

THÔNG BÁO KHOA HỌC

THU NHẬN VÀ TÍNH CHẤT CỦA HYDROXYAPATIT CÓ KÍCH THƯỚC NANO TỪ XƯƠNG CÁ

PREPARATION AND PROPERTIES OF NANOHYDROXYAPATITE FROM FISH BONES

Nguyễn Lê Bá Quảng¹, Phạm Việt Nam², Phạm Anh Đạt³, Nguyễn Văn Hòa¹

Ngày nhận bài: 7/5/2018; Ngày phản biện thông qua: 10/9/2018; Ngày duyệt đăng: 28/9/2018

TÓM TẮT

Xương cá là nguồn nguyên liệu rất phong phú để thu nhận hydroxyapatit (HA), một hợp chất cũng được tìm thấy trong xương và răng của con người. Trong nghiên cứu này, HA có kích thước nanomet được tách từ xương cá chêm (*Lates calcarifer*), cá diêu hồng (*Oreochromis sp.*) và cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) qua hai bước xử lý nhiệt. Ban đầu, phế liệu cá được đun sôi với nước trong 2 giờ để loại bỏ các phần hữu cơ thu được xương cá thô. Sau đó, xương cá thô được nung tại nhiệt độ 500 – 900°C trong thời gian 1 – 3 giờ để thu nhận HA kích thước nanomet. Các sản phẩm HA thu được từ các loại xương cá khác nhau đều có độ kết tinh và độ xốp cao dựa trên phân tích phổ nhiễu xạ tia X (XRD) và kính hiển vi quét điện tử (SEM). Đối với xương cá chêm, HA có kích thước trong khoảng 30 – 50 nm khi nung xương cá thô ở 700°C trong 2 giờ. Quy trình thu nhận HA khá đơn giản và dễ dàng triển khai ở qui mô lớn. Hơn nữa, sản phẩm HA kích thước nanomet với nguồn gốc tự nhiên có tiềm năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như thực phẩm và y dược.

Từ khóa: Phế liệu thủy sản, hydroxyapatit kích thước nano, xương cá, phương pháp xử lý nhiệt

ABSTRACT

Fish bones are reported to be abundant raw materials for production of hydroxyapatite (HA), which is also found as a main component of human bones and teeth. In this study, hydroxyapatite nanoparticles were prepared from three fish bones including Barramundi (*Lates calcarifer*), Red Tilapia (*Oreochromis sp.*) and Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by a two-step thermal treatment. Firstly, fish by-products were boiled with water for 2h to remove organic components and obtained raw bones. Secondly, these bones were calcinated at a range of 500 – 900°C for 1 – 3h to recover HA nanoparticles. From XRD and FTIR spectra and SEM images, all HA nanoparticles have a high purity and porosity. For Barramundi bones, HA with a size of 30 – 50 nm was obtained by calcinated at 700°C for 2 h. This recovery method is facile and efficient and can be scale-up easily. Moreover, these biological HA nanoparticles have many potential applications in food, medicine and pharmacy.

Keywords: Seafood by-products, nanohydroxyapatite, fish bone, thermal treatment

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, quá trình chế biến phi lê cá tại các nhà máy tạo ra một lượng lớn các phế liệu gồm xương, thịt sót lại, máu, nội tạng và da (chiếm khoảng 40-60% so với trọng lượng cá khi đánh bắt). Các phế liệu này được dùng chủ yếu để sản xuất bột cá, dầu cá, phân bón, thức ăn cho gia súc và gia cầm [1-3]. Tuy nhiên, hầu hết

các sản phẩm trên đều có giá trị kinh tế thấp do đó dẫn tới lãng phí tài nguyên. Bởi vì, theo các nghiên cứu gần đây, nhiều hoạt chất sinh học có giá trị cao (peptit, axit béo, enzym, khoáng và polyme sinh học) có thể được tách chiết từ phế liệu cá và có thể được ứng dụng trong thực phẩm, y học và dược phẩm [4]. Trong đó, xương cá có chứa một lượng lớn một hợp chất của canxi và phốt-pho có tên gọi là hydroxyapatit (viết tắt là HA, công thức phân tử là $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). Đây cũng là

¹ Trung Tâm Thí nghiệm thực hành, Trường Đại học Nha Trang

² Khoa Thủy sản, Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp Hồ Chí Minh

³ Bộ môn Hóa – Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

thành phần chính được tìm thấy trong xương và răng của cơ thể người và động vật, cụ thể HA chiếm đến 65 – 70% khối lượng xương và khoảng 99% khối lượng răng [5-7].

HA có thể được điều chế bằng phương pháp hóa học nhờ phản ứng của các hợp chất có chứa canxi và photpho. Sản phẩm tổng hợp này đã được nghiên cứu và ứng dụng làm vật liệu thay thế và hàn gắn những hư hỏng của xương do bệnh lý hoặc tai nạn [8-9]. Ở dạng bột, HA được phối trộn với một số khoáng chất khác để dùng trong bào chế thuốc chống loãng xương và thực phẩm chức năng [10]. HA cũng được hòa tan trong nước giải khát để bổ sung canxi cho người sử dụng [10]. Ở dạng màng, một lớp HA mỏng, siêu mịn có thể tạo nên lớp men răng, gắn kết các chi tiết nối xương và lớp phủ bề mặt cho xương nhân tạo [11]. Ngoài ra, HA dạng xốp được ứng dụng để sửa chữa các khuyết tật của xương và răng [10,11]. Tuy nhiên, việc sử dụng các hóa chất khi tổng hợp HA lại đòi hỏi phải tiến hành các bước tinh chế và loại bỏ các hợp chất không phản ứng và sản phẩm phụ [11]. Nếu các chất này không được loại bỏ hoàn toàn sẽ ảnh hưởng đến chất lượng của sản phẩm và có thể tác hại với đối tượng sử dụng. Do đó, việc nghiên cứu thu nhận HA từ các nguồn tự nhiên là rất cần thiết.

Trong nghiên cứu này, các hạt HA kích thước nano thu được từ xương một số loài cá bằng phương pháp xử lý nhiệt. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá thành phần và tính chất của phế liệu cá và xương cá thô thu được sau quá trình tiền xử lý. Sau đó, khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian nung đến kích thước và độ kết tinh của sản phẩm HA thu được. Đây là nghiên cứu bước đầu nhằm chế tạo ra hạt HA kích thước nanomet và độ xốp cao từ nguồn tự nhiên thông qua một phương pháp dễ dàng, hiệu quả và có thể ứng dụng để sản xuất ở qui mô lớn. Đồng thời, nghiên cứu cũng mong muốn tiến tới tạo ra một sản phẩm có giá trị cao từ nguồn phế liệu trong quá trình chế biến cá tại Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Các mẫu phế liệu cá (chêm, rô phi và điêu hồng) được thu nhận từ Khu phi-lê cá, gần quầy bán thủy sản tại Siêu thị Lotte Nha Trang. Địa chỉ: Số 58 Đường 23 Tháng 10, Phường Sơn, Nha Trang. Các mẫu được đóng trong túi PA, bảo quản lạnh khi vận chuyển và cấp đông -20°C cho đến khi được xử lý ở phòng thí nghiệm. Hóa chất dùng nghiên cứu đều thuộc loại tinh khiết phân tích.

2. Phương pháp nghiên cứu

Sơ đồ bố trí thí nghiệm tổng quát nghiên cứu thu nhận HA kích thước nanomet bằng phương pháp nhiệt được trình bày trong Hình 1. Theo đó, quá trình thu nhận gồm 2 bước xử lý nhiệt và cuối cùng sản phẩm được phân tích, đánh giá.

2.1. Tiền xử lý nguyên liệu

Phế liệu cá được đun sôi trong 2 giờ để tách phần hữu cơ tan và phần vô cơ không tan. Phần xương không tan được lọc tách và rửa sạch bằng nước nóng 3 lần. Sau đó, sấy khô ở 70°C trong 12 giờ thu được xương cá thô.

2.2. Thu nhận HA

Quy trình thu nhận HA bằng phương pháp nung được dựa trên các công bố trước đây có điều chỉnh [8, 12,13]. Xương cá thô được nung ở các nhiệt độ 500, 600, 700 và 900°C trong khoảng thời gian 2 giờ để khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ. Nung xương cá thô ở 700°C trong khoảng thời gian 1, 2 và 3 giờ để khảo sát ảnh hưởng của thời gian. Tốc độ gia nhiệt là 5°C/phút đối với tất cả các thí nghiệm.

2.3. Đánh giá tính chất nguyên liệu và sản phẩm

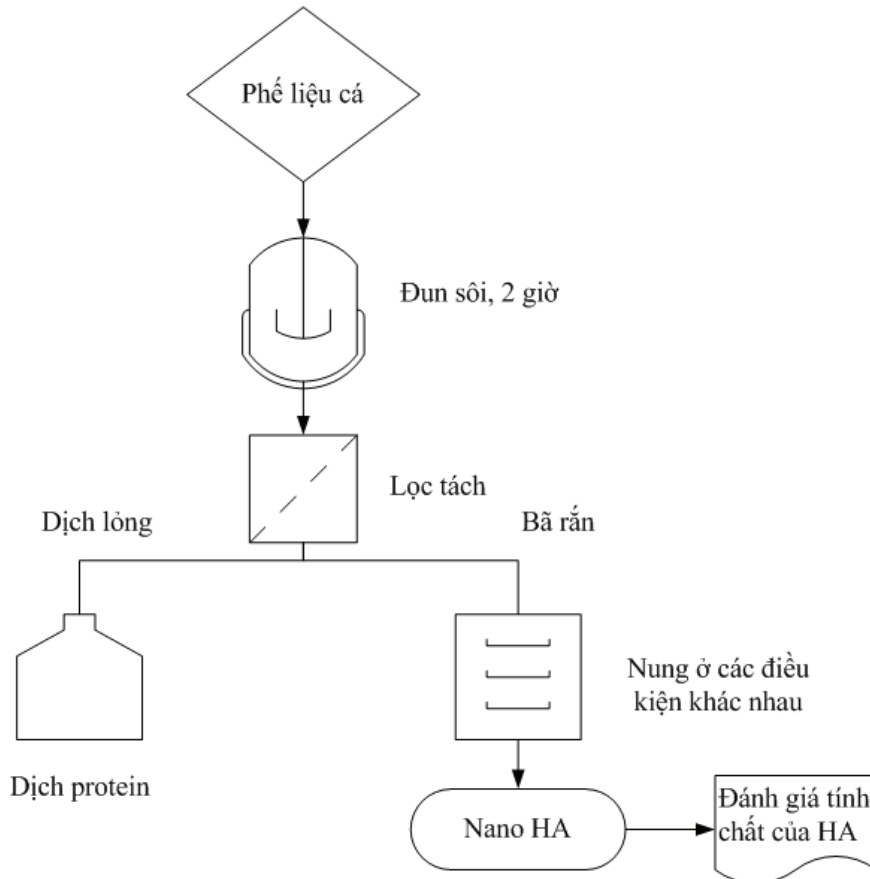
Hàm lượng khoáng, ẩm của nguyên liệu được xác định theo phương pháp chuẩn của AOAC (2000) ở 105 và 550°C. Hàm lượng lipid được phân tích theo phương pháp Folch. Hàm lượng protein thô xác định bằng phương pháp Kjeldahl.

Hình dạng và kích thước của HA được chụp bằng kính hiển vi quét điện tử S-4800 của hãng Hitachi. Độ kết tinh của HA được đánh giá trên phổ nhiễu xạ tia X với nhiễu xạ kế X'Pert-PRO MPD của hãng PANalytical sử dụng tia chiếu xạ Cu K α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) với hiệu điện thế 40 kV và cường độ 40 mA, góc quét $4^\circ < 2\theta < 44^\circ$, bước quét $0,05^\circ$, tốc độ quét $1^\circ/\text{min}$, ở nhiệt độ 25°C .

Cấu trúc hóa học của HA được phân tích bằng phổ hấp phụ hồng ngoại Nicolet iS10 của hãng Thermo Scientific trong khoảng 548–4000 cm^{-1} với độ phân giải 16 cm^{-1} trong 32 lần quét sử dụng chất nền KBr.

3. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm trên được lặp lại 3 lần và số liệu được xử lý và vẽ đồ thị trên phần mềm Origin 10.0.



Hình 1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm nghiên cứu thu nhận HA bằng phương pháp nhiệt.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thành phần phế liệu cá

Trong qui trình phi-lê cá, tùy theo loại cá nguyên liệu ban đầu mà phế liệu thu được sẽ

có sự khác nhau về độ ẩm, hàm lượng protein, lipid và tro. Kết quả phân tích các chỉ tiêu hóa học cơ bản của các loại phế liệu cá sau phi-lê trong nghiên cứu này được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hóa học cơ bản của một số phế liệu cá

Nguồn phế liệu	Protein (%)	Lipid (%)	Khoáng (%)	Tài liệu
Cá chẽm (đầu, xương, nội tạng) (<i>Lates calcarifer</i>)	32,3 ± 0,1	10,4 ± 0,2	10,5 ± 0,2	Nghiên cứu này
Cá rô phi (<i>Oreochromis niloticus</i>)	35,3 ± 0,3	2,4 ± 0,1	13,5 ± 0,2	
Cá diêu hồng (<i>Oreochromis sp.</i>)	38,6 ± 0,2	8,9 ± 0,2	11,6 ± 0,3	
Cá chẽm (đầu, xương) (<i>Lates calcarifer</i>)	16,4 ± 0,3	8,3 ± 0,2	10,5 ± 0,2	[14]
Cá ngừ (đầu) (<i>Thunnus albacares</i>)	14,8 ± 0,1	13,5 ± 0,1	11,8 ± 1,1	[15]

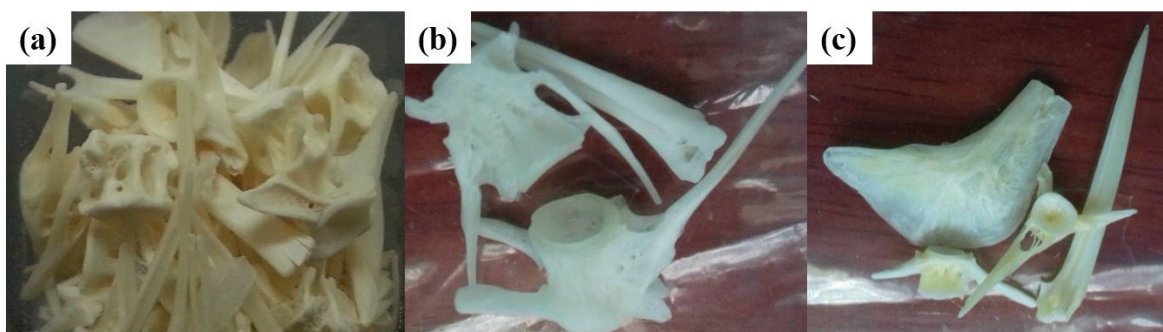
Kết quả cho thấy, thành phần hóa học chủ yếu của các phế liệu cá là protein, khoáng và lipid. Tỷ lệ các hàm lượng trên khác nhau phụ thuộc rất nhiều vào các loại cá. Đối với tất cả các loại phế liệu cá khảo sát trong nghiên cứu này, hàm lượng protein khoảng 30-35 wt.%. Trong khi đó, hàm lượng khoáng chiếm 10-15 wt.%. Hàm lượng lipid có sự khác nhau khá lớn giữa cá chêm (10,4 wt.%), cá diêu hồng (8,9 wt.%) so với cá rô phi (2,4wt.%). Từ kết quả phân tích ở trên cho thấy, chúng ta có thể thu nhận protein, khoáng chất và lipid từ phế liệu cá cho các ứng dụng khác nhau. Trong đó, lượng khoáng chất chủ yếu trong xương cá chính là HA, một khoáng chất rất tốt và đã được nghiên cứu ứng dụng trong các ngành như thực phẩm và y dược [4,10,11].

2. Tiềm xử lý phế liệu cá

Quá trình tiền xử lý nhằm tách riêng phần hữu cơ chứa chủ yếu là protein từ lượng thịt còn lại sau phi-lê và phần nội tạng của cá.

Trong thực tế, có một số cách khác nhau để tách riêng phần hữu cơ và vô cơ này nhưng phổ biến nhất là phương pháp đun sôi bằng nước và phương pháp thủy phân protein sử dụng kiềm hoặc enzym. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp đun sôi vì đây là phương pháp đơn giản, dễ triển khai, không sử dụng hóa chất nên giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

Mẫu cá phế liệu được cho vào nồi chứa nước cất với tỷ lệ 1/10 (w/v), sau đó đun sôi trong 2 giờ. Sau đó, xương cá được lọc tách, rửa bằng nước nóng 3 lần và sấy khô sẽ thu được xương cá dạng thô. Hình 2 là hình ảnh phế liệu cá và xương cá thô thu được sau khi đun sôi trong 2 giờ, rửa sạch và sấy khô. Kết quả cho thấy xương cá diêu hồng thô thu được sau khi tách phần hữu cơ có hơi vàng (Hình 2a), còn xương cá chêm (Hình 2b) và xương cá rô phi (Hình 2c) có màu trắng. Màu vàng có thể là do phần hữu cơ còn lại bám chặt trên bề mặt của xương.



Hình 2. (a) Xương cá diêu hồng, (b) cá chêm và (c) cá rô phi ở dạng thô sau quá trình tiền xử lý.

Thành phần cơ bản của các mẫu xương thô được phân tích và trình bày trong Bảng 2. Theo đó, các thành phần phi khoáng đã giảm đi nhiều so với nguyên liệu ban đầu. Thành phần xương thô có chứa trên 50% về khối lượng là khoáng

chất. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng khoáng chất này chính là hydroxyapatite [4-6]. Do đó, đây chính là nguồn nguyên liệu tốt tiềm năng để sản xuất HA có độ tinh khiết cao và có nguồn gốc từ tự nhiên.

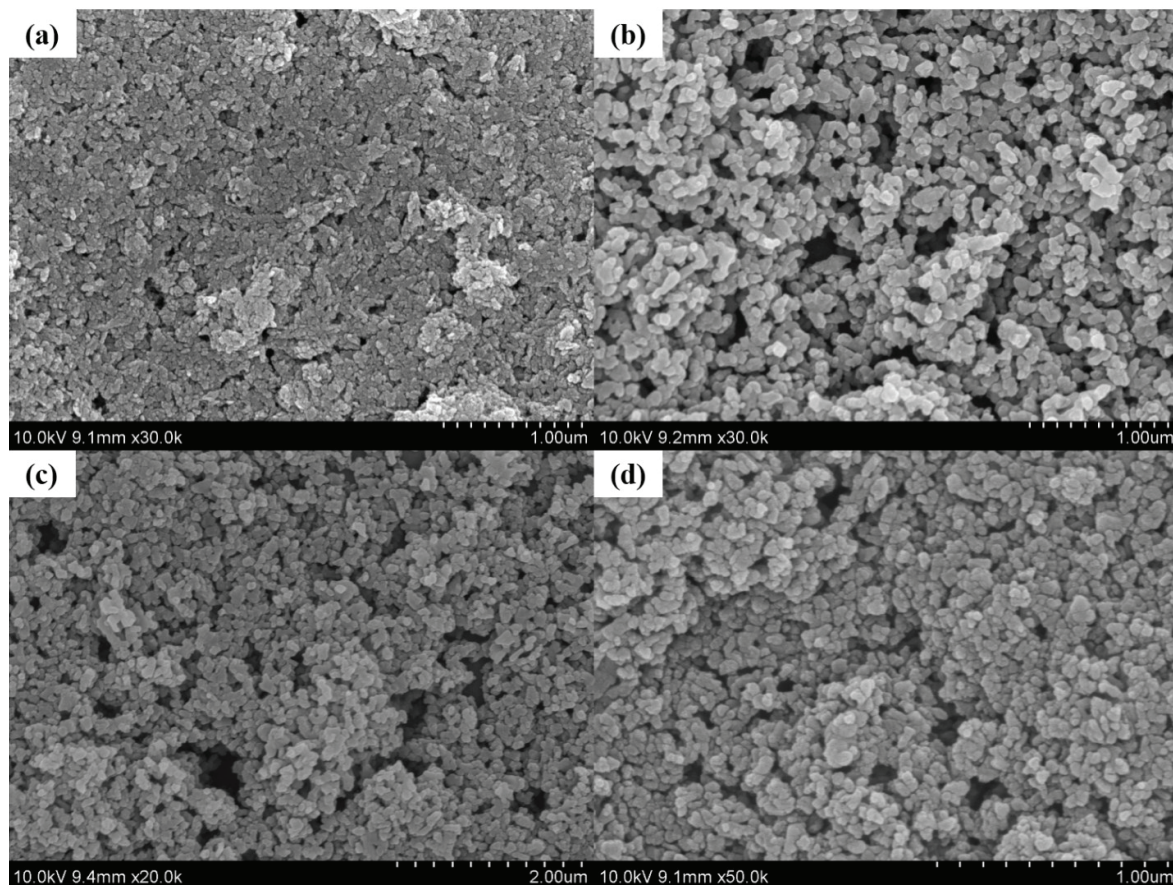
Bảng 2. Thành phần nguyên liệu xương cá thô khi xử lý nguyên liệu bằng cách đun sôi

Xương cá thô	Độ ẩm (%)	Khoáng (%)	Phi khoáng (%)
Cá chêm (<i>Lates calcarifer</i>)	25,4 ± 0,6	51,5 ± 0,5	23,1 ± 0,3
Cá rô phi (<i>Oreochromis niloticus</i>)	7,4 ± 0,3	61,8 ± 0,4	30,8 ± 0,5
Cá diêu hồng (<i>Oreochromis sp.</i>)	14,6 ± 0,5	52,5 ± 0,6	32,9 ± 0,7

3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nung

Quá trình nung xương cá thô ở nhiệt độ cao (500 – 900°C) sẽ loại bỏ hoàn toàn phần hữu cơ liên kết chặt chẽ trong xương cá để thu nhận HA. Do đó, nhiệt độ nung có ảnh hưởng rất lớn đến hình dạng và kích thước của hạt HA. Hình ảnh SEM của HA thu được khi nung xương cá chêm ở các nhiệt độ khác nhau được trình bày trong Hình 4. Rõ ràng, khi nung xương cá ở 500°C thì sản phẩm HA thu được có sự kết dính với nhau, không tách thành các hạt kích thước nanomet. Nhưng khi tiến hành nung xương cá ở các nhiệt độ cao hơn (600 và 700°C) thì các

hạt HA thu được tách rời nhau khá rõ rệt với kích thước khoảng 30 – 50 nm. Kết quả này tương đương với kết quả thu nhận HA trong điều kiện tương tự từ xương cá ngừ (~ 50 nm) [12] và nhỏ hơn nhiều so với HA từ xương cá tuyết (300 – 500 nm) [13]. Tuy nhiên, tại 900°C thì các hạt HA lại có xu hướng kết dính lại với nhau và kích thước hạt lớn hơn (50 – 70 nm). Như vậy, tại nhiệt độ nung 700°C, các hạt HA có kích thước nhỏ và đồng đều nhất. Hiện tượng kết dính của các hạt ở nhiệt độ cao có thể được giải thích dưới đây.



Hình 3. Ảnh SEM của HA từ xương cá chêm khi nung ở các nhiệt độ khác nhau: (a) 500°C, (b) 600°C, (c) 700°C, (d) 900°C trong cùng khoảng thời gian 2 giờ.

Quá trình nung thu nhận HA từ xương cá thô có thể xảy ra theo 3 giai đoạn: (i) đốt cháy các hợp chất hữu cơ, (ii) tách loại nước, (iii) phân hủy HA. Giai đoạn thứ nhất xảy ra trong khoảng nhiệt độ 350 – 550°C, do đó sản phẩm HA thu được ở 500°C vẫn còn một lượng nhỏ

chất hữu cơ chưa bị đốt cháy. Vì vậy các hạt HA có sự kết dính với nhau (Hình 3a). Khi nung ở nhiệt độ cao hơn (600 và 700°C) thì các hợp chất hữu cơ đã được loại bỏ hoàn toàn do đó sản phẩm HA thu được gồm các hạt kích thước nhỏ, đồng đều và không kết dính với

nhau (Hình 3b và 3c). Tuy nhiên, khi tiến hành nung ở nhiệt độ 900°C thì các hạt HA lại dính với nhau nhiều hơn (Hình 3d). Điều này có thể

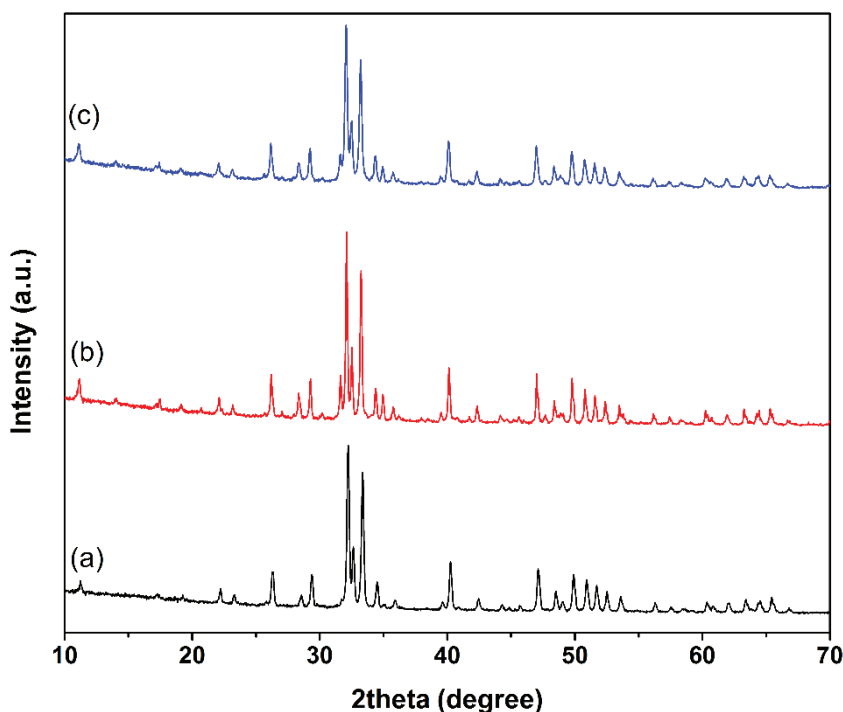


Như vậy, để thu nhận HA có kích thước nano nhỏ nhất và đồng đều nhất thì cần tiến hành nung xương cá thô ở nhiệt độ 700°C trong thời gian 2 giờ. Điều kiện nung này cũng sẽ giảm thiểu khả năng mất nước và tránh sự phân hủy HA.

4. Ảnh hưởng của thời gian nung và cấu trúc hóa học của HA

giải thích do xảy ra quá trình tách nước và phân hủy HA tại nhiệt độ cao 850 – 900°C theo các phương trình phản ứng sau [13]:

Thời gian nung có ảnh hưởng đến tính chất kết tinh của sản phẩm. Từ kết quả của ảnh hưởng bởi nhiệt độ đến tính chất sản phẩm trong mục 3.3, chúng tôi lựa chọn cố định nhiệt độ 700°C và xương cá chêm thô để đánh giá ảnh hưởng của thời gian nung khác nhau (1, 2 và 3 giờ). Độ kết tinh của sản phẩm được đánh giá thông qua phổ nhiễu xạ tia X.



Hình 4. Phổ XRD của sản phẩm HA từ xương cá chêm thu được khi nung ở 700oC với thời gian khác nhau (a) 1 giờ, (b) 2 giờ, (c) 3 giờ.

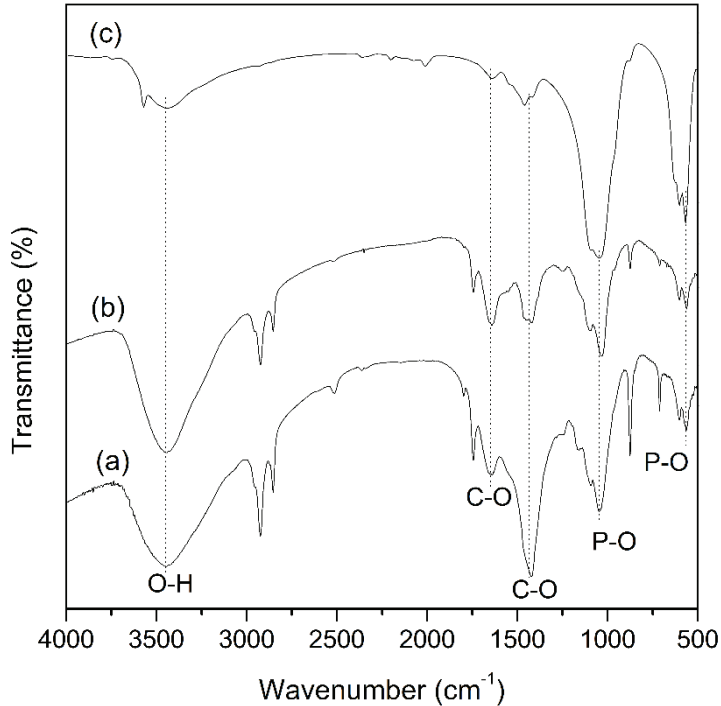
Hình 4 trình bày phổ XRD của HA thu được từ xương cá chêm khi nung ở 700°C với thời gian khác nhau. Kết quả cho thấy, tất cả các phổ đều xuất hiện các đỉnh phù hợp với phổ chuẩn của HA có ký hiệu JCPDS-09-0432 [4-5]. Các đỉnh đều sắc nhọn chứng tỏ HA có độ kết tinh cao. Tuy nhiên, khi nung ở các thời gian khác nhau thì cường độ các đỉnh có thay đổi ở vị trí 2θ bằng 28° và 31°. Chứng tỏ thời gian nung 1 giờ thu được các hạt HA có độ kết

tinh thấp hơn 2 và 3 giờ. Trong khi, cường độ các đỉnh khi nung 2 và 3 giờ không khác nhau. Như vậy, thời gian nung đạt độ kết tinh cao và tốn ít năng lượng nên chọn là 2 giờ. Ngoài ra, không có xuất hiện các đỉnh lạ so với mẫu chuẩn chứng tỏ HA thu được có độ tinh khiết cao.

Để đánh giá cấu trúc hóa học và độ tinh khiết, sản phẩm được phân tích trên phổ hồng ngoại (FT-IR). Hình 5 cho biết cấu trúc hóa học

của HA từ xương cá rô phi (Hình 5a), cá diêu hồng (Hình 5b) và cá chẽm (Hình 5c) thu được khi nung ở 700°C với thời gian 2 giờ. Đỉnh lớn tại bước sóng khoảng 3570 cm⁻¹ đặc trưng cho nhóm hydroxyl (-OH) của HA và nước hấp thụ.

Các đỉnh tại vị trí 560 và 1092 cm⁻¹ đặc trưng cho nhóm phot-phat (PO₄³⁻). Các đỉnh hấp thụ tại các vị trí 1460 và 1610 cm⁻¹ là do nhóm cacbonat (CO₃²⁻) [16].



Hình 5. Phổ FT-IR của HA từ xương cá rô phi (a), cá diêu hồng (b) và (c) cá chẽm thu được khi nung ở 700°C với thời gian 2 giờ.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Hydroxyapatit dạng bột có kích thước nanomet có thể được tách thành công từ xương cá bằng phương pháp xử lý nhiệt. Đối với xương cá chẽm, điều kiện xử lý thích hợp nhất bao gồm 2 bước: (i) đun sôi trong 2 giờ và (ii) nung ở 700°C trong 2 giờ. Sản phẩm thu được có kích thước nhỏ (30 – 50nm), khá đồng đều, độ xốp và độ tinh khiết cao. Các tính chất tốt của sản phẩm cho thấy các tiềm năng ứng dụng lớn trong xử lý môi trường, thực phẩm và y dược. Tuy nhiên, đây mới chỉ là các kết quả nghiên cứu bước đầu. Để có thể tiến gần đến sản xuất và ứng dụng trong thực tế thì cần tiến hành các nghiên cứu tiếp theo đầy đủ hơn như đánh giá tính chất tương thích

sinh học của HA, tiến hành thiết kế và sản xuất HA ở qui mô pilot. Ngoài ra, các đánh giá về hiệu quả kinh tế của quá trình cũng rất cần thiết.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Nha Trang trong đề tài mã số TR2017-13-02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Choudhury, G. S., Gogoi, B. K., 1995. Extrusion Processing of Fish Muscle: A Review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4, 37–67.
2. Choudhury, G. S., Bublitz, C. G., 1996. in G. S. Mittal (Ed.). *Computerized control systems in the food industry* New York: Marcel Dekker Inc, 513–538.
3. Gosmez-Guillén, M. C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M. D., Ulmo, N., Lizarbe, M. A., Montero, P., 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16, 25-34.
4. Pham, T. D. P., Nguyen, C. M., Hoang, N. C., Nguyen, V. M., Nguyen, T. H., Nguyen, V. H., Ha, T. H. Y., Trang, S. T., 2016. Recovery of protein hydrolysate and chitosan from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) heads: approaching a zero waste process. *Journal of Food Science and Technology*, 54,1850-1856
5. Cao, L. Y, Zhang, C. B., Huang, J. F., 2005. Synthesis of hydroxyapatite nanoparticles in ultrasonic precipitation. *Ceramics International*, 31, 1041–1044.
6. Guo, G., Sun, Y., Wang, Z., Guo, H., 2005. Preparation of hydroxyapatite nanoparticles by reverse micro-emulsion. *Ceramics International*, 31, 869–872.
7. Huang, Y. C., Hsiao, P. C., Chai, H. J., 2011. Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. *Ceramics International*, 37, 1825–1831.
8. Barakat, N. A. M., Khil, M. S., Omran, A. M., Sheikh, F. A., Kim, H. Y., 2009. Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods. *Journal of Materials Processing Technology*, 209, 3408–4315.
9. Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A., 2013. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, 9, 7591–7621.
10. Akram, M., Ahmed, R., Shakir, I., Ibrahim, W.A.W., Hussain, R., 2014. Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources. *Journal of Materials Sciences*, 49, 1461–1475.
11. Sobczak-Kupiec, A., Pluta, K., Drabczyk, A., Włoś, M., Tyliczszak, B., 2018. Synthesis and characterization of ceramic – polymer composites containing bioactive synthetic hydroxyapatite for biomedical applications. *Ceramics International*, 44, 13630-13638.
12. Boutinguiza M., Pou J., Comesaña R., Lusquiños F., de Carlos A., León B., 2012. Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. *Materials Science and Engineering C* 32, 478–486.
13. Piccirillo C., Silva M.F., Pullar R.C., Braga da Cruz I., Jorge R., Pintado M.M.E., Castro P.M.L., 2013. Extraction and characterisation of apatite- and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones. *Materials Science and Engineering C* 33, 103–110.
14. Nguyen, T.M.H., 2014. Nutritional composition of hydrolysates from Barramundi (*Lates calcarifer*) heads and frame by enzyme Flavourzyme. *Journal of Science - Can Tho University*, 1, 49-53.
15. Nguyen, T.M.H., 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, 48 - 55.
16. Kumar, R., Prakash, K.H., Cheang, P., Khor, K.A., 2004. Temperature driven morphological changes of chemically precipitated hydroxyapatite nanoparticles. *Langmuir*, 20, 5196–5200.