thiết bị. Điểm tới hạn của CO<sub>2</sub> là P<sub>c</sub>= 73atm, T<sub>c</sub> =30,9°C là điểm có áp suất và nhiệt độ không cao lắm nên ít tốn năng lượng để đưa CO<sub>2</sub> tới vùng tới hạn. Dung môi CO<sub>2</sub> siêu tới hạn sẽ dễ dàng xâm nhập sâu vào cấu trúc collagen thô, hòa tan chất béo và tách chất béo ra khỏi collagen thô mà không gây tổn thất collagen, chính vì vậy hiệu suất thu hồi collagen sẽ gia tăng.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Phương pháp tách chiết và tinh chế collagen từ da cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) bao gồm các bước:

Xử lý da cá để loại bỏ chất béo, chất màu và chất mùi: việc loại bỏ chất béo được thực hiện bằng cách ngâm da cá trong dung dịch LASNa (Natri linear anky benzen sulfat) 0,5-1,5% với tỷ lệ khối lượng của da trong dung dịch là 1/10 (khối lượng/thể tích) trong 6 giờ và ngâm trong dung dịch NaOH 0,2 -0,5%, với tỷ lệ 1/10 (khối lượng/thể tích) trong 2 giờ, sau đó rửa sạch và ngâm trong dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 - 1,5%, với tỷ lệ 1/10 (trọng lượng/thể tích) trong 2 giờ để tẩy màu và khử mùi da cá.

Chiết collagen từ da cá đã xử lý bằng axit axetic kết hợp với enzym pepsin: việc chiết collagen thực hiện trong thiết bị phản ứng (gồm bộ phận làm lạnh, bình phản ứng hai vỏ bằng thủy tinh có cánh khuấy, và bộ phận điều khiển thiết bị gắn với máy vi tính). Nhiệt độ chiết thay đổi từ 3-17°C; tỷ lệ da cá/dung dịch là 1/20 – 1/80 (khối lượng/thể tích); nồng độ enzym pepsin nằm trong khoảng 0,025-0,075%; nồng độ axit axetic nằm trong khoảng 0,25 -0,75M; trong khoảng thời gian chiết là 24 giờ.

Tinh chế collagen: sau khi chiết, dịch collagen được thu hồi bằng cách lọc bỏ bã; sau đó dịch chiết collagen được bổ sung NaCl đến nồng độ 0,9M để tạo tủa collagen, tiếp theo tiến hành ly tâm để thu tủa collagen thô. Hòa tan collagen này trong dung dịch axit axetic 0,5M với tỷ lệ rắn/lỏng là 1/10 (khối lượng/thể tích); tiếp tục loại bỏ chất khoáng bằng phương pháp thẩm tích bằng cách cho dung dịch collagen hòa tan trong axit axetic nói trên vào ống màng (membrane) điện di xenluloza tái sinh (regenerated cellulose dialysis membrane tubing - RCDMT) với kích thước lỗ màng 18A<sup>0</sup>, vùng pH hoạt động là 2-7, cột chặt hai đầu ống, sau đó ngâm ống màng đã chứa collagen vào dung dịch axit axetic 0,1M ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 24 giờ;

sấy dịch collagen thu được sau thẩm tích đến khô bằng máy sấy thăng hoa trước khi đưa đi tiến hành loại béo hoàn toàn bằng dung môi CO<sub>2</sub> siêu tới hạn ở nhiệt độ 45°C, áp suất 200bar (20Mpa) và tốc độ dòng CO<sub>2</sub> siêu tới hạn là 10g/phút, trong khoảng thời gian là 30 phút.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Phương pháp này đã được sử dụng để sản xuất thử nghiệm một lượng collagen từ nguyên liệu là da cá tra thu hồi từ nhà máy chế biến fille Agifish – An Giang. Phương pháp tách chiết và tinh chế collagen từ da cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) để ứng dụng trong sản xuất mỹ phẩm bao gồm các bước:

Xử lý da cá để loại bỏ chất béo, chất màu và chất mùi: việc loại bỏ chất béo được thực hiện bằng cách ngâm 150g da cá đã cắt nhỏ đến kích thước 5mm trong 1,5 lít dung dịch LASNa 1% trong 6 giờ, và sau đó ngâm trong 1,5 lít dung dịch NaOH 0,5% trong 2 giờ. Sau đó da được vớt ra, rửa sạch và ngâm trong 1,5 lít dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% trong thời gian 2 giờ để tẩy màu và khử mùi da cá.

Chiết collagen: quá trình chiết được thực hiện ở nhiệt độ chiết 10°C; tỷ lệ da cá/dung dịch là 1/50 (khối lượng/thể tích); nồng độ enzym pepsin 0,05%; nồng độ axit axetic 0,5M; trong khoảng thời gian chiết là 24 giờ.

Tinh chế collagen: sau khi chiết, dịch collagen được thu hồi bằng cách lọc bỏ bã; sau đó dịch chiết collagen được bổ sung NaCl đến nồng độ 0,9M để tạo tủa collagen, tiếp theo tiến hành ly tâm để thu tủa collagen thô. Hòa tan collagen này trong dung dịch axit axetic 0,5M với tỷ lệ rắn/lỏng là 1/10 (khối lượng/thể tích); tiếp tục loại bỏ chất khoáng bằng phương pháp thẩm tích bằng cách cho dung dịch collagen hòa tan trong axit axetic nói trên vào ống màng (membrane) điện di xenluloza tái sinh (regenerated cellulose dialysis membrane tubing - RCDMT) với kích thước lỗ màng 18A<sup>0</sup>, vùng pH hoạt động là 2-7, cột chặt hai đầu ống, sau đó ngâm ống màng đã chứa collagen vào dung dịch axit axetic 0,1M ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 24 giờ; sấy dịch collagen thu được sau thẩm tích đến khô bằng máy sấy thăng hoa trước khi đưa đi tiến hành loại béo hoàn toàn bằng dung môi CO<sub>2</sub> siêu tới hạn ở nhiệt độ 45°C, áp suất 200bar (20Mpa) và tốc độ dòng CO<sub>2</sub> siêu tới hạn là 10g/phút, trong khoảng thời gian là 30 phút.

Kết quả phân tích sản phẩm collagen (thực hiện theo phương pháp trên) như sau: Khối lượng collagen thu được: 18,82 gam; Hợp chất hữu cơ: 84,32%; Độ ẩm: 15,25%; Độ tro: 0,29%; Lipit: 0,14%; Hydroxyprolin: 93,72mg/g; Hiệu suất thu nhận collagen từ da cá tra đạt 89%.

**Hiệu quả đạt được của sáng chế**

Phương pháp tách chiết và tinh chế collagen từ da cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) theo sáng chế đã thu được sản phẩm collagen chất lượng cao với hiệu suất thu nhận đạt 89%. Sản phẩm collagen thu được có phân tử lượng cao, sản phẩm không màu, không mùi và hàm lượng béo rất thấp, phù hợp với ứng dụng làm nguyên liệu cho sản xuất mỹ phẩm, thực phẩm và dược phẩm.

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Phương pháp tách chiết và tinh chế collagen từ da cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) bao gồm các bước:

xử lý da cá để loại bỏ chất béo, chất khử màu và chất mùi: ngâm da cá lần lượt trong dung dịch LASNa (Natri linear ankyl benzen sulfat) 1% và NaOH 0,5% với tỷ lệ 1/10 (khối lượng/thể tích), thời gian lần lượt là 6 giờ và 2 giờ để loại bỏ chất béo, sau đó ngâm da cá trên trong dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%, tỷ lệ 1/10 (khối lượng/thể tích) trong 2 giờ để khử chất màu và chất mùi;

chiết collagen từ da cá bằng axit axetic và enzym pepsin; và

tinh chế collagen thô bằng phương pháp thẩm tích, sấy thăng qua và dung môi CO<sub>2</sub> siêu tới hạn: tiến hành thực hiện phương pháp thẩm tích bằng ống màng điện di xenluloza tái sinh với kích thước lỗ màng 18A<sup>0</sup>, vùng pH hoạt động là 2-7, sau đó sấy thăng hoa và chiết bởi dung môi CO<sub>2</sub> siêu tới hạn trong thiết bị tách chiết, nhiệt độ của dung môi chiết là 45°C, áp suất 200bar (20Mpa) và tốc độ dòng CO<sub>2</sub> là 10g/phút, thời gian tách chất béo là 30 phút để tách chất béo triệt để.