

THU NHẬN MÀNG SINH HỌC COLLAGEN ĐIỀU TRỊ BỎNG TỪ NGUỒN PHẾ LIỆU CÔNG NGHIỆP CHẾ BIẾN THỰC PHẨM

COLLECTING COLLAGENOUS BIOFILM DERIVED FROM FOOD INDUSTRY WASTE FOR BURNS TREATMENT

TRẦN MINH TÂM^(*) và PHẠM NGUYỄN DUY BÌNH^(**)

TÓM TẮT: Dựa trên điều tra thực tế trong những năm vừa qua về các loại tai nạn thường gặp, bỏng được xếp vào một trong những loại tai nạn nguy hiểm, chỉ đứng sau tai nạn giao thông. Tai nạn bỏng không chỉ gây tử vong cao mà còn để lại nhiều di chứng lẫn hậu quả nặng nề về sức khỏe, chức năng thẩm mỹ và tinh thần. Vì thế, việc điều trị những tổn thương do bỏng hiện là một vấn đề nan giải. Một trong những yếu tố quan trọng không thể thiếu trong quá trình điều trị tổn thương do bỏng là sử dụng các loại màng che phủ vết thương có tác dụng điều trị nhanh, hiệu quả nhưng ít tổn kém, trong đó có màng collagen. Qua quá trình nghiên cứu, chúng tôi đã tạo ra được màng sinh học collagen trị bỏng và xây dựng được quy trình sản xuất màng sinh học collagen từ da cá da trơn. Xác định được điều kiện tối ưu để loại tạp chất phi collagen ra khỏi nguyên liệu (NaOH 3% ngâm ở 30⁰C trong 2 giờ). Thu nhận collagen tinh sạch bằng acid acetic 1M ở 5⁰C trong 30 phút. Việc nghiên cứu thành công màng sinh học collagen với kết quả khả quan đã mở ra một cơ hội mới đem lại một dòng sản phẩm xanh tạo nguồn lợi cho xã hội không chỉ về mặt kinh tế, mà còn góp phần tìm kiếm những sản phẩm tốt để điều trị và bảo vệ sức con người.

Từ khóa: màng sinh học, collagen, da cá da trơn, phế liệu công nghiệp thực phẩm.

ABSTRACT: Basing on recent survey about usual accidents, burns is one of the most dangerous injuries, following traffic accident. Burns not only caused the death, but also left serious injuries that affecting on mental health and aesthetic. Therefore, burns treatment is very important. One of the most important steps in burns treatment is covering the wound by membrane enhancing healing process, including collagenous membrane. Here, the problem that we have to consider is efficacy and price of the membrane using in treatment. In this research, we have made collagenous biofilm and optimized protocol for collecting collagenous biofilm from food industry waste-derived basa fish skin. Raw material is soaked in NaOH 3% at 30⁰C for 2 hours to eliminate non-collagen compound. Then, purity collagen is collected by rinsing with acetic acid 1M for 30 minutes. This result gives the

(*) PGS.TS. Trường Đại học Văn Lang, Email: tranminhtam@vanlanguni.edu.vn

(**) ThS. Trường Đại học Văn Lang, Email: phamnguyenduybinh@vanlanguni.edu.vn

opportunity for eco-product that not only utilize the industry waste, but also contribute for medical treatment.

Key words: *biofilm, collagen, basa fish skin, food industry waste.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bỏng là một tai nạn thường gặp trong lao động và sinh hoạt hàng ngày. Tại Viện Bỏng Quốc gia Lê Hữu Trác (thuộc Học viện Quân y) mỗi năm có từ 3.500 đến 4.000 bệnh nhân bỏng nặng, rất nặng vào điều trị (số liệu năm 2009). Theo thống kê, cứ 100 người bị bỏng thì có 3 đến 5 người tử vong và khoảng 30 đến 35 người bị các di chứng về sức khỏe, chức năng, và tinh thần.

Điều trị bỏng phải nhanh chóng, đồng thời đòi hỏi phải toàn diện như là: điều trị tại chỗ, điều trị toàn thân kết hợp với việc dự phòng và điều trị các biến chứng, di chứng. Đối với các trường hợp bỏng sâu, diện rộng thì việc điều trị nhất thiết phải ghép da của chính người bị bỏng. Tuy nhiên điều này là không thể, vì người bệnh không có đủ da và không đủ sức khỏe để phẫu thuật.

Việc cấy ghép da đồng loại, da dị loại đã mở rộng nguồn da thay thế nhưng lại gặp một số trở ngại do tính không tương hợp sinh học cũng như trong việc bảo quản nên khả năng ứng dụng còn hạn chế. Điều này đã thúc đẩy việc sản xuất các vật liệu thay thế da - đó là các vật liệu phần lớn có nguồn gốc từ tự nhiên, có tính tương hợp sinh học cao và có tác dụng tốt cho điều trị bỏng. Tuy nhiên giải pháp này cũng vẫn còn một số hạn chế về chất lượng cũng như giá thành vì việc điều trị bỏng hiện nay cũng rất tốn kém.

Ý tưởng nghiên cứu để tìm ra các chế phẩm sinh học sao cho có tác dụng điều trị bỏng trong thời gian ngắn, hiệu quả nhưng ít tốn kém là điều cần thiết, đặc biệt trong đó có màng collagen. Màng collagen đáp ứng tốt về tác dụng điều trị bỏng, có thể được tạo ra bằng nhiều cách, nhưng làm sao để tạo ra màng collagen với chi phí thấp, đồng thời có chất lượng tốt là điều mà mục tiêu của nghiên cứu hướng tới, trong đó hướng tận dụng các phế liệu trong công nghiệp chế biến thịt và cá để thu chế phẩm màng collagen là cách phù hợp hơn cả.

Hiện nay, việc sử dụng các phế liệu từ công nghiệp chế biến thực phẩm ở nước ta còn nhiều hạn chế, có loại đã được sử dụng nhưng hiệu quả chưa cao. Chúng tôi đã hướng tới việc sử dụng phụ phẩm của cá da trơn có nhiều đặc tính thuận lợi và phù hợp hơn cả với mục đích nhằm tận dụng phế liệu từ công nghiệp chế biến cá để thu nhận chế phẩm màng sinh học collagen, để chữa bỏng.

2. MỤC TIÊU VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu nghiên cứu

Tận dụng phế liệu từ công nghiệp chế biến cá để thu nhận chế phẩm màng sinh học collagen để từ đó có thể thương mại hóa chế phẩm màng sinh học collagen trong lĩnh vực điều trị bỏng.

2.2. Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu khả năng tách loại tạp chất phi collagen.

Nghiên cứu quá trình thu nhận collagen.

Xây dựng quy trình công nghệ tạo màng sinh học collagen.

Thử nghiệm màng sinh học collagen trên chuột nhắt trắng được gây bông.

3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối với nội dung: Nghiên cứu khả năng tách loại tạp chất phi collagen ra khỏi nguyên liệu

Chúng tôi sử dụng NaOH làm tác nhân xử lý và tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ, thời gian sử dụng NaOH đến khả năng tách loại các tạp chất, từ đó chọn ra điều kiện xử lý thích hợp sao cho khả năng loại tạp chất là tốt nhất và kinh tế nhất.

Thí nghiệm được tiến hành song song ở cả nhiệt độ lạnh và nhiệt độ thường trong thời gian 1 giờ và 2 giờ, lặp lại ba lần. Nồng độ NaOH thay đổi lần lượt: 2%, 3%, 4%, 5%.

Đối với nội dung: Nghiên cứu quá trình thu nhận collagen.

Chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian xử lý acid ở nhiệt độ 5⁰C và 30⁰C, sau đó so sánh hiệu suất và chất lượng dịch trích ly ở hai chế độ xử lý, tiếp đến sẽ khảo sát thời gian trích ly collagen chọn thời gian thích hợp để thu được lượng collagen nhiều nhất.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian xử lý acid acetic.

- Xử lý ở điều kiện lạnh 5⁰C với: thời gian xử lý lần lượt 15, 30, 45, 60 phút.

- Xử lý ở nhiệt độ 30⁰C: thời gian xử lý acid lần lượt là 15, 30, 45, 60 phút.

- So sánh hiệu suất và chất lượng dịch trích ly ở hai chế độ xử lý.

Đối với nội dung: xây dựng quy trình công nghệ tạo sản phẩm màng sinh học collagen.

Phương pháp: từ các kết quả thu được ta tiến hành xây dựng quy trình công nghệ tạo sản phẩm màng sinh học collagen.

Đối với nội dung: thử nghiệm màng sinh học collagen trên chuột nhắt trắng được gây bông.

Chuột nhắt trắng Mus Musculus var. Albinosau khi mua về được nuôi ổn định một tuần, bố trí mỗi con một chuồng với cùng điều kiện chăm sóc và ăn uống như nhau.

Chia chuột thành 3 nhóm thí nghiệm. Và cạo lông chuột từ vùng vai đến lưng.

Chuột được gây mê bằng eter rồi gây bông nhiệt khô (độ 2, độ 3) bằng miếng kim loại nung nóng trên ngọn lửa đèn cồn trong 30 giây, thời gian gây bông là 3 giây tại vùng lưng chuột.

Sau 2 ngày gây bông, cắt lọc hoại tử tại vùng bông.

Chọn 3 mốc thời gian sau khi điều trị: 4 ngày, 7 ngày, 10 ngày để theo dõi tiến độ lành hóa vết thương bông.

- Nhận xét dấu hiệu lâm sàng.

- Thu mẫu mô (gồm vùng mô tổn thương và vùng mô lành xung quanh),

cổ định trong formol 10% rồi gửi sang Bệnh viện Chợ Rẫy làm tiêu bản.

- Đánh giá kết quả giải phẫu bệnh trong lành hóa vết thương (Bệnh viện Chợ Rẫy).

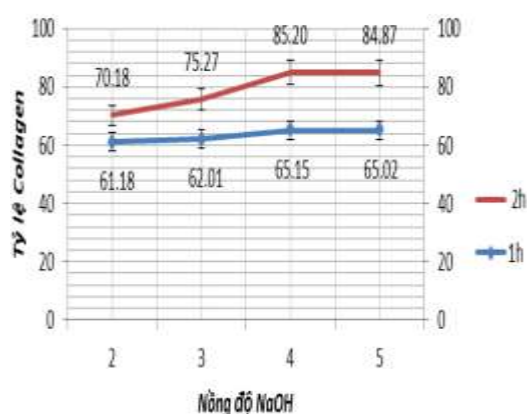
STT	Nhóm Thí Nghiệm	Số lượng chuột (Con)	Số lần lặp lại
1	Đối chứng (để tự nhiên, không điều trị)	3	3
2	Đắp gạc	3	3
3	Đắp màng sinh học collagen	3	3

4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

4.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình loại tạp chất phi collagen

Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý bằng NaOH đến hiệu quả tách loại các tạp chất phi. Ảnh hưởng của chế độ xử lý NaOH đến hiệu quả tách loại các tạp chất phi collagen được thể hiện thông qua tỷ lệ hàm lượng collagen trong da cá sau xử lý.

4.1.1. Xử lý với NaOH ở nhiệt độ lạnh 5⁰C

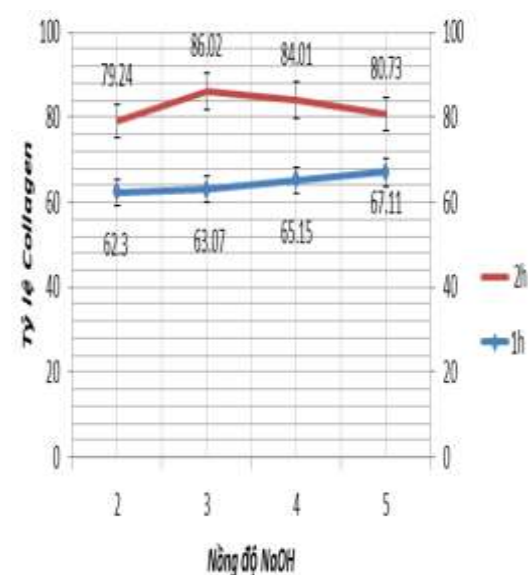


Biểu đồ 1. Ảnh hưởng của chế độ xử lý NaOH ở 5⁰C

Từ kết quả ở biểu đồ trên, ta thấy độ sạch của nguyên liệu sau khi ngâm NaOH trong 2 giờ sạch hơn nhiều so với 1 giờ. Với thời gian xử lý 1 giờ ở các tỉ lệ nồng độ NaOH ta thấy nồng độ 4% cho hiệu quả cao nhất.

Như vậy xử lý NaOH ở nhiệt độ 5⁰C lên quá trình loại tạp chất cho hiệu quả cao nhất khi ngâm 2 giờ với nồng độ 4%.

4.1.2. Xử lý với NaOH ở nhiệt độ 30⁰C



Biểu đồ 2. Ảnh hưởng ở chế độ xử lý NaOH 30⁰C

Từ kết quả biểu đồ 2 cho thấy độ sạch của nguyên liệu sau khi ngâm NaOH ở nhiệt độ thường cũng gần giống như trong nhiệt độ lạnh, trong 2 giờ sạch hơn nhiều so với 1 giờ. Với thời gian xử lý 2 giờ ở các nồng độ NaOH khác nhau, ta thấy nồng độ 3% cho hiệu quả cao nhất.

Như vậy xử lý NaOH ở nhiệt độ 30°C lên quá trình loại tạp chất cho hiệu quả cao nhất khi ngâm 2 giờ với nồng độ 3%.

Với kết quả so sánh ở 2 nhiệt độ, điều kiện tối ưu để loại tạp chất phi collagen là NaOH 3%, ở nhiệt độ 30°C.

- Khảo sát thời gian xử lý acid

Ở nghiên cứu này chúng tôi sử dụng acid acetic 1M làm tác nhân trương nở và tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian xử lý acid đến hiệu suất thu nhận collagen. Mỗi thí nghiệm lập lại 3 lần.

Bảng 2. Tỷ lệ Collagen sau thời gian xử lý acid ở nhiệt độ thường 30°C

Thời gian (phút)	15	30	45	60
Tỷ Lệ Collagen (%)	66.69%	68.95%	73.32%	70.95%
Nguyên liệu ban đầu	150g			

Từ kết quả trên ta thấy hiệu suất chiết collagen tăng khi thời gian xử lý acid tăng từ 15 phút đến 45 phút và sau đó giảm dần khi thời gian xử lý tiếp tục tăng.

- Xử lý ở nhiệt độ lạnh 5°C

Thời gian ngâm acid thay đổi lần lượt: 15, 30, 45, 60 phút.

Bảng 1. Tỷ lệ Collagen sau thời gian xử lý acid ở nhiệt độ lạnh 5°C

Thời gian (phút)	15	30	45	60
Tỷ lệ Collagen (%)	83.2 0%	86.2 6%	84.9 4%	84.1 6%
Nguyên liệu ban đầu	150g			

Từ kết quả trên cho thấy hiệu suất chiết collagen đạt cao nhất khi nguyên liệu được xử lý trong 30 phút ở nhiệt độ lạnh 5°C.

- Xử lý ở nhiệt độ 30°C

Thời gian ngâm acid thay đổi lần lượt: 15, 30, 45, 60 phút.

Như vậy, thời gian ngâm acid ở nhiệt độ thường tốt nhất là 45 phút.

So sánh 2 kết quả xử lý acid ở 2 nhiệt độ khác nhau, điều kiện để thu collagen tinh khiết có hiệu suất cao nhất là xử lý bằng acid ở nhiệt độ lạnh 5°C trong thời gian 30 phút.

4.2. Quy trình công nghệ sản xuất màng sinh học Collagen

Từ các kết quả khảo sát trên ta xây dựng được quy trình công nghệ sản xuất màng sinh học Collagen

- Rửa: nguyên liệu da cá được rửa đông sau đó rửa sạch bằng nước sạch.

- Ngâm NaOH: để thu nhận collagen có độ tinh sạch cao trước hết cần loại các tạp chất (protein tạp, lipid, sắc tố...) ra khỏi da nguyên liệu. Rửa lại da cá cho sạch xút và tạp chất bám phía ngoài.

- Ngâm da cá trong dung dịch acid acetic.

- Trích ly
- Ly tâm, lọc.
- Thu được dịch collagen tinh khiết.
- Dung dịch trải ra đĩa petri và sấy khô.

- Thu được sản phẩm màng sinh học Collagen.

- Dùng tia UV chiếu để vô trùng sản phẩm.

- Đóng gói sản phẩm.

4.2.1. Thử nghiệm màng sinh học collagen trên chuột nhắt trắng được gây bỏng

Chuột được gây bỏng nhiệt khô, bong lớp thượng bì, phá hủy tới lớp trung bì, mạch máu xung huyết, vết bỏng da cấp.

Sự khác biệt giữa các nhóm điều trị và thời gian điều trị được đánh giá trên mức độ biểu hiện của từng chỉ tiêu. Cụ thể:

Bảng 3. Diễn tiến lành hóa vết thương ở nhóm chuột thí nghiệm theo các mốc thời gian

Nhóm điều trị	Thời gian điều trị		
	4 ngày	7 ngày	10 ngày
Đối chứng	C	C	C
Đắp gạc	C	C	B
Đắp màng sinh học Collagen	C	B	A

Chú thích: A, B, C là Tiêu chuẩn đánh giá mức độ lành hóa vết thương (Bệnh viện chợ Rẫy)

Mức độ A: Tái tạo tốt, viêm nhẹ, sắp lành.

Mức độ B: Tái tạo tốt, còn viêm và phù.

Mức độ C: Tái tạo trung bình, viêm, phù nề.

- Nhóm đối chứng (không điều trị):

Ngày 4: số lượng bạch cầu đa nhân trung tính rất nhiều, đại thực bào, bạch cầu xuyên mạch nhiều để bảo vệ và dọn sạch vùng vết thương, viêm sâu và có hoại tử mô, thượng bì bắt đầu tái tạo.

Ngày 7: lượng bạch cầu đa nhân trung tính vẫn còn nhiều, còn đại thực bào và bạch cầu xuyên mạch, cơ thể cần phải huy động bạch cầu đến để bảo vệ vùng vết thương, chưa ngăn chặn được sự nhiễm khuẩn, thượng bì tái tạo.

Ngày 10: số lượng bạch cầu đã giảm tuy nhiên có hiện tượng bội nhiễm vi khuẩn và nấm, vết thương chưa sạch, còn loét rộng.

- Nhóm đắp gạc:

Ngày 4: có sự hiện diện của bạch cầu đa nhân trung tính và đại thực bào, quá trình tái tạo thượng bì hình thành.

Ngày 7: còn bạch cầu xuyên mạch và đại thực bào, chưa ngăn chặn được sự xâm nhiễm, có bội nhiễm vi khuẩn và nấm tại vùng vết thương, viêm sâu, có tái tạo thượng bì.

Ngày 10: số lượng bạch cầu giảm, vết thương sạch thúc đẩy quá trình lành hóa, viêm trung bì, còn loét.

- *Nhóm đắp màng sinh học collagen:*

Ngày 4: có nhiều bạch cầu đa nhân trung tính, đại thực bào, bạch cầu xuyên mạch để bảo vệ vùng thương tổn, thượng bì bắt đầu tái tạo

Ngày 7: lượng bạch cầu giảm, còn bạch cầu xuyên mạch, viêm bì nông, loét nhẹ, thượng bì tái tạo, vết thương sạch.

Ngày 10: còn ít bạch cầu, không có nhiễm trùng, vết thương sạch giai đoạn sắp lành.



5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Qua quá trình nghiên cứu, ta có một số kết luận sau:

Đã xác định được điều kiện tối ưu để loại tạp chất phi collagen: NaOH 3%, ở 30°C trong 2 giờ.

Khảo sát được điều kiện tối ưu để thu nhận collagen tinh khiết: acid acetic 1M ở 5°C trong 30 phút.

Đã tạo ra thành phẩm màng sinh học collagen trị bỏng.

Xây dựng được quy trình sản xuất màng sinh học collagen.

Thí nghiệm lâm sàng trên chuột cho kết quả khả quan, cạnh tranh được với những sản phẩm trị bỏng hiện có trên thị trường trong nước.

Việc nghiên cứu thành công màng sinh học collagen với kết quả khả quan như trên đã mở ra một cơ hội mới, cùng với đó nó đem lại một dòng sản phẩm xanh tạo nguồn lợi cho xã hội không chỉ về mặt kinh tế, mà còn về nhân văn góp phần tìm kiếm những sản phẩm tốt để điều trị và bảo vệ sức con người.

Cần tiếp tục thử nghiệm lâm sàng dài hơn trên chuột và các vật nuôi khác.

Nghiên cứu thử nghiệm thêm các phương pháp khác để tối ưu hơn nữa quy trình sản xuất.

Nghiên cứu và xây dựng chiến lược thương mại hóa sản phẩm ở kế hoạch lớn hơn và dài hạn hơn nữa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bauer, A., Mayr, H., Hopfner-Sixt, K., Amon, T. (2009), *Detailed monitoring of two biogas plants and mechanical solid-liquid separation of fermentation residues*. J. Biotechnol. 142.
2. Bustamante, M. A., Restrepo, A.P., Alburquerque, J. A., Pérez-Murcia, M. D., Paredes, C., Moral, R., Bernal, M. P. (2013), *Recycling of anaerobic digestates by composting: effect of the bulking agent used*. J. Clean. Prod. 47.
3. Drennan, M. F. DiStefano, T. D. (2010), *Characterization of the curing process from high-solids anaerobic digestion*. Bioresour. Technol. 101.
4. Gong, H., Yan, Z., Liang, K. Q., Jin, Z. Y., Wang, K. J. (2013), *Concentrating process of liquid digestate by disk tube-reverse osmosis system*. Desalination 326.
5. Kythreotou, N., Florides, G., Tassou, S. (2014), *A review of simple to scientific models for anaerobic digestion*. Renewable Energy 71.
6. Li, Y., Park, S. Y., Zhu, J. (2011), *Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste*. Renew. Sustain. Energy Rev. 15.

Ngày nhận bài: 21/11/2016. Ngày biên tập xong: 25/11/2016. Duyệt đăng: 15/12/2016