

# Nghiên cứu cải tiến quy trình thu nhận chitin từ phế liệu tôm bằng kết hợp xử lý nhiệt và tẩy màu

Nguyễn Công Minh<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Hòa<sup>2</sup>, Phạm Thị Đan Phượng<sup>2</sup>, Trang Sĩ Trung<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang

<sup>2</sup>Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nha Trang

Ngày nhận bài 16/6/2016, ngày chuyển phản biện 24/6/2016, ngày nhận phản biện 13/7/2016, ngày chấp nhận đăng 20/7/2016

Nghiên cứu được thực hiện nhằm rút ngắn thời gian và nâng cao chất lượng của chitin thu nhận từ vỏ tôm, đồng thời giúp kiểm soát tốt quá trình gia nhiệt và khử màu trong quá trình tách chiết chitin. Phế liệu vỏ tôm được xử lý qua 3 giai đoạn: (i) khử khoáng với dung dịch HCl 4%, tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch acid 1/5 (w/v) ở 50°C trong 10 giờ; (ii) khử protein với dung dịch NaOH 3%, tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch 1/5 (w/v) ở 70°C trong 12 giờ, (iii) khử màu với dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5%, tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch 1/15 (w/v) ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Sản phẩm chitin thu được có độ deacetyl thấp (7,2%) với khối lượng phân tử trung bình (1076 kDa), cùng hàm lượng protein (0,73%) và khoáng (0,86%) còn lại rất nhỏ, đảm bảo tiêu chuẩn sử dụng cho thương mại.

**Từ khóa:** chitin, khử khoáng, khử màu, khử protein, phế liệu tôm, tách chiết chitin.

**Chỉ số phân loại 4.5**

## Improvement of chitin quality from shrimp wastes by the combination of heat treatment and decolorization

### Summary

This study aims to reduce reaction time but improve the chitin quality in the isolation of chitin from shrimp shells as well as control properly reaction temperature and decolorization. The raw shrimp shells was treated by three steps: (i) demineralization in 4% HCl solution with raw material/solution ratio of 1/5 (w/v) at 50°C for 10 hours, (ii) deproteinization in 3% NaOH solution with raw material/solution ratio of 1/5 (w/v) at 70°C for 12 hours, (iii) decolorization in 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution with raw material/solution ratio of 1/15 (w/v) at room temperature for 12 hours. The as-prepared chitin has low acetyl degree of 7.2 % with medium molecular weight of 1076 kDa. The protein (0.73 wt.%) and mineral (0.86 wt.%) contents are acceptable for using as a commercial chitin product.

**Keywords:** chitin, decolorization, demineralization, deproteinization, extraction of chitin, shrimp wastes.

**Classification number 4.5**

### Đặt vấn đề

Chitin là polymer sinh học được tạo thành từ các đơn phân N-acetyl-β-D-glucosamin liên kết với nhau qua liên kết β-1,4-glucosid. Chitin có trong thành phần cấu tạo của vỏ tôm, vỏ cua, vỏ gẹ, côn trùng và một số loài nấm [1]. Trong tự nhiên, chitin là nguồn polysaccharide nhiều thứ hai sau cellulose [2]. Chitin trong vỏ tôm thuộc nhóm α-chitin, liên kết bền vững với các thành phần khác như protein, lipid, khoáng và chất màu. Do đó, để thu nhận chitin từ vỏ tôm cần sử dụng các quá trình loại bỏ các thành phần nêu trên bao gồm khử khoáng, khử protein và khử màu [1, 2].

Các phương pháp phổ biến để thu nhận chitin từ vỏ tôm là phương pháp hóa học, phương pháp sinh học hoặc kết hợp phương pháp hóa học với sinh học [1, 3, 4]. Mỗi phương pháp trên đều có ưu và nhược điểm riêng. Khi xử lý bằng phương pháp hóa học, quá trình khử protein tiến hành với dung dịch kiềm, khử khoáng với dung dịch acid loãng, trong khi khử màu thường sử dụng các loại dung môi hữu cơ kết hợp với các chất có tính oxy hóa (KMnO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>...) hoặc sử dụng ánh sáng mặt trời [3].

\*Tác giả liên hệ: Email: trungts@ntu.edu.vn

Hiện nay, việc thu nhận chitin từ phế liệu tôm tại Việt Nam thường không sử dụng nâng nhiệt nên thời gian xử lý bằng NaOH để khử protein dài từ 2-3 ngày, khử khoáng bằng HCl từ 1-2 ngày. Tuy nhiên, khi nâng nhiệt quá cao và không được kiểm soát thì dù có rút ngắn thời gian xử lý nhưng vẫn ảnh hưởng lớn đến chất lượng chitin. Mặt khác, đối với quá trình tẩy màu thì thường dùng hoá chất, phổ biến nhất là chlorine mà không kiểm soát tốt điều kiện xử lý nên cũng ảnh hưởng lớn đến chất lượng chitin thu được.

Trên thế giới, đã có nhiều công bố về sử dụng phương pháp hóa học kết hợp gia nhiệt để thu nhận chitin từ vỏ tôm. Theo Kim và cộng sự [2], quá trình khử protein trong vỏ tôm được tiến hành trong dung dịch NaOH hoặc KOH 1-10% ở 30-100°C. Còn No và cộng sự [4] cho rằng, để đạt yêu cầu về chất lượng chitin cần áp dụng các chế độ khử protein và khử khoáng riêng cho từng loại nguyên liệu [5]. Kết quả tương tự đối với nghiên cứu của Shahidi và cộng sự [6]. Khi xử lý vỏ tôm trong dung dịch KOH 1-2% ở 90°C, tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch kiềm 1/20 (w/v) trong 1 giờ có thể khử 90% protein. Theo Whistler và cộng sự [5], chiết tách chitin từ vỏ tôm bằng dung dịch NaOH 10% ở 100°C sẽ rút ngắn đáng kể thời gian của quy trình sản xuất chitin - chitosan. Các công bố trên đã cho biết ảnh hưởng của nồng độ chất phản ứng và nhiệt độ đến thời gian tách chiết và chất lượng sản phẩm chitin thu được. Tuy nhiên, các công bố này mới chỉ tập trung vào khảo sát các công đoạn riêng lẻ. Mặt khác, khi tiến hành phản ứng ở nhiệt độ cao trong thời gian dài sẽ dẫn đến quá trình cắt mạch chitin [1, 3]. Hơn nữa, một lượng lớn hóa chất sử dụng cho các quá trình khử protein, khoáng và chất màu cũng sẽ hạn chế ứng dụng của các quy trình trên vào thực tế sản xuất công nghiệp.

Từ những vấn đề nêu trên, nghiên cứu này sẽ khảo sát một cách hệ thống ảnh hưởng của nồng độ chất phản ứng và nhiệt độ đến thời gian tách chiết và chất lượng sản phẩm chitin thu được. Từ đó, lựa chọn điều kiện thích hợp để có thể ứng dụng trong sản xuất công nghiệp vừa rút ngắn thời gian, giảm lượng hóa chất sử dụng nhưng vẫn thu được sản phẩm chitin đạt chất lượng tốt.

## **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu**

### *Đối tượng nghiên cứu*

Nguyên liệu đầu vỏ tôm được thu nhận tại Công ty cổ phần chế biến thủy sản (F17) Nha Trang, Khánh

Hòa. Nguyên liệu được vận chuyển lạnh về phòng thí nghiệm bằng dụng cụ cách nhiệt và bảo quản ở -20°C đến khi tiến hành thí nghiệm.

### *Quá trình khử khoáng, protein và màu*

Trong quá trình khử khoáng, 50 kg bã vỏ tôm được ngâm chiết với dung dịch HCl (2, 3, 4%) ở 30, 50, 70°C trong 2-16 giờ với tỷ lệ bã rắn/dung dịch là 1/5. Trong quá trình khử protein, nguyên liệu được ngâm với dung dịch NaOH (2, 3, 4, 5%) ở 30, 50, 70, 90°C trong 6-27 giờ với tỷ lệ rắn/dung dịch là 1/5. Quá trình khử màu được tiến hành với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1; 0,3; 0,5; 0,7 và 0,9%) trong 4-24 giờ với các tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch khác nhau.

### *Xác định hàm lượng khoáng, độ ẩm, lipid và protein*

Hàm lượng khoáng, độ ẩm của vỏ tôm và chitin được xác định theo phương pháp chuẩn của AOAC [7] ở 105 và 550°C. Hàm lượng lipid trong nguyên liệu vỏ tôm được phân tích theo phương pháp Folch [8].

Hàm lượng protein trong nguyên liệu vỏ tôm và trong chitin được xác định bằng phương pháp Biuret [9, 10]. Nguyên liệu (vỏ tôm, chitin) được ủ trong dung dịch NaOH 3% ở 80°C trong 8 giờ. Sau khi ủ, tiến hành lọc và rửa bằng 15 ml NaOH 3% và định mức dịch lọc đến một thể tích nhất định. Dịch lọc sau ly tâm được phản ứng với thuốc thử Biuret trong 15 phút ở nhiệt độ phòng và đo phổ UV-Vis ở bước sóng 570 nm. Hàm lượng protein của mẫu chitin - chitosan được xác định theo công thức sau:

$$Protein(\%) = \frac{V_1(ml) \times C(mg/ml)}{w(g) \times \frac{(100-MC)}{100} \times 100 (mg/g)}$$

Trong đó,  $V_1$  là thể tích dịch lọc (ml),  $C$  là hàm lượng protein tính theo đường chuẩn Biuret (mg/ml),  $w$  là khối lượng mẫu ủ (g),  $MC$  là độ ẩm của mẫu (%).

### *Xác định hàm lượng chitin*

Phân tích hàm lượng chitin trong nguyên liệu vỏ tôm được xác định theo công bố trước đây [11]. Cân 2 g vỏ tôm cho vào bình chứa 50 ml HCl 1 M trong thời gian 1 giờ ở 80°C, sau quá trình xử lý với acid, nguyên liệu được rửa đến trung tính và xử lý tiếp tục với 100 ml NaOH 1 M trong thời gian 1 giờ ở 90°C trong bể ổn nhiệt, bã sau xử lý acid và kiềm được rửa lại 2 lần với 15 ml acetone và sấy khô sản phẩm ở 110°C đến

trọng lượng không đổi. Hàm lượng chitin được tính theo công thức:

$$CT(\%) = \frac{m_2 \times 100}{m_1 \times \frac{100-MC}{100}}$$

Trong đó,  $m_1$ ,  $m_2$  là khối lượng nguyên liệu trước và sau khi sấy.  $MC$  là độ ẩm của nguyên liệu ban đầu.

#### Xác định hàm lượng astaxanthin

Hàm lượng astaxanthin trong nguyên liệu vỏ tôm và trong chitin được xác định theo phương pháp [12, 13]. Nguyên liệu được đồng hóa trong hệ dung môi hexan/isopropanol 3/2 (v/v). Sau đó, lọc để loại phần bã và bổ sung thêm 12 ml eter dầu mỏ, 10 ml nước muối sinh lý (0,9%) vào phần dịch lọc, lắc nhẹ bình chiết và để yên trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Thu nhận pha trên và cô quay chân không ở 40°C để bay hơi dung môi. Hòa tan mẫu sau cô quay với eter dầu mỏ và định mức lên 10 ml, đo độ hấp thụ của dung dịch ở 468 nm (A468). Hàm lượng astaxanthin được tính theo công thức của Simpson và Haard [13]:

$$C(\mu g/g) = \frac{A.D.V}{0,2G}$$

Trong đó,  $C$  là hàm lượng astaxanthin trong mẫu ( $\mu g/g$  mẫu),  $A$  là độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 468 nm,  $V$  là thể tích mẫu chiết (ml),  $D$  là hệ số pha loãng,  $G$  là trọng lượng mẫu khô (g),  $0,2$  là độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 468 nm của astaxanthin chuẩn 1  $\mu g/ml$ .

#### Xác định độ deacetyl

Độ deacetyl chitin được xác định theo phương pháp của Tao và Svetlana [14]. Chitin được hòa tan trong  $H_3PO_4$  đậm đặc trong 40 phút ở 60°C. Sau đó pha loãng dung dịch với nước (pha loãng 10 lần) và tiến hành ở 60°C trong 2 giờ rồi đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 210 nm. Độ deacetyl của chitin được xác định theo công thức:

$$DD = 100 * \left[ 1 - \frac{mMGlCNAc}{mMGlCNAc + mMGlC} \right]$$

$$mMGlC = \frac{w - (mMGlCNAc * 0,2032)}{0,16117}$$

Trong đó,  $DD$  là độ deacetyl của chitin,  $W$  là khối lượng của mẫu,  $mMGlCNAc$  là hàm lượng NAC Glc tính theo đường chuẩn,  $mMGlC$  là hàm lượng glucosamine.

#### Xác định trọng lượng phân tử trung bình của chitin

Trọng lượng phân tử trung bình của chitin được xác định theo phương pháp đo độ nhớt nội [15]. Chitin được hòa tan trong dung dịch NaOH 10%, độ nhớt nội của dung dịch chitin được xác định qua hệ mao quản của nhớt kế Ostwald. Phân tử lượng trung bình của chitin được xác định theo công thức:

$$\mu = KM^a$$

Trong đó,  $\mu$  là độ nhớt nội của dung dịch chitin;  $K$  và  $a$  là các hằng số phụ thuộc vào dung môi,  $K = 0,1a = 0,68$  (đối với NaOH 10%);  $M$  là trọng lượng phân tử trung bình của chitin.

#### Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu báo cáo là kết quả của 3 lần phân tích và được xử lý thống kê với phần mềm Minitab và các đồ thị được biểu diễn bằng phần mềm Origin 8.0.

#### Kết quả nghiên cứu và bàn luận

##### Thành phần nguyên liệu và sản phẩm

Kết quả phân tích thành phần hóa học của nguyên liệu đầu vỏ tôm và sản phẩm chitin thu được trước và sau khi khử màu được trình bày trong bảng 1. Theo đó, thành phần hóa học của vỏ tôm chủ yếu chứa protein (45,2%), khoáng (21,5%), chitin (17,2%) và một số thành phần khác như lipid và chất màu. Protein trong nguyên liệu vỏ tôm chủ yếu là phần thịt còn sót lại ở vỏ tôm và một phần protein liên kết trong cấu trúc chitin. Chất khoáng trong vỏ tôm chủ yếu là  $CaCO_3$ ,  $Ca_3(PO_4)_2$  và một số muối vô cơ khác. Thông thường phân khoáng này sẽ bị hòa tan khi xử lý với dung dịch HCl, tuy nhiên lượng nhỏ khoáng liên kết sâu trong cấu trúc chitin rất khó tách. Hàm lượng chitin trong vỏ tôm ở đây cao hơn so với công bố trước đây [3]. Sự khác nhau này có thể do mùa vụ thu hoạch và thành phần nguyên liệu.

Hàm lượng sắc tố trong vỏ tôm là 143,5 ppm, được biết đến chủ yếu là astaxanthin [3]. Trong quá trình sản xuất chitin, astaxanthin sẽ bị mất một phần do tác động của HCl và NaOH, tuy nhiên sản phẩm chitin vẫn còn chứa một lượng astaxanthin nhất định và chính lượng astaxanthin này tạo nên màu đặc trưng cho sản phẩm chitin. Ngoài các thành phần trên, trong phế liệu tôm còn chứa một lượng đáng kể lipid (8,1%). Thành phần lipid này có thể được loại bỏ trong quá trình khử protein với NaOH thông qua phản ứng xà phòng hóa [3].

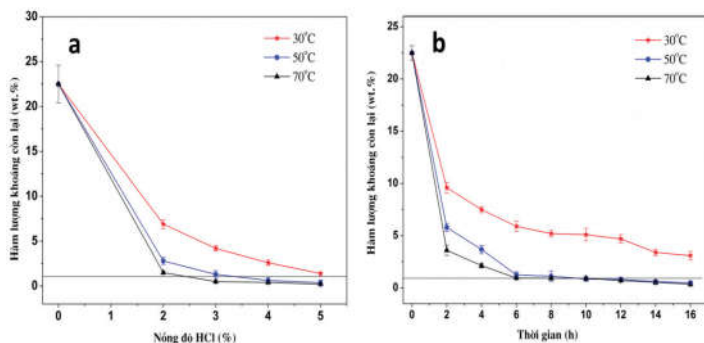
Bảng 1: thành phần và tính chất của vỏ tôm ban đầu và của chitin trước và sau khi khử màu

Chỉ tiêu	Vỏ tôm	Chitin trước khử màu	Chitin sau khử màu
Protein (%)	45,2±1,7	0,83±0,08	0,73±0,2
Khoáng (%)	21,5±0,5	0,97±0,05	0,86±0,1
Lipid (%)	8,12±0,4	-	-
Chitin (%)	17,2±1,6		-
Màu sắc	-	Đỏ hồng	Trắng sáng
Phân tử lượng (kDa)	-	1135±34	1076±42
Astaxanthin (ppm)	143,4±41,3	7,6±1,4	2,8±0,1
Độ deacetyl (%)	-	7,2±2,4	7,2±2,2

So với nguyên liệu thô, sau khi xử lý với dung dịch HCl và NaOH, hàm lượng khoáng và protein còn lại trong chitin rất nhỏ, tương ứng là 0,83 và 0,97%. Khối lượng phân tử của chitin là 1135 kDa với độ acetyl thấp (7,2%). Tuy nhiên, sản phẩm vẫn có màu đỏ hồng do lượng chất màu còn lại khá cao (7,6 ppm), nên cần tiến hành khử màu. Kết quả sau khi xử lý với dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, màu sắc sản phẩm trở nên trắng sáng với lượng astaxanthin giảm đi gần 3 lần (2,8%) trong khi khối lượng phân tử và độ acetyl gần như không bị thay đổi. Tóm lại, kết quả phân tích cho thấy sản phẩm chitin thu được có độ tinh khiết cao, khối lượng phân tử cao, độ acetyl thấp và có màu sắc trắng sáng.

**Ảnh hưởng của nồng độ HCl và nhiệt độ đến quá trình khử khoáng**

Hình 1 thể hiện ảnh hưởng của nồng độ dung dịch HCl và nhiệt độ phản ứng đến hiệu quả của quá trình khử khoáng. Nguyên liệu sau quá trình ép được khử khoáng với dung dịch HCl 2, 3, 4, 5% ở các nhiệt độ 30, 50, 70°C trong thời gian 2-16 giờ.



Hình 1: (a) Ảnh hưởng của nồng độ HCl và nhiệt độ đến hiệu quả khử khoáng, (b) Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến hiệu quả khử khoáng (đường nét đứt là hàm lượng khoáng còn lại tại 1%)

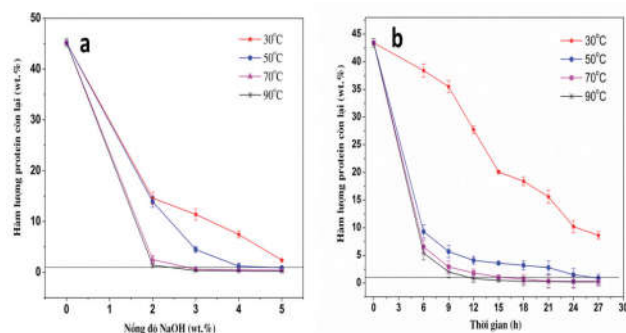
Theo kết quả thí nghiệm, hiệu suất quá trình khử khoáng phụ thuộc nhiều vào nồng độ HCl và nhiệt độ phản ứng (hình 1a). Khi xử lý ở nhiệt độ thấp (30°C) hiệu quả khử khoáng đạt được tương đối thấp. Cụ thể, khi dùng dung dịch HCl 2, 3, 4, 5% thì hàm lượng khoáng còn lại trong sản phẩm chitin sau 16 giờ tương ứng là 13,9; 10,2; 8,6; 6,4%. Tất cả các mẫu chitin chưa đạt yêu cầu thương mại về hàm lượng khoáng. Tuy nhiên, nếu tăng nhiệt độ xử lý lên 50°C, lượng khoáng được loại bỏ gần như hoàn toàn. Cụ thể, khi xử lý với HCl 2, 3, 4, 5% thì hàm lượng khoáng còn lại là 5,8; 3,3; 0,7; 0,5. Do đó, khử khoáng ở 50°C với HCl 4% trong 12 giờ có thể thu được chitin đạt yêu cầu về chất lượng thương mại (khoáng < 1%). Tiếp tục tăng nhiệt độ xử lý lên 70°C, hiệu suất khử khoáng tăng rõ rệt, hàm lượng khoáng còn lại trong chitin đạt yêu cầu ở nồng độ HCl 3%. Tuy nhiên, việc xử lý ở nhiệt độ cao là khó áp dụng ở quy mô lớn do HCl rất dễ bay hơi dẫn đến lượng hóa chất bị tổn thất lớn và dễ gây hư hỏng thiết bị. Hơn nữa, khi xử lý ở nhiệt độ cao sản phẩm chitin bị vụn do quá trình cắt mạch xảy ra mạnh [3]. Như vậy, việc xử lý với HCl 4% ở 50°C được xem là phù hợp do hàm lượng khoáng còn lại sau xử lý là 0,8% (đạt yêu cầu về chất lượng chitin thương mại).

Thời gian phản ứng là một yếu tố quan trọng quyết định đến hiệu quả của phản ứng hóa học. Theo kết quả thí nghiệm (hình 1b), lượng khoáng bị khử phần lớn trong khoảng 1 giờ đầu. Ví dụ, sau 1 giờ thì hàm lượng khoáng còn lại của mẫu xử lý ở 30 và 70°C đạt được lần lượt là 10,6 và 3,1%. Kết quả này tương đồng với nhận định của nguyên cứu trước đây [3]. Khi tăng thời gian xử lý thì hàm lượng khoáng bị khử tương đối chậm, nguyên nhân có thể do lượng khoáng còn lại liên kết vững chắc trong cấu trúc chitin. Mặt khác, nhiệt độ càng tăng thì thời gian xử lý được rút ngắn. Tuy nhiên, việc xử lý ở nhiệt độ cao có khả năng gây cắt mạch chitin. Do đó, tùy theo yêu cầu về chất lượng chitin và công nghệ hiện tại của các nhà máy sản xuất mà có thể áp dụng các điều kiện xử lý khử khoáng khác nhau. Trong nghiên cứu này, nguyên liệu xử lý với HCl 4% trong 10 giờ ở 50°C được lựa chọn là điều kiện tối ưu cho quá trình khử khoáng.

**Ảnh hưởng của nồng độ NaOH và nhiệt độ đến quá trình khử protein**

Sau khi khử khoáng (HCl 4%, 50°C, 10 giờ), nguyên

liệu được khử protein với NaOH 2, 3, 4, 5% ở 30, 50, 70, 90°C trong 6-27 giờ. Kết quả phân tích được thể hiện ở hình 2.



Hình 2: (a) Ảnh hưởng của nồng độ NaOH và nhiệt độ đến hiệu quả khử protein, (b) Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến hiệu quả khử protein (đường nét đứt là hàm lượng protein còn lại tại 1%)

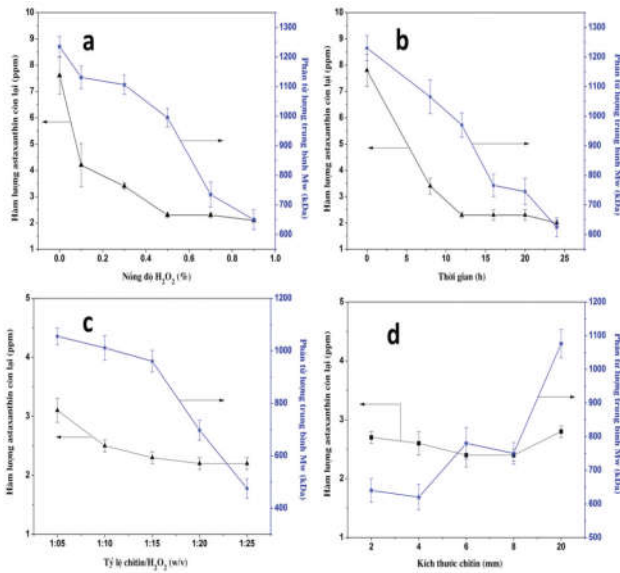
Theo kết quả thí nghiệm, khả năng khử protein trong nguyên liệu vỏ tôm phụ thuộc nhiều vào nồng độ NaOH và nhiệt độ xử lý. Khi nhiệt độ xử lý thấp (30 và 50°C), hàm lượng protein còn lại trong chitin khi xử lý ở các nồng độ NaOH 2, 3, 4, 5% là tương đối lớn. Tuy nhiên khi tăng nhiệt độ lên 70 và 90°C thì sự khác biệt giữa ba nồng độ (3, 4, 5%) nghiên cứu là không nhiều. Điều này có thể do ở nhiệt độ thấp quá trình khử protein phụ thuộc chủ yếu vào nồng độ NaOH, còn ở nhiệt độ cao thì sự tác động đồng thời của NaOH và nhiệt độ đã đẩy nhanh quá trình tách protein ra khỏi nguyên liệu. Cụ thể, khi NaOH sử dụng là 2% thì sự tăng nhiệt độ đến trong khoảng 30-90°C không làm giảm hàm lượng protein trong chitin xuống thấp hơn 1%. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ NaOH lên 3 và 4% ở 70°C thì hàm lượng protein trong chitin giảm mạnh khi tăng nhiệt độ và đạt được yêu cầu (protein < 1%). Tiếp tục tăng NaOH lên 5%, chitin đạt chất lượng khi xử lý ở 50°C với hàm lượng protein còn lại là 0,8%. Như vậy, chitin chỉ đạt yêu cầu về hàm lượng protein còn lại thấp hơn 1% khi xử lý với NaOH 3% hoặc 4% ở 70°C, hoặc NaOH 5% ở 50°C trong 12 giờ. Tuy nhiên, quá trình khử protein ở nhiệt độ và nồng độ NaOH cao gây cắt mạch chitin [3]. Hơn nữa, khi xử lý trong điều kiện nhiệt độ cao có khả năng gây hư hỏng thiết bị. Do vậy, để ứng dụng trong sản xuất quy mô lớn thì xử lý với NaOH 3% ở 70°C là thích hợp nhất và kết quả này được lựa chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Theo hình 2b, thời gian phản ứng có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả khử protein. Khi tăng từ 6 giờ lên 9 giờ, hiệu suất khử protein tăng từ 88,1% lên 96,3%. Tuy nhiên, sau đó hiệu suất khử protein hầu như không tăng, điều này có thể do trong 6 giờ đầu NaOH chủ yếu chỉ phản ứng với protein của thịt tôm nên phản ứng khử protein xảy ra nhanh chóng. Ví dụ, hàm lượng protein còn lại trong chitin khi xử lý 6 và 9 giờ là 4,5 và 2,1% nhưng khi tăng thời gian xử lý 12, 15, 18, 21 giờ thì hàm lượng protein trong chitin đạt được thấp hơn 1% (tương ứng là 0,8; 0,6; 0,3; 0,3%). Do vậy, lựa chọn xử lý trong 12 giờ để tiết kiệm thời gian là phù hợp với yêu cầu và kết quả này được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

### Ảnh hưởng của nồng độ $H_2O_2$ , tỷ lệ chất phản ứng và kích thước nguyên liệu đến hiệu quả khử màu

$H_2O_2$  là một tác nhân oxy hóa mạnh và nó có thể thực hiện quá trình oxy hóa astaxanthin có trong chitin giúp cho sản phẩm có màu trắng sáng [3]. Thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nồng độ  $H_2O_2$  (0,1-0,9%) đến hiệu quả khử màu chitin được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 1-24 giờ với tỷ lệ chitin/dung dịch khác nhau. Chitin sau khi khử màu được phân tích hàm lượng astaxanthin và phân tử lượng, kết quả phân tích được trình bày ở hình 3.

Kết quả cho thấy, khi tăng nồng độ  $H_2O_2$  thì hiệu quả khử màu tăng nhưng khối lượng phân tử của chitin thu được lại giảm ở các mức độ khác nhau (hình 3a). Ví dụ, khi tăng nồng độ  $H_2O_2$  từ 0,1 lên 0,3% thì hàm lượng astaxanthin giảm từ 4,2 còn 3,4 ppm nhưng trọng lượng phân tử của chitin giảm ít, từ 1131 còn 1106 (kDa) (hình 3a). Tuy nhiên, nếu tăng nồng độ  $H_2O_2$  lên cao hơn thì khối lượng phân tử chitin giảm mạnh trong khi hàm lượng astaxanthin giảm không đáng kể. Ví dụ, hàm lượng astaxanthin khi xử lý với  $H_2O_2$  ở các nồng độ 0,7 và 0,9% đạt được tương ứng là 2,3 và 2,1 ppm, trong khi phân tử lượng chitin tương ứng là 735 và 650 kDa. Ngoài ra, sự sai khác về hàm lượng astaxanthin khi xử lý  $H_2O_2$  với các nồng độ cao từ 0,5 đến 0,9% là không có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . Do vậy, nồng độ  $H_2O_2$  0,5% được xem là thích hợp cho quá trình khử màu. Tóm lại, nồng độ  $H_2O_2$  thích hợp cho quá trình khử màu chitin là 0,5% và kết quả này được sử dụng cho các thí nghiệm sau.



Hình 3: ảnh hưởng của (a) nồng độ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (b) thời gian, (c) tỷ lệ chitin/dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và (d) kích thước chitin đến hiệu quả khử màu

Thời gian xử lý có ảnh hưởng khác nhau đến phân tử lượng của sản phẩm chitin và hiệu quả khử màu (hình 3b). Ví dụ, sau 8 giờ thì hàm lượng astaxanthin giảm 68,4%. Tuy nhiên, tiếp tục tăng thời gian lên 12 giờ hàm lượng astaxanthin chỉ giảm 5,83%, trong khi sau 24 giờ hàm lượng astaxanthin không thay đổi so với mức xử lý 12 giờ. Điều này có thể do ban đầu astaxanthin tồn tại nhiều ngoài mạch chitin nên dễ bị oxy hóa. Nhưng khi lượng astaxanthin liên kết ngoài mạch bị oxy hóa hoàn toàn thì việc tách các phân tử chất màu liên kết sâu bên trong cấu trúc chitin là khó khăn.

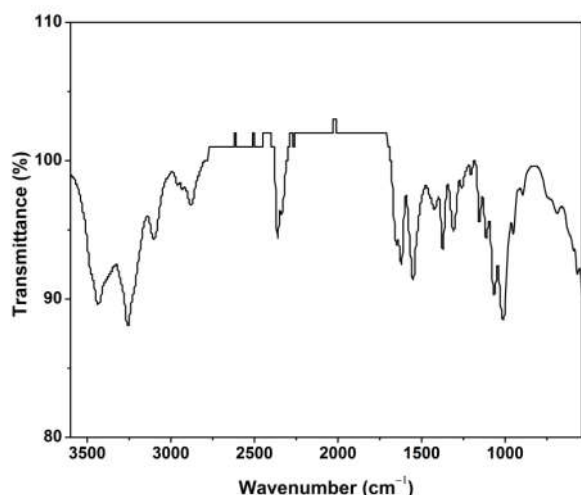
Xét về phân tử lượng chitin, thời gian xử lý càng tăng thì chitin bị cắt mạch càng mạnh, càng tăng thời gian xử lý phân tử lượng chitin càng bị giảm. Ví dụ, phân tử lượng chitin sau thời gian xử lý 8, 12, 16, 20, 24 giờ đạt lần lượt là 1065; 970; 766; 745; 624 kDa. Như vậy, sau 12 giờ, phân tử lượng chitin giảm 21,71%. Tiếp tục tăng thời gian xử lý lên trên 12 giờ thì phân tử lượng chitin giảm mạnh. Do đó, thời gian để thực hiện quá trình khử màu và không giảm khối lượng phân tử của chitin là 12 giờ. Kết quả này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của tỷ lệ chitin/dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> đối với hiệu quả khử màu cũng được khảo sát (hình 3c). Khi tăng lượng dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> làm giảm đáng kể hàm

lượng chất màu còn lại trong chitin. Cụ thể, hàm lượng astaxanthin khi xử lý với tỷ lệ chitin/dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/25 (w/v) tương ứng là 3,1; 2,5; 2,3; 2,2; 2,2 ppm. Mặt khác, tỷ lệ chitin/dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thấp (1/5, 1/10 và 1/15) dẫn đến khả năng tiếp xúc giữa chitin và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kém nên chitin ít bị cắt mạch (1055, 1011 và 860 kDa). Tuy nhiên, khi tăng lượng dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1/20 và 1/25) quá trình cắt mạch chitin diễn ra mạnh (697 và 475 kDa). Hơn nữa, việc tăng lượng dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cũng làm thay đổi giá trị cảm quan của sản phẩm chitin sau xử lý. Ví dụ, những mẫu xử lý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> với tỷ lệ chitin/dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1/20, 1/25 (w/v), chitin dễ bị vụn nát và màu chitin không được trắng sáng. Tóm lại, tỷ lệ chitin/dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thích hợp để khử màu chitin là 1/15 (w/v).

Việc xay nhỏ kích thước chitin sẽ làm tăng khả năng tiếp xúc giữa chitin với tác nhân oxy hóa để giúp việc khử màu chitin hiệu quả hơn. Thí nghiệm xác định ảnh hưởng của kích thước chitin đến quá trình khử màu được tiến hành với chitin xay có các kích thước là 2, 4, 6, 8, 20 mm. Điều kiện khử màu là dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5%, nhiệt độ phòng và tỷ lệ chitin/dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> là 1/15 (w/v). Theo hình 3d, kích thước chitin càng nhỏ thì hiệu suất khử màu càng tăng. Ví dụ, mẫu chitin có kích thước 20, 8, 6 mm, hàm lượng astaxanthin còn lại sau quá trình xử lý là 2,8; 2,7; 2,6 ppm. Đối với chitin kích thước 2 và 4 mm thì hàm lượng astaxanthin còn lại sau xử lý tương ứng là 1,6 và 2,1 ppm. Tuy nhiên, chitin xay có kích thước 2 mm bị cắt mạch nhiều nhất. Do đó, lựa chọn chitin có kích thước 20 mm để tiến hành quá trình khử màu là phù hợp. Tóm lại, để quá trình khử màu hiệu quả nhưng hạn chế ảnh hưởng đến phân tử lượng của chitin thì quá trình khử màu nên tiến hành với dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5% với tỷ lệ chitin/dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1/15 trong 12 giờ với kích thước chitin 20 mm là thích hợp.

Độ tinh khiết của sản phẩm chitin được khẳng định trên phổ hồng ngoại chuỗi Fourier (hình 4). Kết quả cho thấy, các dao động đặc trưng ứng với các nhóm chức trong phân tử chitin tại 3439 cm<sup>-1</sup> (-OH), 2878, 1429 và 1379 cm<sup>-1</sup> (-CH), 1657 và 1622 cm<sup>-1</sup> (Amide bậc 1), 1554 cm<sup>-1</sup> (Amide bậc 2). Kết quả này phù với nghiên cứu của Rinaudo [1].



Hình 4: phổ hồng ngoại chuỗi Fourier của chitin tách chiết từ vỏ tôm

## Kết luận

Chitin đã được tách chiết thành công từ phế liệu vỏ tôm bằng phương pháp xử lý nhiệt trong quá trình khử khoáng và protein kết hợp với khử màu bằng  $H_2O_2$ . Thời gian tách chiết được rút ngắn đáng kể với thời gian khử khoáng (10 giờ) và khử protein (12 giờ). Đặc trưng hóa, lý của sản phẩm chitin được cải thiện so với sản phẩm thương mại với độ deacetyl thấp (7,2%) và khối lượng phân tử trung bình (1076 kDa). Hàm lượng protein và khoáng còn lại đều nhỏ hơn 1%. Với các thông số xác định được ở đây, phương pháp chiết tách này có thể ứng dụng trong sản xuất quy mô lớn.

## Lời cảm ơn

Tập thể tác giả cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ kinh phí triển khai nội dung nghiên cứu thuộc nhiệm vụ hợp tác quốc tế về khoa học và công nghệ theo Nghị định thư “Nghiên cứu sản xuất các sản phẩm giá trị gia tăng từ phế liệu tôm để ứng dụng trong nông nghiệp”; cảm ơn ThS Hoàng Ngọc Cương đã hỗ trợ phân tích và xử lý số liệu.

## Tài liệu tham khảo

- [1] M. Rinaudo (2006), “Chitin and chitosan: Properties and applications”, *Prog. Polym. Sci.*, **31**, pp.603-632.
- [2] S.K. Kim (2010), “Chitin, chitosan, Oligosaccharides and Their derivatives”, *Biological Activities and Applications*.
- [3] Trang Sĩ Trung và cộng sự (2010), *Chitin - Chitosan từ phế liệu thủy sản và ứng dụng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [4] H.K. No, S.P. Meyers (1997), *Preparation of chitin and chitosan*, ed. C. Handbook., Italy: Atec Edizioni.
- [5] R.L. Whistler, J.N. BeMiller (1962), “Alkaline degradation of amino sugars”, *J Org Chem*, **27(4)**, pp.1161-1164.
- [6] F. Shahidi, J. Synowiecki (1991), “Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards”, *Agric Food Chem Biol Interact*, **39**, pp.1527-1532.
- [7] AOAC (1990), “Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry”, *The Association of Official Analytical Chemistry*, Washington DC.
- [8] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley (1957), “A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues”, *J. Biol. Chem*, **226**, pp.497-509.
- [9] R.F. Boyer (1993), *Modern Experimental Biochemistry (Vol 2)*, California: Benjamin/Cummings Series in the Life Sciences and Chemistry.
- [10] P. Lertsutthiwong, et al (2002), “Effect of chemical treatment on the characteristics of shrimp chitosan”, *Journal of Metals, Materials and Minerals*, **12**, pp.11-18.
- [11] M.M. Black, H.M. Schwartz (1950), “The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products”, *Analyst*, **75**, pp.185-189.
- [12] N.M. Sachindra, N. Bhaskar, N.S. Mahendrakar (2005), “Carotenoids in different body components of Indian shrimps”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**, pp.167-172.
- [13] B.K. Simpson, N.F. Haard (1985), “The use of enzymes to extract carotenoprotein from shrimp waste”, *J. Appl. Biochem*, **7**, pp.212-222.
- [14] W. Tao, Z. Svetlana (2008), “Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method”, *Carbohydrate Polymers*, **73**, pp.248-253.
- [15] A. Einbu, et al (2004), “Solution Properties of Chitin in Alkali”, *Biomacromolecules*, **5(5)**, pp.2048-2054.