

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG

PHẠM THỊ ĐAN PHƯỢNG

NGHIÊN CỨU THU NHẬN CHITOSAN LACTATE TỪ
VỎ LỘT XÁC TÔM THẺ CHÂN TRẮNG
(*LITOPENAEUS VANNAMEI*) VÀ ỨNG DỤNG THU HỒI
VI TẢO *NANNOCHLOROPSIS* SP.

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

KHÁNH HÒA, 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG

PHẠM THỊ ĐAN PHƯỢNG

NGHIÊN CỨU THU NHẬN CHITOSAN LACTATE TỪ VỎ
LỘT XÁC TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*LITOPENAEUS*
VANNAMEI) VÀ ỨNG DỤNG THU HỒI VI TẢO
NANNOCHLOROPSIS SP.

Ngành đào tạo: Công nghệ chế biến thủy sản

Mã số : 9540105

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

PGS.TS. NGUYỄN VĂN HÒA

PGS.TS. HUỖNH NGUYỄN DUY BẢO

KHÁNH HÒA, 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu do tôi thực hiện. Kết quả nghiên cứu trong luận án là trung thực và chưa có công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn về những lời cam đoan của mình.

Tác giả luận án

Phạm Thị Đan Phượng

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành gửi lời tri ân đến Ban giám hiệu Trường Đại học Nha Trang, Ban lãnh đạo Khoa Công nghệ Thực phẩm, Phòng Đào tạo Sau đại học, Trung tâm Thí nghiệm Thực hành đã tạo điều kiện cho tôi trong quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành đến thầy hướng dẫn khoa học PGS.TS. Nguyễn Văn Hòa và PGS.TS. Huỳnh Nguyễn Duy Bảo đã tận tình truyền đạt kiến thức, hướng dẫn nghiên cứu và giúp đỡ cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn đến GS. Willem Frans Stevens đã luôn ủng hộ tinh thần, hướng dẫn và dành nhiều thời gian để định hướng và góp ý cho tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

Tôi chân thành cảm ơn đến PGS.TS. Trang Sĩ Trung, TS. Nguyễn Công Minh, TS. Nguyễn Viết Nam, TS. Nguyễn Thị Như Thường, các cán bộ kỹ thuật của Trung tâm Thí nghiệm Thực hành, các em sinh viên khóa 58, 59 Khoa Công nghệ Thực phẩm đã đồng viên, giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã luôn đồng viên và chia sẻ mọi khó khăn, giúp tôi có thể hoàn thành luận án.

Một lần nữa, tôi xin chân thành cảm ơn tất cả!

Khánh Hòa, tháng 04 năm 2023

Tác giả luận án

Phạm Thị Đan Phượng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC BẢNG	ix
DANH MỤC HÌNH	xi
TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	xv
PHẦN MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	4
1.1. Tình hình nuôi tôm và ô nhiễm môi trường do chất thải trong quá trình nuôi.....	4
1.2. Quá trình lột xác của tôm thẻ chân trắng.....	7
1.2.1. Chu kỳ lột xác của tôm thẻ chân trắng.....	7
1.2.2. Cấu trúc của đầu vỏ tôm ở các chu kỳ lột xác.....	8
1.3. Chitosan và muối chitosan.....	10
1.3.1. Cấu trúc của chitosan và muối chitosan	10
1.3.2. Tính chất của chitosan, muối chitosan và ứng dụng.....	16
1.3.3. Phương pháp sản xuất chitosan và điều chế muối chitosan	21
1.4. Vi tảo biển	27
1.4.1. Nguồn lợi và vai trò của vi tảo biển trong nuôi trồng thủy sản	27
1.4.2. Phương pháp thu hoạch sinh khối vi tảo.....	32
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	41
2.1. Vật liệu nghiên cứu.....	41
2.1.1. Vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng.....	41
2.1.2. Vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp.....	42
2.1.3. Hóa chất dùng trong nghiên cứu.....	42
2.2. Phương pháp nghiên cứu	43
2.2.1. Sơ đồ tổng quát các nội dung nghiên cứu	43
2.2.2. Đánh giá tiềm năng sử dụng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng làm nguyên liệu sản xuất chitin, chitosan	45
2.2.3. Nghiên cứu quy trình sản xuất chitin từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng	48

2.2.4. Nghiên cứu sản xuất chitosan và đề xuất quy trình	52
2.2.5. Nghiên cứu điều chế chitosan lactate và đề xuất quy trình.....	53
2.2.6. Nghiên cứu thu nhận vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp. bằng chitosan lactate	59
2.3. Phương pháp phân tích	66
2.4. Phương pháp tính toán và xử lý số liệu	68
2.4.1. Phương pháp tính toán	68
2.4.2. Xử lý số liệu	69
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	70
3.1. Thực trạng và tiềm năng sử dụng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng làm nguyên liệu sản xuất chitin, chitosan	70
3.1.1. Thực trạng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng tại cơ sở nuôi tôm thâm canh.....	70
3.1.2. Sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng theo độ tuổi có thể thu hồi trong quá trình nuôi thâm canh	71
3.1.3. Thành phần hóa học của vỏ lột xác và thử nghiệm sản xuất chitin	74
3.2. Nghiên cứu điều kiện sản xuất chitin từ vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng	78
3.2.1. Thành phần hóa học cơ bản của vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng	78
3.2.2. Ảnh hưởng của điều kiện khử khoáng đến hiệu suất khử khoáng và hiệu suất thu hồi chitin	79
3.2.3. Ảnh hưởng của điều kiện khử protein đến hiệu suất khử và hiệu suất thu hồi của chitin	84
3.3. Nghiên cứu điều kiện sản xuất chitosan và đề xuất quy trình sản xuất chitosan từ vỏ tôm lột xác	89
3.3.1. Ảnh hưởng của điều kiện deacetyl đến hiệu suất thu hồi và tính chất cơ bản của chitosan.....	89
3.3.2. Đề xuất quy trình sản xuất chitosan và đánh giá tính chất hóa lý của sản phẩm	90
3.4. Nghiên cứu điều kiện điều chế chitosan lactate và đề xuất quy trình	96
3.4.1. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol của hỗn hợp dung môi ethanol/nước đến độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate	96
3.4.2. Ảnh hưởng của thời gian ngâm chitosan đến độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate	99

3.4.3. Ảnh hưởng của nồng độ acid phản ứng đến độ hòa tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate.....	101
3.4.4. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến độ hòa tan và hiệu suất thu hồi của chitosan lactate.....	102
3.4.5. Đề xuất quy trình điều chế và tính chất hóa lý của chitosan lactate	103
3.5. Nghiên cứu ứng dụng thu hồi vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp. bằng chitosan lactate	111
3.5.1. Tính chất và thành phần hóa học cơ bản của vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp.	111
3.5.2. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate sử dụng đến hiệu suất lắng.....	113
3.5.3. Ảnh hưởng của kết hợp sử dụng chitosan lactate và điều chỉnh pH đến hiệu suất lắng.....	117
3.5.4. Ảnh hưởng của phương pháp thu nhận đến hiệu suất thu hồi chlorophyll-a và carotenoids và khả năng sinh trưởng của sinh khối vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp.....	122
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	126
Kết luận.....	126
Kiến nghị	126
TÀI LIỆU THAM KHẢO	127

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
AA	Arachidonic acid	Arachidonic acid
AAMPSA	Acrylamido 2-methyl propan sulfonic acid	Chất keo tụ AAMPSA
ALA	Alpha-linolenic acid	Alpha-linolenic acid
ANOVA	Analysis of Variance	Phân tích phương sai
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	Hiệp hội các nhà hóa phân tích chính thống
ARA	Arachidonic acid	Arachidonic acid
EPA	Eicosapentaenoic acid	Eicosapentaenoic acid
EtOH	Ethanol	Etanol
CD	Circular Dichroism	Lưỡng sắc tròn
COD	Chemical oxygen demand	Nhu cầu oxy hóa học
CT	Chitin	Chitin
CTAB	Cetyltrimethylamoni bromua	Chất hoạt động bề mặt (muối amoni bậc 4), chất keo tụ CTAB
CTS	Chitosan	Chitosan
CTSs	Chitosan lactate salts	Muối chitosan lactate
DADMAC	Diallyl dimethyl ammonium chloride	Chất keo tụ DADMAC (muối amoni bậc 4)
DD	Degree of deacetyl	Độ deacetyl
DHA	Docosa hexaenoic acid	Docosahexaenoic acid
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Chất bảo quản DMSO (hợp chất hữu cơ lưu huỳnh)
DNA	Deoxyribonucleic acid	Phân tử mang thông tin di truyền
ĐBSCL		Đồng bằng sông Cửu Long
ĐC		Đối chứng
FFA	Free fatty acid	Acid béo tự do
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy	Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
HSTH		Hiệu suất thu hồi
HUFA	Highly unsaturated fatty acid	Acid béo mạch cao không bão hòa
M	MarkNature	Nguồn cung cấp từ công ty MarkNature
MUFA	Monounsaturated fatty acid	Acid béo không bão hòa đơn mạch
Mw	Molecular Weight	Khối lượng phân tử
MWCO	Molecular Weight Cut-Off	Khối lượng phân tử cắt
N		Nguồn vỏ lột xác
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân
OD	Optical Density	Mật độ quang học
PAC	Polyaluminum chloride	Chất keo tụ PAC (phèn nhôm)
PE	Polyethylens	Nhựa dẻo
PEI	Polyme polyethyleneimine	Chất keo tụ PEI
PGA	Poly-glutamic acid	Chất keo tụ PGA
PSSA	Polystyren sulfonic acid	Chất keo tụ PSSA
PUFA	Polyunsaturated fatty acid	Acid béo đa mạch không bão hòa
PVC	Polyvinyl Chlorua	Nhựa nhiệt dẻo PVC
SEC-MALLS	Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle Laser Light Scattering	Phổ sắc ký kết hợp phân tán ánh sáng tĩnh đa góc
SEM	Scanning Electron microscope	Kính hiển vi điện tử quét
SFA	Saturated fatty acid	Acid béo bão hòa
TBARS	Thiobarbituric acid	Acid béo thiobarbituric
TSS	Total Suspended Solids	Tổng chất rắn lơ lửng
TVB-N	Total volatile basic nitrogen	Tổng lượng nitơ bazơ bay hơi
USD	United States dollar	Đồng Đô la
UV	Ultraviolet	Tia cực tím
UV-VIS	Ultraviolet - Visible	Tia cực tím – Khả kiến
V		Nguồn cung cấp từ công ty Việt Nam Food

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
VLX		Vỏ lột xác
VNF		Công ty cổ phần Việt Nam Food
XRD	X-Ray Diffraction	Nhiều xạ tia X

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Diện tích nuôi tôm và sản lượng thu hoạch thuộc Đồng bằng sông Cửu Long trong giai đoạn 2020 - 2022	5
Bảng 1.2. Mô tả đặc điểm cơ bản của vỏ lột xác và vỏ tôm thẻ chân trắng từ quá trình chế biến.....	10
Bảng 1.3. Phương pháp điều chế một số muối chitosan	25
Bảng 3.1. Sản lượng và đặc điểm vỏ tôm lột xác của tôm thẻ chân trắng theo độ tuổi tôm thu tại trại Thực nghiệm Chính Mỹ, Ninh Phú, Khánh Hòa	71
Bảng 3.2. Tiềm năng thu hồi vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa trong giai đoạn 2021 - 2025	72
Bảng 3.3. Ước tính sản lượng vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng thuộc Đồng bằng sông Cửu Long trong giai đoạn 2020 - 2022	73
Bảng 3.4. Thành phần hóa học của vỏ tôm lột xác tôm thẻ chân trắng theo độ tuổi ở ao nuôi thâm canh tại Ninh Phú	75
Bảng 3.5. Độ tinh sạch của chitin thu hồi từ vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng theo độ tuổi	76
Bảng 3.6. Thành phần cơ bản của vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng và của vỏ tôm thải ra từ quá trình chế biến thủy sản.....	79
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian deacetyl đến hiệu suất thu hồi chitosan, độ tan và hàm lượng khoáng, protein còn lại	90
Bảng 3.8. Thành phần và tính chất cơ bản của chitin, chitosan được sản xuất từ vỏ tôm lột xác	92
Bảng 3.9. Thành phần amino acid còn lại trong chitosan	93
Bảng 3.10. Thành phần khoáng còn lại và kim loại nặng trong chitosan	93
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của tỷ lệ EtOH trong dung môi ethanol/nước đến độ trương nở của chitosan, trạng thái, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate	98
Bảng 3.12. Ảnh hưởng của thời gian ngâm chitosan đến độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate	100
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của nồng độ acid phản ứng đến độ hòa tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate	102
Bảng 3.14. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến độ hòa tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate	102
Bảng 3.15. Tính chất cơ bản của chitosan từ các nguồn khác nhau.....	104

Bảng 3.16. Tính chất cơ bản của chitosan lactate từ các nguồn khác nhau	105
Bảng 3.17. Tính chất và thành phần dinh dưỡng của vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp.	111
Bảng 3.18. So sánh hiệu quả thu hồi sinh khối vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp. bằng các loại chitosan lactate khác nhau kết hợp điều chỉnh pH 10,0 sau 15 phút lắng	121
Bảng 3.19. Khả năng sinh trưởng của sinh khối vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp. sau thu hoạch	125

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Tình hình nuôi thâm canh tôm thẻ chân trắng ở Đồng bằng sông Cửu Long năm 2020.....	4
Hình 1.2. Hệ thống phân riêng vỏ lột xác của tôm và nước thải nuôi đưa vào ao lắng. .6	
Hình 1.3. Chu kỳ lột xác của tôm thẻ chân trắng	7
Hình 1.4. Cấu trúc vỏ giáp ở giai đoạn lột xác và giai đoạn tiền lột xác.	8
Hình 1.5. Công thức cấu tạo của chitin, chitosan.....	11
Hình 1.6. Công thức cấu tạo của muối chitosan.....	11
Hình 1.7. Phản ứng tạo muối chitosan lactate.	12
Hình 1.8. Tế bào vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp.	29
Hình 1.9. Quá trình kết bông vi tảo và cơ chế keo tụ polyme	38
Hình 2.1. Vỏ lột xác khô của tôm thẻ chân trắng.....	41
Hình 2.2. Hình ảnh biểu diễn quá trình thu nhận và xử lý mẫu vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng..	41
Hình 2.3. Tế bào vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp. và dịch vi tảo.	42
Hình 2.4. Sơ đồ bố trí thí nghiệm tổng quát.	43
Hình 2.5. Sơ đồ khảo sát khả năng thu hồi vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng trong ao nuôi thâm canh theo độ tuổi.	46
Hình 2.6. Sơ đồ khảo sát thành phần hóa học và thử nghiệm sản xuất chitin.....	47
Hình 2.7. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của điều kiện khử khoáng đến hàm lượng khoáng còn lại và hiệu suất thu hồi chitin thô từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng.	49
Hình 2.8. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của điều kiện khử protein đến hàm lượng protein còn lại và hiệu suất thu hồi của chitin.....	51
Hình 2.9. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của điều kiện deacetyl đến hiệu suất thu hồi và tính chất cơ bản của chitosan.	53
Hình 2.10. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi đến độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate.	55
Hình 2.11. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của thời gian ngâm hỗn hợp dung môi EtOH/H ₂ O đến độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate.....	56

Hình 2.12. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nồng độ lactic acid đến độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate.	57
Hình 2.13. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của thời gian phản ứng tạo muối đến độ tan và hiệu suất thu hồi tương đối của chitosan lactate.	59
Hình 2.14. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate đến hiệu suất lắng vi tảo theo thời gian thu hoạch.	62
Hình 2.15. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của phương pháp kết hợp sử dụng chitosan lactate và điều chỉnh pH đến hiệu suất lắng vi tảo theo thời gian thu hoạch.	64
Hình 2.16. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của phương pháp thu sinh khối vi tảo đến hiệu suất thu hồi chlorophyll-a, carotenoids và khả năng sinh trưởng của sinh khối sau thu hoạch.	65
Hình 2.17. Phương pháp xác định chiều cao cột lắng để lấy mẫu	69
Hình 3.1. Ao nuôi thâm canh thuộc xã Ninh Hòa, Khánh Hòa.....	70
Hình 3.2. Ảnh chụp các mẫu vỏ đầu tôm lột xác khô theo độ tuổi nuôi.	71
Hình 3.3. Mẫu nguyên liệu vỏ tôm lột xác và sản phẩm chitin theo độ tuổi nuôi.	77
Hình 3.4. Mẫu nguyên liệu vỏ tôm lột xác và sản phẩm chitin thu được khi thu mẫu vào buổi sáng có phơi nắng và buổi chiều không phơi nắng.....	77
Hình 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ và nồng độ HCl đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô.	80
Hình 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ HCl và thời gian đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô.	82
Hình 3.7. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH và nhiệt độ đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng protein còn lại trong chitin tinh sạch	84
Hình 3.8. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH và thời gian đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng protein còn lại trong chitin tinh sạch.....	87
Hình 3.9. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian xử lý đến độ deacetyl và độ nhớt của chitosan.	89
Hình 3.10. Quy trình sản xuất chitin, chitosan từ vỏ lột xác của tôm.	91
Hình 3.11. Sản phẩm chitin, chitosan từ vỏ tôm lột xác.	92
Hình 3.12. Hình ảnh SEM của vỏ lột xác ở độ phóng đại khác nhau, chitin và chitosan được tách chiết từ vỏ lột xác.....	94

Hình 3.13. Phổ FTIR của chitin, chitosan tách chiết từ vỏ lột xác của tôm và chitosan tách chiết từ vỏ tôm chế biến.	95
Hình 3.14. Phổ ^1H NMR của chitosan tách chiết từ vỏ lột xác.	95
Hình 3.15. Phổ XRD của vỏ lột xác, chitin, chitosan tách chiết từ vỏ lột xác và chitosan (d) tách chiết từ vỏ tôm chế biến.	96
Hình 3.16. Chitosan ngâm trương nở trong EtOH/H ₂ O ở các tỷ lệ dung môi khác nhau, chitosan sau trương nở phản ứng với lactic acid và chitosan lactate thu được.	99
Hình 3.17. Chitosan ban đầu và trương nở trong dung môi EtOH/H ₂ O 70% trong 4 giờ, chitosan ban đầu và chitosan ngâm dung môi dưới kính hiển vi.	101
Hình 3.18. Quy trình điều chế chitosan lactate từ chitosan của vỏ lột xác tôm.	103
Hình 3.19. Sản phẩm chitosan lactate từ vỏ lột xác, từ chitosan VNF và chitosan lactate của MarkNature.	106
Hình 3.20. Phổ FTIR của chitosan và chitosan lactate từ vỏ tôm lột và vỏ tôm chế biến công ty Vietnam Food, chitosan lactate thương mại từ công ty MarkNature.	107
Hình 3.21. Phổ XRD của chitosan và chitosan lactate từ vỏ tôm lột và vỏ tôm chế biến công ty Vietnam Food, chitosan lactate thương mại từ công ty MarkNature.	108
Hình 3.22. Phổ ^1H -NMR của chitosan lactate thương mại từ công ty MarkNature....	109
Hình 3.23. Phổ ^1H -NMR của chitosan lactate sử dụng chitosan của công ty Vietnam Food thu được từ vỏ tôm chế biến.	110
Hình 3.24. Phổ ^1H -NMR của chitosan lactate được điều chế từ chitosan thu nhận từ vỏ tôm lột.	110
Hình 3.25. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate đến hiệu suất lắng theo thời gian thu hoạch, tại thời điểm 15 phút lắng.	114
Hình 3.26. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate và pH môi trường đến hiệu suất lắng và hình ảnh vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp. thu bằng CTSs 250 ppm kết hợp điều chỉnh độ pH khác nhau, tại thời điểm sau 120 phút lắng.	118
Hình 3.27. Ảnh hưởng của phương pháp kết hợp chitosan lactate và điều chỉnh pH đến hiệu suất lắng theo thời gian thu hoạch.	120
Hình 3.28. Hình thái tế bào vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp. dưới kính hiển vi quang học trước khi keo tụ và sau khi keo tụ bằng chitosan lactate (250 ppm) kết hợp điều chỉnh pH 10.	121
Hình 3.29. Hình ảnh sinh khối vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp. thu bằng các loại chitosan lactate khác nhau và có kết hợp điều chỉnh pH 10, tại thời điểm sau 15 phút lắng. ...	122

Hình 3.30. Ảnh hưởng của phương pháp thu hoạch vi tảo đến hiệu suất lắng, hiệu suất thu hồi của chất màu và sinh khối vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp. .	123
Hình 3.31. Ảnh hưởng của phương pháp thu hoạch đến hình thái của sinh khối vi tảo <i>Nannochloropsis</i> sp.	124
Hình 3.32. Hình ảnh khả năng sinh trưởng của vi tảo sau thu hoạch bằng các phương pháp khác nhau sau 1 ngày và 6 ngày nuôi.	125

TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Tên luận án: Nghiên cứu thu nhận chitosan lactate từ vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) và ứng dụng thu hồi vi tảo *Nannochloropsis* sp.

Ngành: Công nghệ chế biến thủy sản. **Mã số:** 9540105. **Khóa:** 2018 – 2022

Nghiên cứu sinh: Phạm Thị Đan Phượng

Người hướng dẫn: 1. PGS.TS. Nguyễn Văn Hòa

2. PGS.TS. Huỳnh Nguyễn Duy Bảo

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Nha Trang

Những đóng góp mới của luận án:

1. Luận án đã xây dựng được quy trình sản xuất chitin/chitosan từ nguồn nguyên liệu là vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng thải ra trong quá trình nuôi tôm thâm canh. Sản phẩm chitin/chitosan thu được đạt chất lượng thương mại (hàm lượng khoáng và protein còn lại dưới 1%). Nồng độ hóa chất sử dụng trong quá trình khử khoáng và protein thấp (3 – 4%), thời gian xử lý ngắn (3 – 6 giờ/quá trình khử). Hiệu suất thu hồi chitosan cao (khoảng 23%), độ deacetyl cao (khoảng 90%), độ tan cao (khoảng 99%) và khối lượng phân tử đạt khoảng 500 kDa.
2. Luận án đã xây dựng được quy trình điều chế chitosan lactate từ chitosan thu nhận từ vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng. Sản phẩm chitosan lactate tạo ra có độ tan trong nước tốt (> 99%).
3. Luận án đã xác định được điều kiện phù hợp khi sử dụng chitosan lactate để thu hồi sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. Hiệu quả thu sinh khối vi tảo bằng phương pháp kết hợp sử dụng chitosan lactate (250 ppm) và điều chỉnh môi trường dịch vi tảo về pH 10,0 đạt khoảng 90% (sau 2 giờ lắng).

Giáo viên hướng dẫn

Nghiên cứu sinh

PGS.TS. Nguyễn Văn Hòa

Phạm Thị Đan Phượng

PGS.TS. Huỳnh Nguyễn Duy Bảo

PHẦN MỞ ĐẦU

Thủy sản là một trong những ngành kinh tế mũi nhọn của Việt Nam đem lại nguồn thu ngoại tệ lớn cho đất nước. Năm 2022, kim ngạch xuất khẩu thủy sản đạt 11 tỷ USD, trong đó, tôm là đối tượng có giá trị xuất khẩu cao nhất đạt 4,1 - 4,2 tỷ USD. Hiện nay, mô hình nuôi tôm thâm canh được triển khai và đem lại hiệu quả kinh tế cao ở nhiều địa phương trong cả nước. Việc kiểm soát tốt điều kiện môi trường của mô hình nuôi này giúp giảm nguy cơ dịch bệnh cho tôm. Tuy nhiên, do mật độ tôm cao nên một lượng lớn chất thải trong quá trình nuôi bao gồm thức ăn thừa, phân, chất lơ lửng, vỏ lột xác của tôm... có khả năng gây ô nhiễm cho môi trường nước, phát sinh dịch bệnh cho tôm. Trong đó, lượng lớn vỏ lột xác của tôm có thể thu được bằng cách xi phông mỗi ngày. Tận dụng nguồn vỏ lột xác này làm nguyên liệu sản xuất chitin, chitosan không chỉ gia tăng giá trị cho tôm nuôi, mà còn giảm thiểu ô nhiễm môi trường nuôi, nâng cao giá trị cho chuỗi nuôi trồng, chế biến và xuất khẩu tôm, góp phần phát triển bền vững ngành thủy sản.

Mặt khác, trong thời gian gần đây nhu cầu sử dụng các sản phẩm vi tảo làm thức ăn nuôi thủy sản đang phát triển mạnh mẽ. Vi tảo là nguồn dinh dưỡng thiết yếu cho các nhuyễn thể hai mảnh vỏ, các loài cá và giáp xác ở giai đoạn ấu trùng... Trong đó, vi tảo *Nannochloropsis* sp. đang được sử dụng phổ biến làm thức ăn cho các ấu trùng thủy sản vì nó có kích thước nhỏ, chứa nhiều hoạt chất sinh học, hàm lượng dinh dưỡng cao. Tuy nhiên, vấn đề khó khăn hiện nay cần giải quyết đó tìm ra phương pháp thu vi tảo *Nannochloropsis* sp. hiệu quả với chi phí thấp, giữ được chất lượng sản phẩm sau thu nhận, phù hợp làm thức ăn thủy sản.

Chitosan là polyme sinh học đã được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như nông nghiệp, môi trường, thực phẩm, mỹ phẩm, y dược... Tuy nhiên, vẫn còn hạn chế khi sử dụng do chitosan không tan trong nước mà chỉ tan trong một số dung dịch acid loãng. Để tăng độ tan trong nước, chitosan được chuyển hóa thành các dạng như oligochitosan, muối chitosan, nanochitosan, gắn các nhóm chức ưa nước... Trong đó, chitosan lactate là sản phẩm muối hữu cơ của chitosan và lactic acid, có thể tan tốt trong nước, không độc hại và không mùi. Ngoài ra, chitosan lactate vẫn giữ được tính chất tạo màng bao và khi hòa tan trong nước nó mang điện tích dương. Do đó, khi ứng dụng chitosan lactate

để thu hồi vi tảo biển (mang điện tích âm) có thể đạt hiệu quả cao (theo cơ chế trung hòa điện), dễ dàng triển khai, sản phẩm thu được an toàn.

Từ những lý do trên, đề tài: “**Nghiên cứu thu nhận chitosan lactate từ vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) và ứng dụng thu nhận vi tảo *Nannochloropsis* sp.**” được đề xuất thực hiện.

Mục tiêu nghiên cứu:

1. Tận dụng nguồn nguyên liệu vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng trong quá trình nuôi thâm canh để thu nhận chitin và chitosan có độ tinh sạch cao.
2. Xây dựng được quy trình điều chế chitosan lactate có độ tan tốt trong nước từ chitosan thu được ở trên.
3. Xác định được điều kiện phù hợp khi sử dụng chitosan lactate để thu sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp.

Nội dung nghiên cứu:

Để đạt được 3 mục tiêu nghiên cứu, luận án tập trung nghiên cứu 3 nội dung:

1. Nghiên cứu quy trình sản xuất chitin, chitosan có độ tinh sạch cao từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng.
2. Nghiên cứu quy trình điều chế chitosan lactate có độ tan tốt từ sản phẩm chitosan thu nhận được ở trên.
3. Nghiên cứu ứng dụng chitosan lactate để thu nhận sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án:

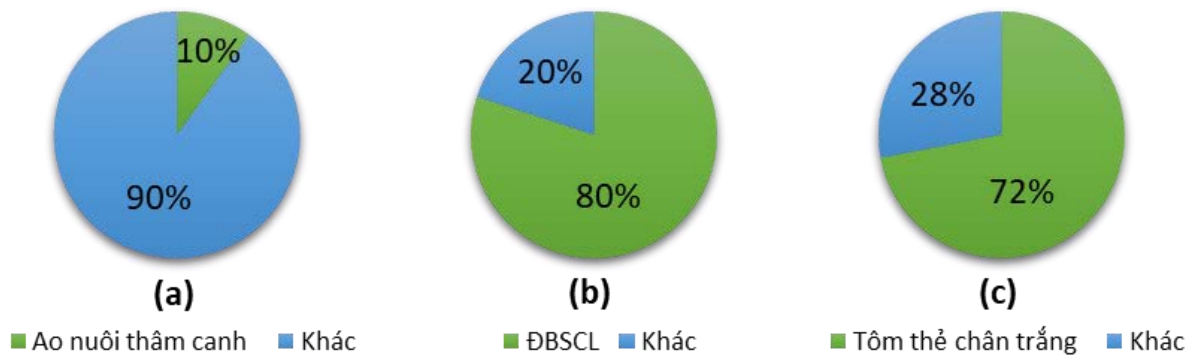
1. Lần đầu tiên, nguyên liệu vỏ lột xác của tôm trong quá trình nuôi thâm canh được đánh giá về khả năng thu hồi, thành phần hóa học, tính chất và sử dụng để sản xuất chitin, chitosan.
2. Đề xuất quy trình sản xuất chitin, chitosan có độ tinh sạch cao với lượng hóa chất sử dụng thấp, thời gian xử lý ngắn, không cần qua công đoạn khử màu.
3. Đề xuất quy trình điều chế muối chitosan lactate tan tốt trong nước (độ tan > 99%) bằng phương pháp rắn – lỏng, có thể áp dụng ở quy mô lớn một cách dễ dàng.
4. Đề xuất điều kiện thu hồi vi tảo biển *Nannochloropsis* sp. đạt hiệu quả cao (khoảng 90% sau 2 giờ để lắng) khi sử dụng chitosan lactate có kết hợp điều chỉnh pH môi trường.

5. Kết quả đề tài mở ra định hướng tận dụng vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng tạo các sản phẩm có giá trị gia tăng (chitin, chitosan, chitosan lactate), giảm ảnh hưởng xấu đến môi trường trong quá trình nuôi tôm thâm canh.

6. Việc sử dụng sản phẩm từ quá trình nuôi thủy sản (chitosan lactate) để thu vi tảo và ứng dụng làm thức ăn thủy sản hướng đến nền kinh tế tuần hoàn và phát triển bền vững cho ngành nuôi trồng thủy sản.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tình hình nuôi tôm và ô nhiễm môi trường do chất thải trong quá trình nuôi



Hình 1.1. Tình hình nuôi thâm canh tôm thẻ chân trắng ở Đồng bằng sông Cửu Long năm 2020.

Việt Nam là một trong những nước nuôi và xuất khẩu tôm hàng đầu thế giới, tập trung chủ yếu ở các vùng Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) bao gồm các tỉnh: Long An, Tiền Giang, An Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Hậu Giang, Trà Vinh, Bến Tre, Sóc Trăng, Bạc Liêu, Cà Mau, Kiên Giang và thành phố Cần Thơ. Theo Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam (1995 – 2020) thì ĐBSCL là khu vực chiếm 80% tổng sản lượng tôm thu hoạch từ các ao nuôi thâm canh và siêu thâm canh so với cả nước (Hình 1.1b), tập trung chủ yếu ở 5 tỉnh có diện tích nuôi lớn nhất (Cà Mau, Bạc Liêu, Sóc Trăng, Bến Tre và Kiên Giang), nhưng chiếm chưa đến 10% diện tích đất dành cho nuôi tôm (Hình 1.1a) [148]. Đây là mô hình nuôi được đánh giá cao và khuyến khích các cơ sở sản xuất tôm nuôi áp dụng nhờ ưu điểm vượt trội là thời gian nuôi ngắn, rủi ro thấp, năng suất cao và có thể giảm thiểu ô nhiễm môi trường nuôi, hạn chế dịch bệnh [4]. Hiện nay, tỉnh Bạc Liêu được Thủ tướng Chính phủ chọn làm thủ phủ cho ngành tôm công nghiệp của cả nước [4, 5, 13]. Hình thức nuôi tôm thương phẩm hiệu quả cao đã được đưa vào “Đề án tổng thể phát triển ngành công nghiệp tôm nước lợ Việt Nam đến năm 2030” với mục tiêu cụ thể, tổng sản lượng tôm nuôi nước lợ đạt trên 1.300.000 tấn, trong đó tôm thẻ chân trắng đạt trên 750.000 tấn và tôm sú đạt trên 550.000 tấn. Tương ứng với diện tích nuôi tôm nước lợ giữ ổn định so với sự phát triển của các năm gần đây (2020 – 2022) khoảng 750.000 ha, trong đó diện tích nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) là 150.000 ha, chiếm chỉ bằng $\frac{1}{4}$ so với diện tích nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*) là 600.000 ha (Bảng 1.1). Diện tích nuôi tôm thẻ được đầu tư và phát triển theo xu hướng áp dụng công nghệ cao ở nhiều tỉnh trong nước từ năm 2008 [4, 5]. Việc áp dụng kỹ thuật nuôi công nghệ cao với mật độ nuôi lớn và đạt hiệu quả thu hoạch sản lượng tôm thẻ chân trắng cao đến 72% trên tổng giá trị xuất khẩu tôm năm 2020 (Hình 1.1c) [4, 5].

Bảng 1.1. Diện tích nuôi tôm và sản lượng thu hoạch thuộc Đồng bằng sông Cửu Long trong giai đoạn 2020 - 2022

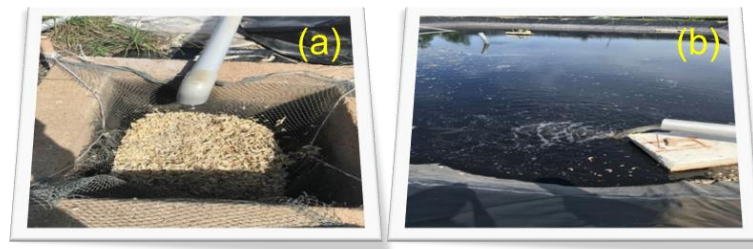
Loại tôm nuôi	Diện tích (ha) [2]	Sản lượng thu hoạch (tấn/năm)		
		2020 [5]	2021 [15]	2022 [16]
Tôm nuôi nước lợ	750.000	900.000	931.000	950.000
Tôm thẻ chân trắng	150.000	632.300	666.000	675.000
Tôm sú	600.000	267.700	265.000	275.000

Số liệu ở Bảng 1.1 cho thấy diện tích nuôi tôm thẻ chân trắng chỉ bằng ¼ diện tích nuôi tôm sú, nhưng sản lượng tôm thẻ chân trắng cao khoảng 2,5 lần so với tôm sú. Năm 2020, tổng diện tích nuôi trồng thủy sản gần như không thay đổi so với năm 2019, tuy nhiên, sản lượng tôm nuôi nước lợ lại tăng lên đạt 900.000 tấn (trong đó tôm thẻ chân trắng đạt 632.300 tấn, tôm sú đạt 267.700 tấn) [6]. Năm 2021, mặc dù ngành nuôi trồng thủy sản gặp nhiều khó khăn do đại dịch Covid-19 nhưng vẫn đảm bảo duy trì tốc độ tăng trưởng. Riêng diện tích nuôi tôm nước lợ ước đạt 737 nghìn ha, trong đó diện tích nuôi tôm sú là 622 nghìn ha và diện tích nuôi tôm thẻ chân trắng là 115 nghìn ha. Sản lượng tôm nuôi năm 2021 đạt 931.000 tấn (tăng 5,5% so với cùng kỳ năm 2020), trong đó sản lượng tôm sú đạt 265.000 tấn và tôm thẻ chân trắng đạt 666.000 tấn [15]. Năm 2022, ngành Thủy sản phấn đấu sản lượng nuôi trồng ước đạt 4,95 triệu tấn, trong đó mục tiêu đưa ra sản lượng tôm sú đạt khoảng 275.000 tấn và tôm thẻ chân trắng khoảng 675.000 tấn [16]. Năm 2022, các tỉnh tiếp tục phát triển tôm thẻ chân trắng thâm canh, bán thâm canh công nghệ cao nhằm kiểm soát môi trường ngày càng tốt hơn. Nhờ đó mà sản lượng tôm thẻ chân trắng ước tính đến tháng 2/2022 đạt 25.500 tấn (tăng 6,3% so với cùng kỳ năm trước), sản lượng tôm sú đạt 14.200 tấn tương đương cùng kỳ năm 2021 [17].

Tuy nhiên, vấn đề đáng lo ngại hiện nay vẫn là sự ô nhiễm môi trường trong quá trình nuôi tôm do các hợp chất hữu cơ dư thừa do thức ăn, phân và rác thải khác (vỏ lột xác của tôm, cỏ rác từ môi trường xung quanh...) đọng lại dưới ao nuôi. Các chất thải này không xử lý sẽ hình thành một lớp bùn đáy tạo điều kiện môi trường sinh trưởng và phát triển vi sinh vật gây thối như Coliforms, *Vibrio*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Salmonella*... Từ đó, ao nuôi có khả năng ứ đọng ô nhiễm hữu cơ, các loại khí độc như phốt pho, nitơ, amoniac (NH₃), nitrit (NO₂), H₂, H₂S, CH₄, Mecaptan... làm giảm lượng oxy và thủy sản có khả năng bị ngộ độc. Ngoài ra còn lắng đọng các hóa chất, vôi và khoáng chất Diatomit, Dolomit, lưu huỳnh và các chất độc có trong đất phèn Fe³⁺, Al³⁺, SO₄²⁻... [7, 14, 75]. Chính vì thế mà người nuôi trồng thường phải sử dụng hóa chất xử lý môi trường nước, kháng sinh để phòng trị bệnh cho tôm. Đến nay, nhiều cơ sở nuôi tôm và hộ dân đã tiếp cận phương pháp nuôi thâm canh nhưng vẫn theo hình thức tự phát nên không đưa vào hệ thống ao lắng

để xử lý. Do vậy, nhiều nơi đã bị ô nhiễm môi trường xung quanh từ nuôi trồng thủy sản do việc xả tràn lan ra các dòng sông dẫn đến nguy cơ bùng phát dịch bệnh và gây ô nhiễm nguồn nước sinh hoạt.

Trước tình hình này, việc áp dụng kỹ thuật nuôi thâm canh và siêu thâm canh giúp cho người nuôi có thể kiểm soát được môi trường ao nuôi, có thể rút xi phông để thải loại cặn bã ở đáy ao thông qua hệ thống xử lý nước thải và bảo vệ môi trường. Hệ thống xi phông bằng van được lắp đặt ngầm ở giữa ao lót bạt nuôi tôm thương phẩm, có cấu trúc hình tròn (đường kính khoảng 80 – 200 cm đối với ao có diện tích khoảng 800 – 2000 m², độ sâu lòng khoảng 50 – 55 cm), làm từ vật liệu composite tráng men và được nối với ống co khoảng 90 – 168 cm. Giữa hố xi phông có ghép nối với 1 ống hút nhựa PVC có bịt lưới đầu ống để có thể đảm bảo hút được chất thải rắn và bùn nhưng ngăn được tôm lọt qua. Hoạt động của hố xi phông khi mở van, các chất thải từ ao sẽ tự động chảy ra hố phân loại (Hình 1.2a) nhờ áp lực nước mà không cần dùng bơm. Các ống thoát được nối vào ống co và lắp xuyên qua ao, dẫn đường ống thoát đến các hố phân loại với nguyên tắc ống hút và thoát nước đáy của hố xi phông đặt cao hơn ống thoát ra. Từ đó chúng ta có thể phân loại vỏ lột xác của tôm (Hình 1.2a) và nước thải nuôi để đưa ra ao lắng (Hình 1.2b) qua hệ thống xử lý môi trường. Vấn đề này đã được một số công ty quan tâm đến việc thu hồi vỏ lột xác trong quá trình nuôi thâm canh để làm nguyên liệu sản xuất chitin, chitosan chất lượng cao như công ty cổ phần thủy sản Việt Úc, công ty cổ phần tập đoàn thủy hải sản Minh Phú, công ty cổ phần Việt Nam Food (VNF)... Điều này còn giúp cho hệ thống xử lý chất thải trong ao nuôi hoàn thiện hơn, có thể phân loại chất thải rắn, chất thải hữu cơ và nước thải nhằm đưa ra biện pháp bảo vệ môi trường nuôi bền vững, hạn chế dịch bệnh gây chết tôm.



Hình 1.2. Hệ thống phân riêng vỏ lột xác của tôm (a) và nước thải nuôi đưa vào ao lắng (b).

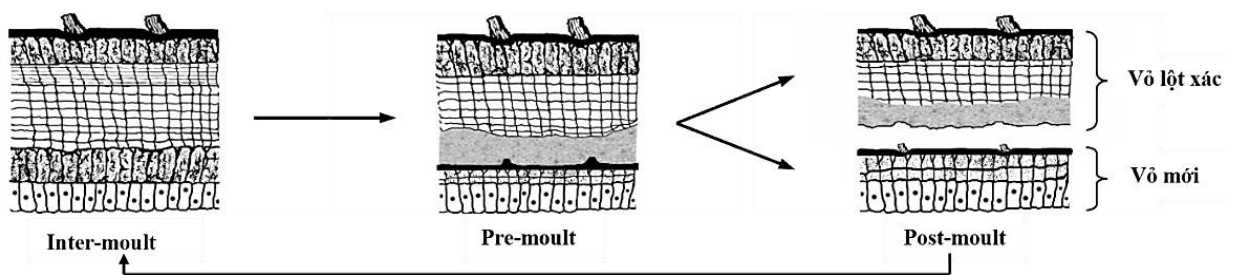
Qua khảo sát sơ bộ ở các ao nuôi thâm canh, chất thải rắn được phân loại (Hình 1.2a) sẽ thu được thành phần chính là vỏ lột xác của tôm và một lượng bùn phân, tảo chết bám vào vỏ lột xác nhưng không đáng kể. Tuy nhiên, thỉnh thoảng xuất hiện hiện tượng có xác tôm chết, thời điểm cao nhất chiếm khoảng 2 – 3% lượng vỏ lột thu được, trường hợp này cần được phân loại tôm chết để xử lý làm phân bón. Như vậy, việc áp dụng mô hình nuôi thâm canh nhằm giảm thiểu ô nhiễm môi trường nuôi, hạn chế dịch bệnh [4], đồng thời có thể thu hồi một lượng lớn vỏ lột xác của tôm trong quá trình nuôi.

1.2. Quá trình lột xác của tôm thẻ chân trắng

1.2.1. Chu kỳ lột xác của tôm thẻ chân trắng

Chu kỳ lột xác của tôm thẻ chân trắng diễn ra tương tự như của tôm sú, tuy nhiên các giai đoạn lột xác của tôm thẻ nhanh hơn tôm sú đáng kể. Đồng thời, thời gian của một chu kỳ phụ thuộc rất nhiều yếu tố như môi trường nước, dinh dưỡng, điều kiện của ao nuôi... Trong điều kiện ở phòng thí nghiệm (27°C), tổng chu kỳ lột xác của tôm thẻ chân trắng được xác định khoảng 5 ngày (tôm 2g), 11 ngày (tôm 15g) và phân biệt nhờ phương pháp phân tích sự thay đổi của lớp biểu bì (vỏ lột xác) bằng kính hiển vi. Trong trường hợp nuôi tôm ở ao nuôi thâm canh thì tốc độ sinh trưởng của tôm cao hơn và tùy vào các điều kiện khác [69]. Thông thường, chu kỳ lột xác của giáp xác (Hình 1.3) được chia làm 3 giai đoạn chính: (1) post-molt, (2) inter-molt, (3) premolt và thời điểm rụng lớp biểu bì cũ. Hầu hết các nhà nghiên cứu sử dụng mã chữ cái để mô tả các giai đoạn biến đổi cấu trúc của lớp vỏ giáp xác, nhưng có thể xác định 5 giai đoạn chính trong một chu kỳ lột xác [69]:

- Post-molt: giai đoạn lột xác (gồm 2 giai đoạn đầu (A) và cuối (B)).
- Inter-molt: giữa các giai đoạn lột xác (C).
- Pre-molt: giai đoạn tiền lột xác (gồm 2 giai đoạn đầu (D1) và cuối (D2)).



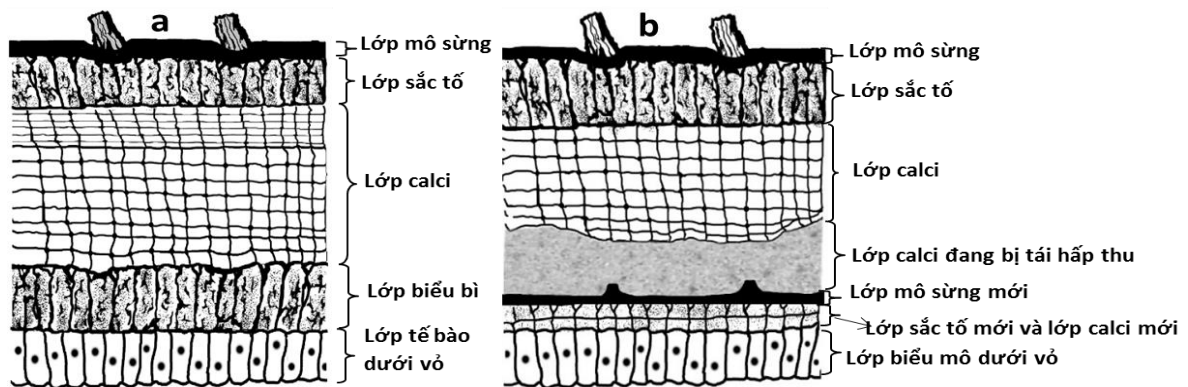
Hình 1.3. Chu kỳ lột xác của tôm thẻ chân trắng (*L. vannamei*) [88, 162].

Thời gian tương đối của các giai đoạn lột xác trong chu kỳ là 5 – 10% (giai đoạn A), 9 – 16% (giai đoạn B), 12 – 20% (giai đoạn C), 28 – 36% (giai đoạn D1) và 30 – 38% (giai đoạn D2) [69]. Nghiên cứu của Gao và cộng sự [88] mô tả rất kỹ bộ phiên mã của toàn bộ quá trình phát triển của tôm, cơ chế hình thành phân tử, phát triển và tái tạo của lớp vỏ lột xác của tôm (bộ xương ngoài), bao gồm 9 giai đoạn phát triển ban đầu và 8 giai đoạn thay vỏ để trưởng thành. Kết quả cho thấy biểu hiện tuần tự của các gen được hình thành, điều hòa, tổng hợp, thoái hóa, hấp thu/tái hấp thu khoáng chất, vôi hóa và cứng lại. Trong đó, chitin (polyme của N-acetyl- β -D-glucosamine) là thành phần chính của bộ xương ngoài của tôm, được xem là một vật liệu khung cho lớp vỏ. Quá trình lột xác còn phụ thuộc nhiều vào khả năng tổng hợp chitin của bộ xương mới, cho thấy tăng biểu hiện ở mức cao nhất ở cuối của giai đoạn tiền lột xác và lột xác (pre-molt và post-molt). Ngược lại, hiện tượng hấp thu/tái hấp thu khoáng chất và quá trình làm cứng bộ xương ngoài (khoáng hóa) của tôm,

điển hình là calci carbonate. Sự khoáng hóa làm cứng lớp vỏ để có thể lột xác được giải thích do sự hấp thu chất khoáng từ nước biển hoặc tái hấp thu từ tôm. Sự hấp thu/tái hấp thu khoáng chất của bộ xương ngoài (lớp vỏ cũ) xảy ra chủ yếu ở giai đoạn tiền lột xác, làm cho lớp vỏ bị thoái hóa và đây là thời điểm chuẩn bị tách vỏ. Đồng thời, protein liên kết với chitin (protein biểu bì) cũng đã bị vôi hóa để hỗ trợ độ cứng của bộ xương ngoài [88].

1.2.2. Cấu trúc của đầu vỏ tôm ở các chu kỳ lột xác

Vỏ giáp xác được xem như là một bộ xương ngoài đỉnh cơ (hay còn gọi là lớp biểu bì), đây là màng bọc vững chắc giúp bảo vệ cơ thể cho các loài giáp xác. Để tôm có thể sinh trưởng và phát triển, lớp vỏ này phải được lột bỏ định kỳ trong một quá trình tuần hoàn, được gọi là chu kỳ lột xác. Quá trình lột xác xảy ra nhờ sự chuyển đổi sinh lý của tôm qua các chức năng trao đổi chất và nội tiết xoay quanh đều các chu kỳ [69].



Hình 1.4. Cấu trúc vỏ giáp ở giai đoạn lột xác (a, Inter-molt) và giai đoạn tiền lột xác (b, Pre-molt) [88, 162].

Lớp vỏ ngoài của động vật giáp xác mười chân bao gồm lớp mô sừng, lớp bên trong và ngoại bì (chứa khoáng chất và các hợp chất hữu cơ), lớp màng lót liên kết lớp tế bào dưới vỏ. Cấu trúc của vỏ tôm được liên kết chặt chẽ giữa chitin và các thành phần khác gồm như protein, calci carbonate, lipid, chất màu, khoáng chất, các hợp chất hữu cơ khác. Do cấu trúc vỏ tôm cứng như vậy nên gây ngăn cản sự phát triển của tôm. Chính vì vậy, việc lột xác của vỏ tôm nhằm tạo điều kiện cho tôm tăng trưởng được diễn ra theo một chu kỳ. Điều này đòi hỏi sự chuyển động hai chiều của calci vào lớp biểu bì trong quá trình tái hấp thu ở các giai đoạn tiền lột xác và sau lột xác. Khi đó, các lớp biểu bì mới được hình thành nhưng không calci hóa cho đến khi lớp biểu bì cũ bị bong ra. Lớp vỏ của tôm sau khi lột xác đã bị vôi hóa ở 3 lớp bên ngoài, khoáng chất tồn tại dưới dạng tinh thể calci và calci cacbonat vô định hình và được bao quanh bởi chất nền lipid-protein. Trong lớp vỏ ngoài và trong biểu bì chứa tập hợp các tinh thể calci nằm xen kẽ với các sợi chitin-protein được hình thành các phiến mỏng [88, 162]. Lớp vỏ của giáp xác được chia nhỏ thành 4 miền chính (Hình 1.4a): lớp mô sừng ngoài, lớp sắc tố hóa, lớp calci và lớp biểu bì [57].

Lớp mô sừng (Epicuticle): Lớp mô sừng ngoài hay còn gọi là lớp vỏ ngoài gồm protein và lipid, protein được nối bởi các liên kết ngang, không tìm thấy chitin nhưng lớp này đôi khi được calci hóa. Lớp mô sừng ngoài có vai trò hạn chế tính thấm của vỏ.

Lớp sắc tố (Exocuticle, Pigmented layer): Bên dưới lớp mô sừng ngoài là lớp chitin được calci hóa và protein liên kết với miền phía ngoài của nó, gọi là lớp sắc tố (lớp vỏ giữa).

Lớp calci (Endocuticle, Calcirous layer): Lớp calci hay còn gọi lớp vỏ trong là lớp chitin không liên kết, bão hòa nhiều hay ít với các muối calcium nằm dưới sắc tố. Nó tạo thành phần dày nhất của bộ xương ngoài.

Lớp biểu bì (Epidermis, Membranous layer): Đây là màng chitin không liên kết, không calci hóa và nằm ngay trên các tế bào dưới vỏ. Lớp vỏ này phát triển các thành phần không ổn định, ở tại các đốt vỏ mỏng hơn chỗ khác vì mức độ calci hóa thấp và ít có bằng chứng của sự liên kết. Ngược lại, tại hầu hết ở nơi mà bộ xương ngoài của tôm vững chắc thì có sự calci hóa phổ biến và có các liên kết nhiều hơn.

Tuy nhiên, khi ở giai đoạn tiền lột xác thì cấu trúc vỏ tôm có sự chuyển hóa nhằm tăng khả năng lột xác vỏ cũ. Ở giai đoạn cuối của quá trình hình thành vỏ mới thì sự lột xác vỏ cũ sẽ diễn ra (Hình 1.4b), vỏ bao gồm 5 lớp chính [57]:

Lớp biểu bì: lớp này là thành phần sống duy nhất của vỏ và là mô có thể đáp ứng cho việc tiết các lớp còn lại.

Lớp màng (lớp không được calci hóa): một lớp mỏng (20 – 30 μm) có protein không được calci hóa, nằm trên lớp biểu bì.

Lớp calci (lớp mô sừng trong): là lớp chính của vỏ (chiếm khoảng 80% độ dày của vỏ), thành phần chủ yếu là chitin (70% vật chất hữu cơ nhưng hàm lượng protein rất ít) và thường được khoáng hóa (chiếm chủ yếu calci và một số muối khác).

Lớp sắc tố (lớp mô sừng giữa): chứa khoảng 40 – 45% chitin và phần còn lại là protein được tạo thành trước giai đoạn lột xác. Sau khi lột xác, lớp này được khoáng hóa và sắc hóa tạo nên một lớp sắc tố cho màu sắc đặc trưng của tôm.

Lớp mô sừng ngoài là một lớp mỏng gồm protein bão hòa lipid và không có chitin. Lớp này được hình thành bởi lớp biểu bì tiết ra các chất hoạt hóa, nó có chức năng bảo vệ bộ xương ngoài mới đang hình thành tránh được các chất dịch lột xác và có cũng có khả năng hạn chế tính thấm ở giai đoạn sau lột xác.

Vậy, vỏ lột xác từ quá trình phát triển của tôm có sự khác biệt đáng kể về đặc điểm vật lý, hóa học và sinh học so với vỏ tôm thu được trong quá trình chế biến tôm ở các nhà máy (Bảng 1.2).

Bảng 1.2. Mô tả đặc điểm cơ bản của vỏ lột xác và vỏ tôm thẻ chân trắng từ quá trình chế biến

Đặc điểm	Vỏ lột xác [57, 88, 162]	Vỏ tôm chế biến [21, 88]
Vật lý	Mềm và mỏng	Cứng và dày
Hóa học	Hàm lượng khoáng cao do quá trình tích khoáng trong vỏ trước khi lột vỏ và ở trạng thái vô định hình xen kẽ các lớp chitin, protein liên kết với chitin ở lớp biểu bì cũng bị vôi hóa (kể cả ở vỏ đầu và vỏ thân), chứa ít protein and astanxanthin.	Chitin liên kết chặt chẽ với protein, khoáng, chứa astaxanthin, hàm lượng protein cao trong lớp biểu bì, đặc biệt tập trung rất cao trong thành phần của đầu tôm (thịt và nội tạng)
Sinh học	Chứa enzyme chitinase	Chứa enzyme chitinase, nhanh chóng bị ôi thối do chứa hàm lượng protein cao

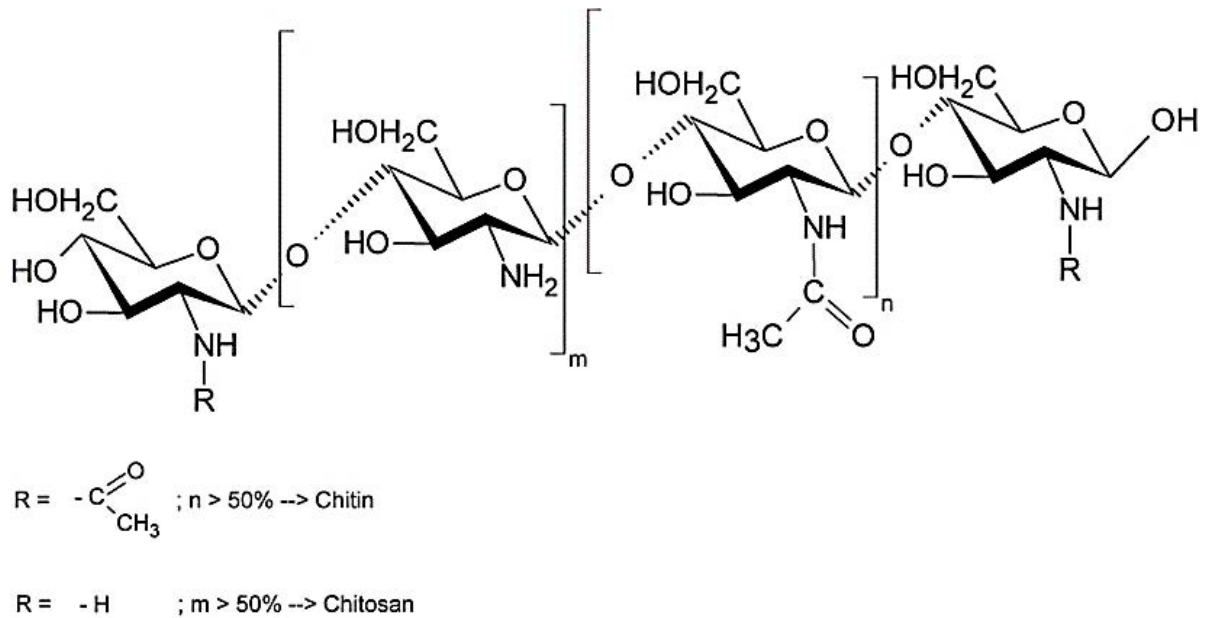
Qua phân tích tổng quan về tình hình và xu hướng phát triển nuôi tôm tại Việt Nam (đặc biệt tại ĐBSCL), đặc điểm lột xác của tôm, thành phần hóa học cơ bản và cấu trúc của vỏ tôm lột xác, nhận thấy rằng vỏ lột xác của tôm là nguồn tiềm năng có thể nghiên cứu dùng làm nguyên liệu sản xuất chitin, chitosan, nhằm giải quyết vấn đề thiếu hụt nguyên liệu cho sản xuất chitin, chitosan hiện nay, đồng thời góp phần giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường do chất thải rắn gây ra trong quá trình nuôi tôm công nghiệp đang phát triển mạnh tại Việt Nam.

1.3. Chitosan và muối chitosan

1.3.1. Cấu trúc của chitosan và muối chitosan

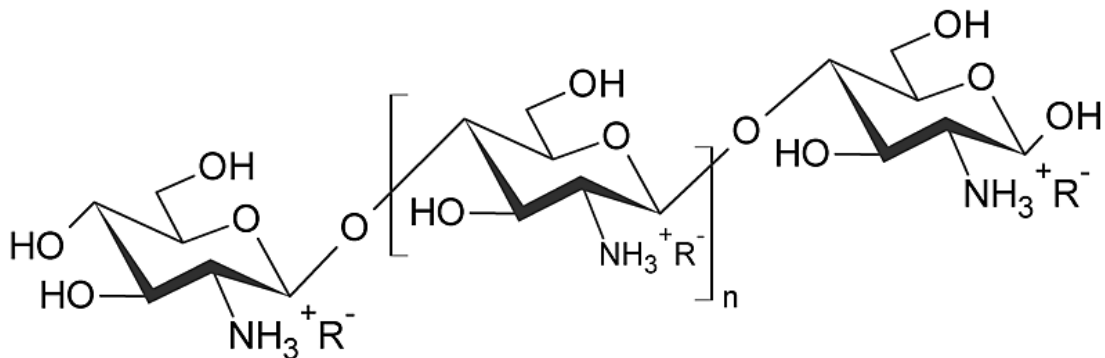
Chitosan là một polyme sinh học đang được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau: nông nghiệp, thực phẩm, khoa học sự sống, y học và mỹ phẩm. Chitosan là một dẫn xuất của chitin được phát hiện bởi Rouget (1859) [165]. Nguyên liệu chính để thu nhận chitosan hiện nay là nguồn phế liệu giáp xác (chủ yếu là phế liệu tôm) trong quá trình chế biến thủy sản [21, 109]. Tuy nhiên, nguồn phế liệu tôm ngày càng cạnh tranh vì nhu cầu về chitin, chitosan tăng trên thế giới nên việc tìm nguồn nguyên liệu mới để bù đắp là rất quan trọng trong giai đoạn hiện nay.

Chitosan hình thành sau khi tách nhóm acetyl ($-\text{NHCOCH}_3$) khỏi mạch chitin (quá trình deacetyl hoá). Chitosan được cấu tạo từ các mắt xích D-glucosamine liên kết với nhau bởi các liên kết β -(1-4)-glucozid. Chitosan có công thức hóa học gần giống chitin và cellulose, chỉ khác chitosan chứa nhiều nhóm amin ($-\text{NH}_2$) ở vị trí carbon số 2 [21]. Công thức hóa học của chitosan được trình bày ở Hình 1.5.



Hình 1.5. Công thức cấu tạo của chitin, chitosan.

Muối chitosan (chitosan hòa tan trong nước) được hình thành khi các nhóm amin ở vị trí số 2 của chitosan bị proton hóa ($-\text{NH}_3^+\text{OCOR}^-$) trong môi trường acid (vô cơ và hữu cơ). Công thức hóa học của muối chitosan được trình bày ở Hình 1.6.



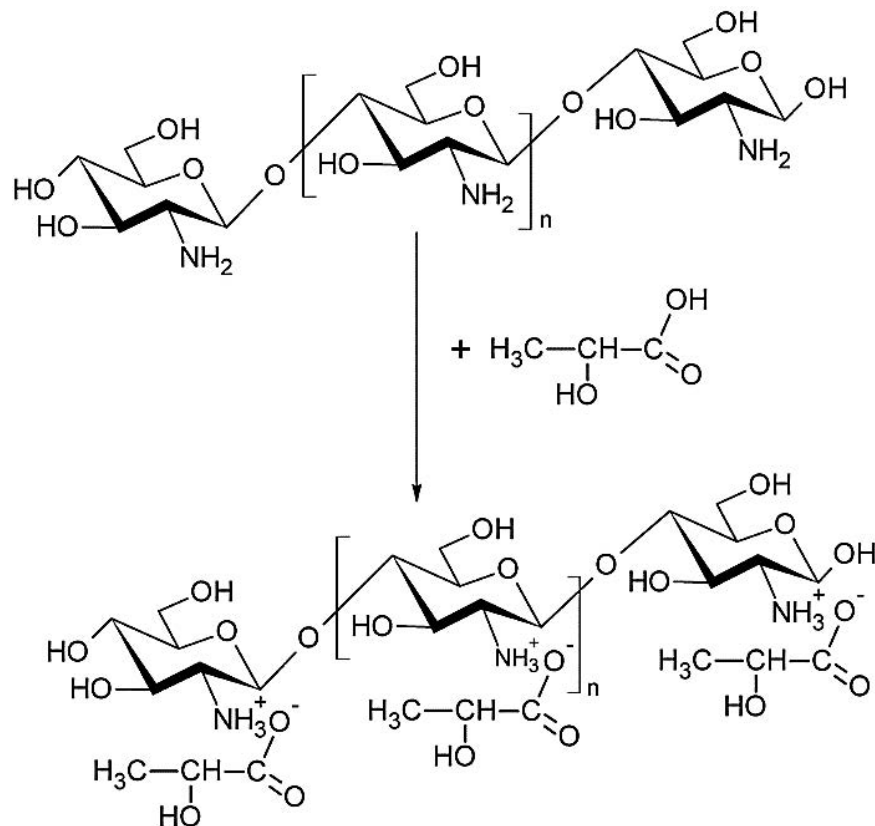
Hình 1.6. Công thức cấu tạo của muối chitosan (R^- là gốc acid)

1.3.1.1. Cơ chế tạo muối chitosan

Chitosan (CTS) là một bazơ nên dễ dàng phản ứng với các acid tạo muối. Trong dung dịch acid loãng, những chất điện ly cao phân tử (polyelectrolyte) được hình thành và có tính tan phụ thuộc vào bản chất của các anion có liên quan. Hình 1.7 thể hiện cơ chế phản ứng giữa chitosan và lactic acid tạo thành muối chitosan lactate bằng liên kết tĩnh điện thay vì liên kết cộng hóa trị ở vị trí carbon số 2 của chitosan. Tại các vị trí này trong chuỗi chitosan, các nhóm amin ($-\text{NH}_2$) bị proton hóa thành gốc muối ($-\text{NH}_3^+\text{OCOC}(\text{OH})\text{CH}_3$) bởi acid lactic liên kết để hình thành phân tử mang điện tích dương (Hình 1.7) [21, 119]. Như vậy, từ chitosan ta có thể tạo ra nhiều dẫn xuất chitosan khác nhau, có tính tan tốt trong nước và khả năng tan tốt hơn chitosan ban đầu. Do cấu

trúc hóa học của chitosan có sự hiện diện của hai nhóm chức gồm nhóm hydroxyl (-OH) và nhóm amin (-NH₂), tại vị trí này có thể liên kết với các nhóm chức khác [140].

Sự hình thành các muối chitosan khi hòa tan chitosan trong môi trường acid hoặc hỗn hợp dung môi chứa acid thông qua hệ thống sinh học xen kẽ, nghĩa là các phân tử acid được chèn vào cấu trúc phân tử của chitosan. Quá trình hình thành muối diễn ra khi có sự phản ứng giữa các gốc amin của chitosan với gốc acid. Do đó, khả năng tan của muối chitosan phụ thuộc vào độ deacetyl cao của chitosan (chứa nhiều gốc amin) và cấu trúc rỗng xốp của chitosan để có thể tiếp xúc phản ứng dễ dàng giữa gốc amin và gốc acid [30, 140]. Cơ chế tạo muối có thể giải thích dựa trên tính chất vật lý và sự solvat hóa: (a) chitosan có cấu trúc đa cực (tiền đề cho sự xen phủ), (b) sự solvat hóa hoặc sự tạo phức chất được tạo thành tốt nhất với các acid nhỏ có khối lượng phân tử thấp và các phân tử phẳng, (c) tỷ lệ thành phần acid tạo phức, (d) thể hiện sự gia tăng thể tích rõ ràng trong quá trình tạo muối do hiện tượng solvat hóa hoặc phức chất được hình thành, và (e) có thể song song quá trình tạo muối thì các chất hòa tan trong chitosan với một số loại cồn và ketone có khối lượng phân tử thấp được tạo thành [30].



Hình 1.7. Phản ứng tạo muối chitosan lactate.

Tuy nhiên, khi chitosan ở trạng thái rắn, tính linh động của cấu trúc bị hạn chế, ngăn cản sự dao động thể tích tự do và sự khuếch tán tương ứng của các phân tử trong cấu trúc cao phân tử [53]. Do vậy, việc làm trương nở chitosan trước khi cho tiếp xúc phản ứng với các gốc acid để tạo muối là cần thiết. Việc làm trương nở sẽ giúp tăng khả

năng tiếp xúc với hóa chất phản ứng và kiểm soát được quá trình thủy phân khi tiếp xúc với hóa chất phản ứng. Ngoài ra, độ tan của muối chitosan phụ thuộc vào nhiệt độ và thời gian phản ứng. Ở nhiệt độ cao và thời gian phản ứng dài, song hành với quá trình tạo muối có thể diễn ra hiện tượng cắt mạch chitosan khiến độ nhớt và khối lượng phân tử của muối chitosan giảm mạnh và dễ tan hơn so với chitosan ban đầu. Ở nhiệt độ phòng, sự cắt mạch vẫn diễn ra khi cho chitosan liên kết với các gốc acid, độ rắn của mạch chitosan thấp, làm giảm khối lượng phân tử và độ nhớt, độ tan tăng. Khi phản ứng ở nhiệt độ thấp (4°C) thì cấu trúc của chitosan được giữ nguyên khoảng 90% nên ngăn cản được sự phá hủy mạch chitosan [140]. Minh và cộng sự (2017) [129] đã khẳng định chitosan có hỗ trợ trương nở sẽ được kiểm soát tốt kết quả phân tích khối lượng phân tử chitosan sau khi tiến hành cắt mạch bằng hydrogen peroxide. Độ tan và độ nhớt của chitosan còn ảnh hưởng bởi bản chất của loại acid. Cervera và cộng sự (2011) [56] nghiên cứu điều chế muối chitosan bằng cách hòa tan với 3 loại lactic acid, citric acid và acetic acid để tạo dung dịch chitosan 4%, sau đó sấy phun. Sản phẩm muối có độ nhớt thấp là 273,6 mPa.s (chitosan acetate) > 249,0 mPa.s (chitosan lactate) > 220,9 mPa.s (chitosan citrate). Trong đó, sản phẩm muối được sấy cùng chế độ nhưng độ ẩm của muối chitosan acetate cao hơn hai muối còn lại. Do vậy, sản phẩm muối chitosan có độ tan cao và độ nhớt thấp hơn chitosan ban đầu [56, 140].

Tùy thuộc điều kiện trương nở (hỗn hợp dung dịch, vật liệu chitosan và các ứng dụng) khác nhau sẽ có trạng thái hydrate hóa khác nhau, nhưng nếu điều kiện trương nở có kiểm soát rất có ý nghĩa về tính năng cơ học của vật liệu, giúp cho sự khuếch tán và phản ứng tạo phức sẽ tốt hơn. Trong đó, sự trương nở chitosan đã được các nhà nghiên cứu quan tâm đánh giá khi ngâm trong hỗn hợp nước/ethanol. Quá trình trương nở làm thay đổi cấu trúc của chitosan, hỗn hợp dung môi ảnh hưởng mạnh mẽ đến các đặc tính cơ học của nó, làm giảm độ cứng chitosan đáng kể. Ở trạng thái khô, các liên kết hydro trong mạch chitosan được cố định, khi nước khuếch tán vào trong cấu trúc chitosan thì các liên kết hydro giữa các phân tử nước và các nhóm phân cực của chitosan sẽ cạnh tranh với các nhóm phân cực trước đó và tính linh động cấu trúc của các chuỗi chitosan có thể được tăng cường. Do đó, cấu trúc chitosan có thể chuyển từ trạng thái tinh thể sang trạng thái dẻo khi xuất hiện một lượng nước vô định hình bên trong cấu trúc. Việc đưa một lượng dung môi vào cấu trúc chitosan sẽ có tác dụng làm dẻo, tăng cường tính linh động phù hợp của các phân đoạn polyme, làm giảm độ cứng của cấu trúc và thay đổi các đặc tính đàn hồi của vật liệu. Đã có nhiều nghiên cứu quá trình trương nở của chitosan nhưng chưa có kết luận thống nhất. Vì đây là vấn đề không đơn giản do chitosan là chất sinh học bán tinh thể được cấu tạo bởi các chuỗi rất cứng, thậm chí có thể tạo thành cấu trúc tinh thể lỏng trong một số điều kiện nhất định [53]. Giống như các polyme khác trong tự nhiên,

chitosan có xu hướng tự liên kết trong dung dịch nước, thậm chí khi chitosan có độ deacetyl hóa cao. Do vậy, chitosan là nguyên liệu được hứa hẹn trong việc sản xuất các viên nang nano và vi mô để phân phối, lưu trữ, bảo vệ và giải phóng có kiểm soát các hoạt chất sinh học có khối lượng phân tử cao và khối lượng phân tử thấp [172]. Đây cũng là sự hứa hẹn cho việc dùng chitosan hay các dẫn xuất của nó ứng dụng trong việc lưu trữ, bảo quản dịch đặc vi tảo.

Để kiểm soát được sự trương nở của chitosan, sử dụng hỗn hợp gồm nước và một loại dung môi hữu cơ không ái lực phân tử với chitosan (chất điện môi) để ngâm ở nhiệt độ phòng (khoảng 20°C); ví dụ như một số rượu có khối lượng phân tử thấp như n-propanol, isopropanol, ethanol, methanol, butanol, acetone, methanol, glycerol... cho đến khi đạt trạng thái cân bằng đạt giá trị hằng số điện môi phù hợp [26, 53, 132]. Trong các dung môi hữu cơ sử dụng để kết hợp thì ethanol (không gây độc hại) thể hiện rất ít ái lực với chitosan và ethanol tinh khiết có thể làm chitosan mất nước. Hỗn hợp dung môi chứa trên 25% hàm lượng nước có xu hướng chuyển đổi trạng thái tinh thể rắn của chitosan và ảnh hưởng đến đặc tính nhớt của chitosan [53]. Kết quả này cũng tương tự nghiên cứu của Shilova và cộng sự (2018) [172], hỗn hợp dung môi gồm khoảng 20 – 34% thể tích ethanol. Shilova và cộng sự (2014) [171] khẳng định thể tích ethanol là 30% trong hỗn hợp dung môi sẽ gia tăng chiều dài của gốc alkyl dẫn đến tăng cường liên kết của natri alkyl sulfat với chitosan [171, 172]. Điều này được giải thích, hỗn hợp dung môi ethanol/nước ảnh hưởng đáng kể đến hoạt động hóa lý của chitosan trong dung dịch và sự tương tác của nó với các chất hoạt động bề mặt. Khi thể tích nước trong hỗn hợp dung môi giảm, dẫn đến giảm nồng độ liên kết tới hạn của các đại phân tử. Việc đưa rượu vào hỗn hợp dung môi làm tăng cường sự liên kết các đại phân tử chitosan. Điều này cho thấy rượu ảnh hưởng đến trạng thái cấu trúc và mức độ liên kết của các đại phân tử polyme, làm cho cấu trúc các đại phân tử chitosan nhỏ gọn hơn [172]. Qua đó, chúng ta có thể thấy việc nghiên cứu quá trình làm trương nở chitosan bằng hỗn hợp dung môi ethanol/nước (EtOH/H₂O) ở một tỷ lệ phù hợp để giúp sự hình thành phức chitosan và gốc lactate đạt hiệu quả cao nhất là cần thiết.

1.3.1.2. Phương pháp phân tích cấu trúc, đặc tính của chitosan và muối chitosan

Cấu trúc và đặc tính của chitosan và các dẫn xuất chitosan được đánh giá dựa trên các thông số như độ deacetyl, khối lượng phân tử, độ rắn và sự khác nhau về tính chất bề mặt.

Trong tự nhiên, chitin được xem như là lớp vỏ cứng của các loài giáp xác, có độ rắn cao và khó tan do có sự liên kết chặt chẽ với protein, calci carbonate và nhiều hợp chất hữu cơ khác. Có 3 dạng cấu trúc chitin (α -chitin, β -chitin, γ -chitin), chitin từ nguồn vỏ tôm có dạng α -chitin và có độ rắn phân tử cao nhất, các mạch chitin sắp xếp song song nhưng ngược chiều nhau. Chitosan là dẫn xuất của chitin, hình thành sau khi loại gốc acetyl, vậy chitosan có độ deacetyl cao và chứa nhiều nhóm amin (-NH₂). Phân tử lượng là thông số

cấu trúc quan trọng của chitosan, quyết định tính chất về độ kết dính, tạo màng, tạo gel, khả năng hấp thụ chất màu và khả năng kháng khuẩn, kháng nấm. Để đánh giá khối lượng phân tử của chitosan, phương pháp phân tích phổ sắc ký kết hợp phân tán ánh sáng tĩnh đa góc (SEC-MALLS). Phân tử lượng của chitosan phụ thuộc vào nguồn chitin và điều kiện deacetyl và độ nhớt của chitosan phụ thuộc vào phân tử lượng. Độ rắn của chitosan phụ thuộc vào phân tử lượng (bao gồm các yếu tố ảnh hưởng đến khối lượng phân tử của chitosan), được xác định bằng phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD), phương pháp quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) và phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR). Trong đó, phổ NMR cho phép xác định chi tiết về cấu trúc hóa học của phân tử phân tích. Phổ XRD có thể nhận diện các đỉnh đặc trưng biểu diễn độ kết tinh và độ rắn. Phổ FTIR cho biết các thông tin về các nhóm chức của các phân tử phân tích. Ngoài ra, phương pháp xác định tính chất bề mặt chitosan và dẫn xuất của nó qua kính hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy sự khác biệt về hình dạng và cấu trúc bề mặt [21].

Cấu trúc phân tử của các dẫn xuất chitosan (muối chitosan) được xác định bằng cách sử dụng tia cực tím (UV), tia hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), nhiễu xạ tia X và kỹ thuật quang phổ lưỡng sắc tròn (CD). Bản chất của chitosan là trong suốt ở vùng UV và vùng khả kiến, nên khó có thể xác định cấu trúc bằng các phương pháp quang phổ, nhưng có mượn tế bào sắc tố từ phân tử bên ngoài (các nguyên tố nhóm acid đóng vai trò của các phân tử) để phân tích quang phổ, từ đó suy ra cấu trúc xoắn ốc của các muối chitosan. Tuy nhiên, tùy vào loại muối có thể nhận diện cấu trúc xoắn của muối chitosan bằng phương pháp UV, ví dụ phổ hấp thụ điện tử (UV) của muối chitosan p-amino benzoic acid và p-nitro benzoic acid ở một dải rộng (295 – 340 nm) do sự hiện diện của vòng thơm, trong khi phổ UV không hoạt động đối với muối chitosan ascorbic acid. Sự hình thành các muối được nhận diện qua các phổ FTIR (cho thấy nhóm COOH của acid liên kết với nhóm NH₂ của mạch chitosan) và NMR (thể hiện liên kết giữa nhóm NH₂ trên mạch chitosan và nhóm COOH trên acid). Phổ XRD xác định độ kết tinh và độ rắn của muối chitosan và tùy thuộc vào loại acid gắn kết với chitosan. Phổ CD của muối chitosan cho thấy cấu trúc bậc hai dạng xoắn và các dải cường độ trong ascorbic acid chitosan, p-amino benzoic acid và muối p-nitro benzoic acid tương ứng trong hợp chất hữu cơ DMSO (Dimethyl sulfoxide). Vậy nên, các muối polyme có khả năng hòa tan cao trong phạm vi pH rộng, điều này mở ra triển vọng mới cho ứng dụng y sinh học của chitosan. Cường độ của các dải này phụ thuộc vào số lượng chitosan và độ lớn của acid. Ngoài ra, độ deacetyl (DD) của chitosan cũng ảnh hưởng đến dải cường độ, khi DD < 50% có sự kéo dài OH trở nên rộng hơn và chuyển sang tần số thấp và các dải sau đó trở nên hẹp và di chuyển trở lại tần số cao hơn ($\sim 3,550\text{ cm}^{-1}$) khi độ deacetyl tăng lên đến 96%, lúc này cấu trúc có trật tự hơn [173].

1.3.2. Tính chất của chitosan, muối chitosan và ứng dụng

Chitosan là polyme sinh học không độc hại, có nguồn gốc tự nhiên, tồn tại ở trạng thái rắn (bột, vảy), xốp nhẹ, màu trắng ngà, có khối lượng phân tử lớn và không tan trong nước [21, 72]. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện việc chuyển đổi chitosan thành các dẫn xuất khác nhau nhằm cải thiện các đặc tính, trong đó có tính tan trong nước. Trong số các dẫn xuất này, chitosan lactate rất được quan tâm vì tính tương hợp sinh học cao, kháng khuẩn tốt, độc tính thấp và điều chế đơn giản [116]. Do vậy, chitosan và muối chitosan được ứng dụng khá rộng rãi ở nhiều lĩnh vực.

1.3.2.1. Tính chất của chitosan và muối chitosan

a. Khả năng hòa tan của chitosan và muối chitosan

Chitosan có khả năng tan tốt trong các dung dịch acid hữu cơ (acetic acid, formic acid, propionic acid, lactic acid, citric acid) và acid vô cơ (clohydric acid) loãng với các nồng độ khác nhau, tạo các dịch keo mang điện tích dương. Đây là trường hợp đặc biệt vì hầu hết các polysaccharide tự nhiên sẽ hình thành dung dịch keo mang điện tích âm trong môi trường acid loãng. Hạt keo chitosan mang điện tích dương sẽ thuận lợi trong việc liên kết keo tụ các ion mang điện tích âm hay các polyme mang điện tích âm khác [21, 160]. Độ hòa tan của chitosan phụ thuộc vào pKa (6,2 – 6,8), loại acid và nồng độ acid (0,25 – 10%) và độ deacetyl hóa (chitosan có độ deacetyl cao thì khả năng hút nước của chitosan giảm, mức độ hòa tan trong acid loãng càng mạnh) [21].

Tuy nhiên, chitosan có khả năng hòa tan kém trong môi trường pH trung tính và cao hơn (pH kiềm) mà chỉ tan tốt trong dung dịch acid loãng. Chitosan không thể hòa tan trong nước do có khối lượng phân tử cao [106, 154]. Điều này làm hạn chế các ứng dụng của nó ở hầu hết các lĩnh vực, đặc biệt trong ngành thực phẩm và dược phẩm. Nhiều nghiên cứu chuyển đổi thu muối amoni bậc 4 của chitosan, tạo các dẫn xuất chitosan N-alkyl hóa với monosaccharide và copolyme khi ghép chitosan với ethylene glycol để cải thiện khả năng hòa tan trong nước [92, 108, 203]. Nhưng các sản phẩm điều chế này có thể thay đổi một số tính chất của chitosan do chúng hình thành nhờ liên kết cộng hóa trị [104]. Ngoài ra, nhờ trong chuỗi chitosan có sự hiện diện của các nhóm amin ($-NH_2$) và hydroxyl ($-OH$) có khả năng hoạt động phản ứng cao. Các nhóm này trong mạch chitosan có thể được gắn thêm các nhóm chức mới để cải thiện khả năng hòa tan của chitosan trong môi trường pH khác nhau [177].

Do đó, việc tạo các loại dẫn xuất muối nhằm cải thiện tính tan của chitosan đang được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Muối chitosan hay còn gọi là chitosan hòa tan trong nước, được tạo ra khi các nhóm amin trong chuỗi chitosan bị proton hóa ($NH_3^+OCOR^-$) trong môi trường acid. Các loại acid hữu cơ và vô cơ loãng

đều có thể kết hợp chitosan để tạo muối như formic acid, acetic acid, citric acid, lactic acid, glutamic acid, ascorbic acid, clohydric acid ... [21, 56]. Tuy nhiên, một số nghiên cứu cho thấy chitosan có khả năng hòa tan hạn chế trong acid đậm đặc và gây tắc mạch. Độ hòa tan của chitosan phụ thuộc vào pKa và nồng độ acid [59, 154]. Hiện nay, các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu điều chế muối chitosan nhằm hạn chế sự tắc mạch chitosan khi hòa tan trong các dung dịch acid loãng, đồng thời làm tăng khả năng ứng dụng chitosan khi ở dạng muối có thể hòa tan trực tiếp trong nước. Tuy nhiên, muối chitosan vẫn giữ được bản chất lý hóa, hoạt tính sinh học của chitosan (tính kháng khuẩn, chống oxy hóa) [187]. Các đặc tính hóa học, vật lý và sinh học của muối có thể bị ảnh hưởng bởi cấu trúc của các acid phản ứng, điều kiện điều chế muối, mức độ khử oxy hóa, khối lượng phân tử của chitosan và tính không đồng nhất của polyme về độ deacetyl hóa [198].

b. Khả năng hấp phụ và tạo màng của chitosan và muối chitosan

Chitosan có thể hấp phụ và tạo liên kết tốt với các chất màu, ion kim loại, lipid và protein. Chitosan có độ deacetyl cao thì có độ hấp phụ màu tốt. Chitosan có khả năng tạo màng tốt nhờ các tính chất cơ lý như độ chịu kéo, độ rắn, độ ngấm nước, phân tử lượng, độ deacetyl hóa và loại dung môi hòa tan chitosan. Chitosan có ứng suất kéo và độ giãn dài giới hạn cao khi độ deacetyl càng cao nhưng ngược lại thì độ trương nở thấp [21]. Chitosan lactate được tạo ra ở dạng màng phim có độ bền kéo và độ đâm thủng lần lượt là 2,00 và 1,45 MPa [114].

c. Khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của chitosan và muối chitosan

Chitosan có khả năng làm ức chế vi khuẩn và vi nấm. Mức độ ức chế được vi sinh vật phụ thuộc vào loại chitosan (độ deacetyl > 85% và khối lượng phân tử > 9 kDa), nồng độ sử dụng, loài vi sinh vật, điều kiện áp dụng... Một số nghiên cứu đã minh chứng có thể ngăn sự phát triển của nhiều vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutensis*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifera*, *Aspergillus*, *Rhodotorula glutensis*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifera*, *Aspergillus niger* và có khả năng kháng nấm mốc sinh độc tố aflatoxin như *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*. Hoạt tính kháng khuẩn của chitosan và các dẫn xuất của nó nhờ sự tích điện dương khi nhóm amin (-NH₂) bị proton hóa thành (-NH₃⁺) tương tác với thành tế bào và làm chết vi khuẩn [21, 160]. Chitosan lactate có khả năng kháng khuẩn gram dương (*S. aureus* và *B. cereus*) nhạy cảm hơn vi khuẩn gram âm (*P. carotovorum* và *E. coli*) và có thể kháng nấm *A. alternata* và *M. fructigena* [114].

d. Khả năng chống oxy hóa của chitosan và muối chitosan

Chitosan có khả năng kìm hãm các chất oxy linh động và ngăn cản sự oxy hóa lipid trong thực phẩm và các hệ sinh học nhờ khả năng loại bỏ các gốc tự do hoặc liên kết với các ion kim loại. Hoạt tính chống oxy hóa của chitosan quyết định bởi các nhóm chức hydroxyl (-OH) và amin (-NH₂), do các tác nhân oxy hóa phản ứng với các nguyên tử hydro hoạt động trong nhóm (-OH) và (-NH₂) của chitosan để tạo thành một gốc đại phân tử ổn định hơn. Sự tương tác cao của chitosan với các ion kim loại vì có các nhóm amin tự do và hình thành phức giữa chitosan và ion kim loại nhờ liên kết chelat. Chitosan có khối lượng phân tử thấp có hoạt tính chống oxy hóa cao, có tác dụng làm giảm cholesterol và tăng cường chống stress oxy hóa. Việc loại trừ các gốc hydroxyl bằng chitosan có thể ức chế quá trình peroxy hóa lipid của phosphatidylcholine, linoleat liposome, linoleic acid [21, 193].

1.3.2.2. Các lĩnh vực ứng dụng

Chitosan và muối chitosan được ứng dụng rộng rãi trong các ngành y sinh, thực phẩm, nông nghiệp, công nghệ sinh học và dược phẩm nhờ có tính chất độc đáo mang bản chất polycation và là polyme tự nhiên an toàn (có tính tương thích sinh học, có khả năng phân hủy sinh học). Chitosan có khả năng kháng nấm, kháng khuẩn, chống oxy hóa, tạo màng, tạo gel, hấp phụ màu, làm trong dung dịch... Tuy nhiên, chitosan không hòa tan được trong nước, dung dịch kiềm, dung môi hữu cơ và chỉ tan trong một số acid hữu cơ và acid vô cơ loãng nên ứng dụng của nó bị hạn chế rất nhiều. Vì vậy, việc cải thiện khả năng hòa tan của chitosan để có thể tan ở khoảng pH rộng đang là một trong những vấn đề được các nhà khoa học trong và ngoài nước quan tâm nghiên cứu [21, 119, 173, 202].

a. Ứng dụng trong thực phẩm, công nghệ sinh học và y dược

Đã có nhiều nghiên cứu và ứng dụng chitosan làm vật liệu màng bao thực phẩm (rau, trái cây, cá, thịt...) để bảo quản dựa trên nguyên tắc tạo rào cản không khí trong quá trình hô hấp của rau quả hay sự thoát ẩm của thịt cá. Ngoài ra, màng bao chitosan còn có thể duy trì được chất lượng của thực phẩm, ngăn ngừa sự phát triển và diệt vi sinh vật và kéo dài thời gian bảo quản của rau quả sau thu hoạch [21, 72]. Muối chitosan vẫn giữ được cấu trúc ban đầu của chitosan và có thể hòa tan trong nước. Muối chitosan có khả năng ứng dụng rộng rãi trong ngành công nghệ thực phẩm nhờ sự tiện dụng (có thể cải thiện tính chất hòa tan trong nước trung tính để tạo dịch). Nhiều nghiên cứu cũng minh chứng cho thấy muối chitosan không thay đổi tính chất của chitosan, được sử dụng như chất bảo quản thực phẩm nhằm hạn chế vi sinh vật [21, 72, 119]. Britto và Assis (2012) [47] nghiên cứu khả năng tương thích sinh học (giảm mất nước, phản ứng hóa nâu và kháng khuẩn) của lớp phủ chitosan và các muối chitosan bậc 4 lên các miếng táo cắt lát, có thể ăn trực tiếp sau 7 ngày bảo quản. Bởi vì chitosan hòa tan trong môi trường

pH thấp sẽ bị giảm khả năng tương thích sinh học giữa lớp phủ và bề mặt thực phẩm, có thể xảy ra phản ứng phân hủy ảnh hưởng đến màu sắc và hương vị thực phẩm. Các loại muối alkyl chitosan bậc 4 này có khả năng tan hoàn toàn trong nước và dễ dàng tạo thành màng bao phủ quanh miếng táo nhằm hạn chế sự hao hụt khối lượng do mất nước. Đồng thời, hiệu quả ngăn ngừa sự biến nâu của táo được đánh giá cao, đưa ra giải pháp tiềm năng thay thế sử dụng các chất chống hóa nâu gây nguy hiểm cho người sử dụng. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy hiệu quả kháng nấm (*Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*) cao. Tuy nhiên, màng bao của muối chitosan được điều chế cùng điều kiện với các dẫn xuất alkyl chitosan được đánh giá có độ đồng nhất tốt, phân bố đều trên bề mặt tiếp xúc và độ nhám thấp. Ngược lại, màng bao từ các muối alkyl chitosan xuất hiện sự nhấp nhô trên bề mặt do sự keo tụ của chuỗi cao phân tử không đồng đều [47]. Muối chitosan còn được ứng dụng làm trong nước quả nhờ nguyên lý keo tụ, ái lực của chitosan với các chất huyền phù trong nước quả để kết thành bông và lắng xuống và được lọc sau đó. Hai loại muối CTS acetate và lactate được thử nghiệm cho thấy không có ảnh hưởng đáng kể nào về loại muối, nồng độ sử dụng, thời gian xử lý đến các thông số chất lượng và chất lượng cảm quan của nước quả. Tuy nhiên, CTS lactate được đánh giá là có hiệu quả cao hơn CTS acetate về tất cả các chỉ tiêu đánh giá và thu được năng suất cao nhất (66,14%) trong thời gian 90 phút [89, 90].

Chitosan và các dẫn xuất chitosan có tính tương thích sinh học, tự phân hủy sinh học, không độc, khả năng tạo màng, làm lành vết thương, kháng khuẩn, kháng nấm và kể cả kháng virus. Do vậy, nhiều công trình nghiên cứu và ứng dụng chitosan và dẫn xuất trong lĩnh vực kiểm soát quá trình làm chất mang vận chuyển DNA và giải phóng thuốc. Chitosan có thể làm chỉ nhân tạo, keo gắn xương, thuốc giảm béo, da nhân tạo để trị bỏng, chất chống đông máu, kính sát trùng... Chitosan được ứng dụng trong công nghệ nuôi cấy mô tế bào động thực vật, cố định enzyme, cố định tế bào, bảo vệ các hoạt chất sinh học (astaxanthin, vitamin, DNA), chế tạo cảm biến sinh học (biosensor) để đo nồng độ glucose, cholesterol, DNA... Ngoài ra, chitosan và các dẫn xuất còn được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực thu hồi hay phân riêng các chất có hoạt tính sinh học như protein, tinh sạch protein, enzyme và thu hồi vi tảo [21].

Đến nay, chitosan và muối chitosan đã được sản xuất, phân phối và ứng dụng trong hệ thống ngành dược phẩm. Các muối của chitosan như glutamate, aspartate, hydrochlorate và acetate được sử dụng làm thuốc đặc trị đại tràng và tăng cường cung cấp peptide trong điều trị biểu mô ruột [56]. Ngoài ra, chitosan được chuyển về dạng muối CTS acetate có kích thước nano cũng được báo cáo rằng dùng để làm chất mang truyền DNA nhờ sự tạo phức giữa chitosan-DNA, nghiên cứu điều trị ung thư, nhiễm virus, bệnh loãng xương. Chitosan được minh chứng sử dụng làm chất nền của vaccin và đã thử

nghiệm trên người cho kết quả không gây độc tính và phản ứng phụ sau khi tiêm [68, 105, 197]. Rossi và cộng sự (2008) [163] đã điều chế muối CTS ascorbate có đặc tính tăng cường xâm nhập tốt vào cả lớp tế bào đơn và hai bên niêm mạc.

b. Ứng dụng trong nông nghiệp, nuôi trồng thủy sản và xử lý môi trường

Trong nông nghiệp, chitosan được sử dụng bọc các hạt giống để bảo quản tránh nấm mốc, đồng thời tăng cường khả năng nảy mầm của hạt, kích thích tăng trưởng và giảm stress cho cây. Chitosan được trộn vào đất với mục đích ngăn ngừa sự tấn công của nấm trong đất, tăng cường sự hoạt động của các vi sinh vật có lợi trong đất. Dịch chitosan còn được phun lên lá để chữa bệnh héo lá do vi khuẩn thuộc chủng *Fusarium* gây ra. Trên cánh đồng, chitosan đã được ứng dụng để bảo vệ các bệnh thối rễ và hạn chế sự thoát hơi nước cho cây trồng (cà chua, ớt, bí, dưa leo, rau cải, lúa, cà phê...), thu được năng suất cao. Tuy nhiên, với mỗi loại cây trồng và từng giai đoạn phát triển, cần nghiên cứu loại chitosan ứng dụng phù hợp [21].

Hiện nay chitin, chitosan vẫn còn hạn chế trong việc nghiên cứu và ứng dụng ở lĩnh vực nuôi trồng thủy sản. Một số nghiên cứu đã thử bổ sung vào thức ăn thủy sản, kiểm soát bệnh tật của vật nuôi và xử lý ô nhiễm nước nuôi. Ứng dụng chitin, chitosan bổ sung vào thức ăn cho tôm và cá đạt một số hiệu quả về khả năng kháng lại *Vibrio parahaemolyticus*, kích thích sinh trưởng, tăng hệ miễn dịch và tăng tỉ lệ sống. Đồng thời chitosan cũng là chất kết dính để làm tăng độ ổn định của viên thức ăn trong môi trường nước, kết quả cho thấy chitosan có độ deacetyl và nồng độ sử dụng càng cao thì độ phân rã của thức ăn càng chậm. Điều này còn hữu ích cho môi trường nuôi được cải thiện, giảm ô nhiễm do thức ăn tan nhanh và lắng nhanh [3, 19, 21]. Để thuận tiện trong việc ứng dụng rộng rãi chitosan, cần nghiên cứu các loại dẫn xuất của chitosan có thể tan trong nước và có đặc tính phù hợp với mục đích sử dụng, đặc biệt quan tâm đến độ deacetyl, phân tử lượng, độ nhớt và độ tan.

Trên thị trường thương mại, chitosan (hạt, vi hạt, vảy, màng) chủ yếu được sử dụng để xử lý nước thải nhờ khả năng hấp phụ và tạo phức với các ion kim loại, các chất màu hoặc khả năng keo tụ, tạo bông với các hợp chất hữu cơ. Nhờ các nhóm amin của chitosan có ái lực mạnh với các ion kim loại nặng (đồng, chì, thủy ngân, cadimi, crôm...) tạo phức và được loại đi. Tuy nhiên cần lưu ý chitosan có hạn chế là hòa tan trong môi trường pH thấp, vậy nên chitosan không hiệu quả khi xử lý các nguồn nước thải có pH < 3,5, có thể do các ion H^+ cạnh tranh với các ion kim loại. Hiện nay, để ứng dụng hiệu quả trong lĩnh vực này thì chitosan thường được liên kết ngang với một số hợp chất khác hoặc dùng chitin (chitosan có độ deacetyl thấp) để tăng khả năng hấp phụ kim loại trong nước thải. Chitin, chitosan còn được sử dụng để hấp phụ nhiều loại thuốc nhuộm nhờ phản ứng trao đổi ion tại pH thích hợp. Để nâng cao hiệu quả hấp phụ chất màu ở các

nhà máy dệt nhuộm thì chitosan sử dụng cần có cấu trúc xốp (giảm độ rắn), tăng nhiệt độ môi trường, điều chỉnh pH khoảng 6. Ngoài ra, quá trình hấp phụ chất màu còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác [21].

Trong nước thải thuộc ngành chế biến thực phẩm còn chứa rất nhiều chất hữu cơ khác, đặc biệt là protein. Dựa trên cơ chế tương tác tĩnh điện và kẹp giữ cơ học của các nhóm amino trên chitosan với các nhóm amino trên các phân tử protein tạo keo protein. Cộng thêm nhờ khả năng hấp phụ của chitosan tạo cầu nối liên kết các hạt keo protein để kết tủa thành các hạt phân tử lớn và lắng xuống. Nhiều công trình nghiên cứu sử dụng chitosan để thu hồi protein từ nước rửa surimi, dịch thải máu cá, nước thải trong quá trình chế biến thủy sản, chế biến các sản phẩm từ sữa... Sản phẩm sau thu, hiện nay được tận dụng làm thức ăn cho gia súc vì chitosan được xem là an toàn sinh học. Bên cạnh đó, hệ thống xử lý nước thải sau chế biến thực phẩm đảm bảo hoạt động tốt do đã loại đi phần lớn hàm lượng protein, góp phần hạn chế vấn đề ô nhiễm môi trường [21]. Muối chitosan (CTS acetate, CTS lactate) cũng đã được điều chế làm chất keo tụ để ứng dụng xử lý nước thải trong quá trình chế biến cá. Kết quả cho thấy mức độ tổng chất rắn lơ lửng (TSS) và chu cầu oxy hóa học (COD) của nước thải giảm. Trong đó, CTS lactate được đánh giá có hiệu quả làm chất keo tụ tốt hơn so với CTS acetate để làm giảm COD và TSS, do ion lactate tác động lực tĩnh điện của các hạt ở dạng huyền phù tạo điều kiện cho quá trình kết bông. Nồng độ sử dụng tối ưu cho quá trình xử lý chất thải từ công nghệ chế biến cá là 29,50 mg CTS lactate/L (pH 6,0) và 28,29 mg CTS acetate/L (pH 7,13) [89, 90]. CTS lactate và CTS acetate cũng được đánh giá cao khi ứng dụng làm chất tiền xử lý đông tụ cation trong công nghệ xử lý nước cấp hộ gia đình trước khi kết hợp lọc nước qua vật liệu gốm sứ. Kết quả nghiên cứu cho thấy muối chitosan có thể loại bỏ và làm giảm một số loại vi khuẩn, virus như *E. coli*, *C. perfringens*, tổng số Coliforms và một số virus thuộc nhóm thực khuẩn thể trong nước [67].

1.3.3. Phương pháp sản xuất chitosan và điều chế muối chitosan

1.3.3.1. Phương pháp sản xuất chitin, chitosan

Trong lớp vỏ giáp xác (tôm, cua, ghẹ) có chứa thành phần chitin là chủ yếu, liên kết cộng hóa trị chặt chẽ với các thành phần khác gồm protein, acid béo, astaxanthin. Ngoài ra, các hạt khoáng chất (chủ yếu là CaCO_3) được phân bố đồng đều trong lớp vỏ [21].

Hiện nay, chitin được thu nhận chủ yếu từ nguồn phế liệu thải ra trong quá trình chế biến thủy sản. Sau đó, chitosan sẽ được sản xuất từ chitin qua công đoạn deacetyl, đây là quá trình tách nhóm acetyl ra khỏi phân tử chitin. Để thu nhận được chitin trong vỏ giáp xác, tiến hành khử các hợp chất phi chitin có trong vỏ giáp xác gồm 3 công đoạn: (1) khử protein, (2) khử khoáng và (3) khử màu. Khử các hợp chất phi chitin có

trong vỏ giáp xác có thể thực hiện bằng một trong ba phương pháp phổ biến gồm: (1) phương pháp hóa học, (2) phương pháp sinh học và (3) phương pháp kết hợp hóa học và sinh học. Tuy nhiên, các thông số kỹ thuật trong quá trình khử sẽ khác nhau tùy thuộc vào nguồn nguyên liệu (loại vỏ giáp xác, vỏ đầu hoặc vỏ thân), yêu cầu chất lượng sản phẩm chitin/chitosan (tính chất vật lý, hóa học và sinh học), điều kiện sản xuất (kinh tế, môi trường, quy mô sản xuất). Trong thực tế, quy trình sản xuất chitin/chitosan thương mại ở quy mô lớn vẫn sử dụng phương pháp hóa học do có nhiều ưu điểm hơn các phương pháp khác như thời gian xử lý nhanh, đơn giản, dễ kiểm soát quá trình. Tuy nhiên, phương pháp hóa học cũng có nhược điểm như ô nhiễm hóa chất ra môi trường và mau hư hỏng thiết bị do ăn mòn [21].

a. Phương pháp hóa học

Trong suốt quá trình khử khoáng, khử protein và khử màu để tạo chitin được sử dụng các loại hóa chất khác nhau để đáp ứng mục tiêu của từng công đoạn. (1) Quá trình khử khoáng thường dùng các hóa chất xử lý như HCl, HNO₃, H₂SO₄. Nồng độ acid thường sử dụng từ 0,5 – 2M, nhiệt độ xử lý từ nhiệt độ thấp đến nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian từ 0,5 đến 48 giờ. (2) Quá trình khử protein có thể dùng các hóa chất như NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂. Tùy theo tính chất của nguyên liệu và yêu cầu chất lượng của chitin để chọn điều kiện xử lý phù hợp. Nồng độ các chất kiềm sử dụng trong khoảng 1 – 10%, ở nhiệt độ phòng hoặc nhiệt độ cao (lên đến 100°C), xử lý trong thời gian từ vài giờ đến vài ngày. (3) Việc tẩy màu các loại vỏ giáp xác có thể thực hiện dưới ánh sáng mặt trời hoặc xử lý bằng một số hóa chất như KMnO₄, H₂O₂, NaOCl, NaHSO₃, nhiệt độ và thời gian xử lý cũng tùy thuộc vào loại nguyên liệu và yêu cầu chất lượng sản phẩm [21].

Sản xuất chitosan bằng phương pháp hóa học thông qua quá trình khử acetyl khỏi phân tử chitin. Thông thường, quá trình deacetyl hóa bằng cách ngâm chitin trong dung dịch NaOH (40 – 50%) hoặc KOH đậm đặc (55 – 60%) ở nhiệt độ cao (60 – 150°C). Độ deacetyl của chitosan đạt khoảng 68% khi xử lý trong 1 giờ, sau đó quá trình tách gốc acetyl diễn ra chậm và kèm theo hiện tượng cắt mạch. Chúng ta có thể sử dụng acid đặc để thực hiện quá trình deacetyl, tuy nhiên quá trình cắt mạch cũng diễn ra đồng thời. Do vậy, hiện nay người ta vẫn sử dụng kiềm đặc để xử lý chitin tạo chitosan và yếu tố về nồng độ, nhiệt độ và thời gian xử lý ảnh hưởng lớn đến chất lượng của chitosan [21].

b. Phương pháp sinh học

Trong phế liệu thải ra từ chế biến thủy sản thường chứa hàm lượng protein, khoáng, lipid và chất màu khá lớn, đặc biệt là chất màu astaxanthin có ở lớp vỏ giáp xác. Đây là những thành phần có giá trị có thể tận thu được trong quá trình sản xuất chitin theo phương pháp sinh học. Đồng thời việc áp dụng phương pháp sinh học trong

sản xuất chitin còn giảm thải hóa chất ra môi trường gây ô nhiễm và nâng cao chất lượng sản phẩm. Tuy nhiên, công đoạn khử khoáng cũng phải sử dụng các loại acid để tách khoáng. Một số các acid hữu cơ như lactic acid, acetic acid hoặc dùng vi khuẩn lên men lactic (ủ xilô) đã được nghiên cứu và ứng dụng vì hiệu quả tách cũng tương đối cao và ít gây tác hại đến môi trường [21].

Để thay thế chất kiềm dùng trong công đoạn khử protein, nhiều nghiên cứu đã sử dụng nhiều loại protease khác nhau (papain, chymotrypsin, Alcalase, Protamex, Flavourzyme) hoặc enzyme từ vi sinh vật (*Pseudomonas maltophilia*) trong sản xuất chitin. Tuy nhiên, việc sử dụng phương pháp sinh học để thay thế phương pháp hóa học chưa hiệu quả, hàm lượng protein còn lại trong chitin khá cao và khó áp dụng ở quy mô lớn [21].

Quá trình deacetyl hóa chitin thành chitosan bằng phương pháp sinh học chủ yếu được thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm bằng enzyme chitin deacetylase thu nhận từ nấm *Absidia coerulea*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Pichia pastoris* đã được nghiên cứu khử gốc acetyl từ chitin. Kết quả cho thấy chất lượng chitosan thu được có phân tử lượng lớn và độ nhớt cao hơn chitosan sản xuất bằng phương pháp hóa học. Quá trình lên men cần thời gian nhiều ngày, đồng thời giá thành của enzyme cao nên khó áp dụng ở quy mô lớn [21].

c. Phương pháp kết hợp sinh học và hóa học

Để hạn chế nhược điểm của từng phương pháp, các nhà khoa học đã nghiên cứu xử lý kết hợp phương pháp sinh học với hóa học để sản xuất chitin, chitosan. Điều này giúp chúng ta có thể tận thu được các thành phần có giá trị là protein và astaxanthin trong vỏ giáp xác khi thực hiện phương pháp sinh học đầu tiên. Sau đó phương pháp hóa học có thể hỗ trợ tiếp tục khử protein và khoáng ở nồng độ thấp, giảm thiểu hàm lượng hóa chất sử dụng. Kết quả cho thấy chất lượng chitin thu được từ phương pháp cải tiến này cao hơn chỉ xử lý phương pháp hóa học. Hàm lượng khoáng và protein còn lại trong chitin đảm bảo dưới 1%, đạt yêu cầu chất lượng chitin thương mại. Đây là phương pháp xử lý phù hợp theo hướng phát triển bền vững và thân thiện môi trường [21].

1.3.3.2. Phương pháp điều chế muối chitosan

Hiện nay đã có nhiều nghiên cứu điều chế muối chitosan với trọng lượng trong khoảng 0,5 – 25g, kích cỡ khoảng 8 – 40 mesh và được phản ứng với các loại acid trong môi trường hữu cơ thích hợp, lắc hoặc khuấy trong 1 – 3 giờ. Nhiệt độ phản ứng và làm khô dao động khoảng 12 – 35°C. Sản phẩm muối thu được sau khi lọc và rửa bằng dung môi mới để loại acid dư. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình hình thành muối chitosan phụ thuộc vào kích thước hạt chitosan (20 – 40 mesh thường được chọn), tỷ lệ chitosan

và dung môi phản ứng, nồng độ và loại acid (formic acid và pyruvic acid được đánh giá là đạt hiệu quả cao và ổn định nhất), nhiệt độ (ổn định ở 20 – 25°C) và thời gian phản ứng, nhiệt độ làm khô thường là dưới 40°C để tránh bị biến màu sản phẩm. Ngoài ra, khả năng tan của chitosan trong môi trường acid ảnh hưởng bởi một số yếu tố quan trọng như hằng số phân ly và hằng số điện môi của acid và môi trường. Sự phức tạp này do sự có mặt của nước và kích thước phân tử của acid gây ra. Một yếu tố khác trong hỗn hợp không đồng nhất này là hệ số phân bố của các thành phần, ví dụ cacboxylic acid có khối lượng phân tử thấp hơn có thể phân bố giữa chitosan không phân hủy và dung môi hữu cơ. Kể cả độ ẩm của chitosan cũng cần được kiểm soát vì trong một số trường hợp nhất định, việc bổ sung một lượng nhỏ nước giúp cho quá trình phản ứng được tốt hơn. Lúc này, nước được xem như là chất mang hoặc là môi trường phân ly acid và tăng khả năng phản ứng, ví dụ điển hình là khi chitosan phản ứng với propionic acid trong môi trường acetonitrile cần chứa 5% nước [30].

Có 3 phương pháp điều chế muối chitosan: (1) sản phẩm tạo ra khi chitosan ở trạng thái rắn phản ứng với acid trong môi trường còn và sấy khô, (2) sản phẩm tạo ra khi cho chitosan ở trạng thái rắn phản ứng với hơi acid và sấy khô, (3) chitosan được hòa tan hoàn toàn trong môi trường acid tạo gel, sau đó sấy phun/đông khô thành bột hoặc sấy khô tạo màng [27, 131]. Đến nay, một số muối chitosan đã được điều chế trong cả hai môi trường acid hữu cơ và vô cơ như clohydric acid, formic acid, glutamic acid, lactic acid, citric acid, acetic acid, ascorbic acid... được tổng hợp và trình bày ở Bảng 1.3.

a. Phản ứng chitosan với acid ở trạng thái rắn – lỏng

Phương pháp tạo muối bằng phản ứng rắn – lỏng có ưu điểm đơn giản, dễ thực hiện và không tốn chi phí đầu tư thiết bị, nhưng đến nay vẫn chưa có nghiên cứu đưa ra quy trình cụ thể nhằm nâng cao chất lượng sản phẩm.

Các loại muối chitosan acetate được điều chế bằng cách ngâm 5g chitosan (CTS) trong 40ml dung dịch ethanol 95% (1/8, v/v), sau đó bổ sung acetic acid theo các tỷ lệ (acid/CTS, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1), khuấy đảo 2 giờ, sau đó sấy khô chân không. Kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng hòa tan trong nước của muối CTS acetate phụ thuộc tỷ lệ số mol của acetic acid đến hàm lượng glucosamine của chitosan. Tỷ lệ số mol thay đổi từ 1,0 đến 5,0 cho thấy độ hòa tan tăng, tuy nhiên độ hấp thụ giảm. Các tác giả giải thích do cường độ ion của acid dư trong muối có thể gây hiện tượng này. Như vậy, khi cường độ ion đạt đến một mức độ nhất định sẽ thu được CTS acetate có độ hòa tan cao [119]. Ngoài ra, sản phẩm muối thu được ổn định sau 3 tháng bảo quản, trong khi trong cùng một điều kiện bảo quản thì dung dịch chitosan pha trong acid sẽ không ổn định độ nhớt [119, 140].

Bảng 1.3. Phương pháp điều chế một số muối chitosan

Phương pháp	Sản phẩm muối chitosan	Tài liệu tham khảo
Phản ứng rắn – lỏng	CTS acetate	[119]
	CTS/ascorbic acid, CTS/p-amino benzoic acid, CTS/p-nitro benzoic acid	[173]
	N, N, N-trimethylchitosan; N-butylN, N-dimethylchitosan; N-octyl-N, N-dimethylchitosan; N-dodecyl-N, N-dimethylchitosan	[47]
Phản ứng rắn – khí	Muối chitosan HCl khối lượng phân tử thấp	[130]
Phản ứng hòa tan trong dịch	CTS valerate, CTS butyrate, CTS acetate, CTS formate	[76]
	CTS adipate; CTS succinate; CTS fumarate	[198]
	CTS acetate, CTS lactate, CTS citrate	[56]
	CTS lactate	[116]; [37]

Một số sản phẩm khác được gọi là dẫn xuất muối acid-chitosan được tạo thành khi ngâm chitosan trong các acid hữu cơ (0,9 g ascorbic acid, 0,9g p-amino benzoic acid và 0,5g p-nitro benzoic acid) đã được hòa tan trong hỗn hợp dung môi gồm 5ml cồn isopropyl và 1 ml nước (bổ sung nước để tăng hằng số điện môi của rượu isopropyl). Khuấy hỗn hợp từ từ ở nhiệt độ phòng cho đều, rồi giữ ở nhiệt độ ở 0°C trong một thời gian phản ứng nhất định khoảng 72 – 82 giờ. Sau đó được rửa bằng hỗn hợp dung môi cồn isopropyl/nước để loại acid dư và thu các tinh thể muối acid-chitosan gồm CTS/ascorbic acid, CTS/p-amino benzoic acid, CTS/p-nitro benzoic acid. Nghiên cứu này minh chứng rằng các dẫn xuất muối của chitosan có cấu trúc xoắn ốc thứ cấp và có thể hòa tan trong một phạm vi pH rộng, mở ra triển vọng mới cho ứng dụng y sinh của vật liệu chitosan [173].

Một phương pháp khác của phản ứng rắn – lỏng là chuyển CTS thành các dẫn xuất alkyl hóa của nó, sau đó mới tạo muối bậc 4, tuy nhiên nghiên cứu này cũng đánh giá ứng dụng của muối CTS không được alkyl hóa sẽ tạo màng bao bọc bảo quản thực phẩm tốt hơn muối CTS đã được alkyl hóa. Thông qua quá trình alkyl hóa chitosan bằng cách phản ứng chitosan với các aldehyde thích hợp, sau đó khử bằng sodium cyanohydroborate tạo các dẫn xuất N-butylchitosan, N-octylchitosan và N-dodecylchitosan. Các dẫn xuất alkyl chitosan được tạo màng có tính chất dẻo hơn nhưng lại kém bền hơn chitosan. Nhưng khi

chuyển hóa chúng thành muối thì các dẫn xuất có thể tan được trong nước. Từ đó chitosan và các dẫn xuất alkyl hóa của nó tiếp tục cho phản ứng tổng hợp với dimethylsulfate trong môi trường kiềm để tạo muối bậc 4 tương ứng gồm (1) N, N, N-trimethylchitosan, (2) N-butyl-N, N-dimethylchitosan, (3) N-octyl-N, N-dimethylchitosan, và (4) N-dodecyl-N, N-dimethylchitosan [47].

b. Phản ứng chitosan với hơi acid

Phương pháp phản ứng rắn – khí cần dùng các thiết bị công nghệ cao và cần kiểm soát vận hành thiết bị chặt chẽ các thông số kỹ thuật. Ngoài ra, đối với phương pháp rắn – khí đòi hỏi chất lượng của CTS nguyên liệu phải đồng đều về kích thước nhỏ mịn (khoảng 80 mesh size) và có khối lượng phân tử thấp. Hơn nữa, chất lượng của sản phẩm muối còn phụ thuộc vào các loại acid có khả năng hóa hơi mạnh. Ví dụ như nghiên cứu của Minh và cộng sự [130] đã dùng HCl 37% để phản ứng tạo muối chitosan có khối lượng phân tử thấp, ở 4°C trong 3 giờ.

c. Hòa tan chitosan trong môi trường acid

Các sản phẩm muối điều chế bằng cách hòa tan CTS trong acid và sấy phun được sử dụng phổ biến hiện nay, tuy nhiên giá thành rất cao vì cần được đầu tư thiết bị công nghệ cao. Hơn nữa, phương pháp này có hạn chế trong việc kiểm soát lượng acid dư sau khi phản ứng với chitosan nên màu của sản phẩm thường bị vàng hoặc phải dùng một lượng dung môi lớn và độc hại trên thiết bị chuyên dụng để rửa.

Phương pháp tạo muối bằng cách hòa tan hoàn toàn chitosan trong các dung dịch acid để tạo ra các muối sau khi phân tử chitosan được gắn gốc acid tương ứng như CTS acetate, CTS lactate, CTS citrate... Đầu tiên, pha dung dịch CTS 4% (w/w) bằng cách hòa tan bột chitosan trong các loại acid 10% (w/w) khác nhau, với tỷ lệ 1:24 (CTS/acid). Tiến hành khuấy liên tục đến khi chitosan tan hoàn toàn trong 24 giờ, sau đó lọc và sấy phun [56]. Nghiên cứu của Wojtasz-Pajak (2010) [198] ngâm chitosan trong nước khử ion nóng và bổ sung acid dicarboxylic (adipic acid, succinic acid, fumaric acid) với tỷ lệ mol acid/nhóm amin là 1/2, nồng độ muối cuối cùng là 2,5%, khuấy trong 240 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó sấy đông khô, rồi nghiền nhỏ kích thước. Tương tự, chitosan lactate được tạo thành khi hòa tan 0,8g chitosan trong 40 ml dung dịch lactic acid được phân tán trong môi trường nước khử ion với tỷ lệ 1/80 (acid/nước khử ion). Hỗn hợp được khuấy qua đêm ở 70°C và thu được dung dịch trong màu vàng nhạt. Sau đó lọc thẩm tích qua cột cellulose liên mạch (MWCO-14000, kích thước lỗ 50Å) để loại bỏ lactic acid dư thừa trong 3 ngày. Dung dịch hỗn hợp sau lọc được đặt trong tủ đông -78°C trong 24 giờ và được sấy đông khô trong 48 giờ thu được bột chitosan lactate màu vàng nhạt và mịn [116]. Hoặc một số sản phẩm muối ở dạng màng (CTS valerate, CTS butyrate, CTS acetate, CTS formate) được tạo thành khi cho chitosan hòa tan trong acid với một lượng cân bằng để

tạo dung dịch muối. Màng muối chitosan thu được bằng cách phết dung dịch muối chitosan lên các lam kính hiển vi và làm khô chúng trong môi trường khí thông thoáng hoặc trong chân không ở 70°C [76]. Cách này cũng được Bhattarai và cộng sự (2006) [37] nghiên cứu tạo màng sau khi hòa tan CTS 2% (w/w) trong lactic acid qua đêm, đổ đĩa petri làm khô ở 70°C trong 5 giờ và sấy chân không ở 80 – 90°C trong 5 giờ, sau đó sử dụng thiết bị Soxhlet để rửa bằng chloroform và methanol trong 48 giờ.

Như vậy, chitosan là một polyme tự nhiên chứa nhiều nhóm amin bậc I (-NH₂) và có nhiều tính chất ưu việt như tính tương thích sinh học cao, không độc hại, khả năng kháng khuẩn, kháng nấm. Do đó, chitosan đã được nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Tuy nhiên, do đặc tính ít tan trong nước nên đã hạn chế các ứng dụng của chitosan, từ đó các muối của chitosan có các gốc vô cơ (Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻...) hoặc các gốc hữu cơ (HCOO⁻, CH₃COO⁻...) đã được nghiên cứu. Đa số các muối này được tạo ra ở trạng thái lỏng khi chitosan tương tác với gốc acid trong môi trường nước. Sau đó, muối thu được bằng cách kết tủa và rửa bằng cồn. Muối chitosan HCl cũng có thể thu được khi chitosan dạng rắn tác dụng với hơi HCl. Mặc dù, các sản phẩm thu được với hiệu suất khá cao với phương pháp chế tạo khá dễ dàng. Tuy nhiên, sản phẩm thu được thường có độ đồng đều chưa cao, chi phí đầu tư thiết bị cao và vận hành khó. Ngoài ra, sản phẩm muối chitosan thu được lại chứa một lượng nhỏ gốc acid có hoạt tính mạnh (Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, HCOO⁻...) có thể gây hại đến sức khỏe vật nuôi hay con người. Các muối an toàn khi sử dụng (như chitosan acetate, chitosan citrate...) nhưng lại mùi chua gây ảnh hưởng đến cảm quan của thực phẩm. Gần đây, muối chitosan lactate được đánh giá là chất keo tụ tốt hơn so với chitosan acetate khi ứng dụng làm trong nước quả hoặc xử lý chất thải trong quá trình chế biến cá. Do vậy, nghiên cứu điều chế muối chitosan lactate có độ đồng đều cao bằng phương pháp đơn giản để mở rộng ứng dụng là cần thiết.

1.4. Vi tảo biển

1.4.1. Nguồn lợi và vai trò của vi tảo biển trong nuôi trồng thủy sản

Có khoảng 100.000 loại vi tảo khác nhau được phát hiện, ở đại dương, các sông, ao, hồ nước ngọt. Hiện nay, các nhà nghiên cứu đã phân lập và nuôi cấy được trên 40 loài vi tảo. Nguồn vi tảo chứa rất nhiều hoạt chất sinh học tiềm năng có lợi đối với sức khỏe con người. Một số loại vi tảo được nuôi và sử dụng phổ biến làm thức ăn cho động vật thủy sản. Sinh khối vi tảo còn là nguồn để sản xuất nhiên liệu sinh học bền vững. Vi tảo là loài sinh vật đơn bào có chứa chất diệp lục, tạo ra oxy (O₂) và cố định carbon dioxide (CO₂) từ khí quyển thông qua quá trình quang hợp [135, 166, 183]. Tại Việt Nam, ngành nuôi vi tảo (*Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp., *Thalassiosira* sp., *Skeletonema* sp., *Chaetoceros* sp.) đang phát triển rộng rãi, sử dụng chúng làm thức ăn nuôi trồng thủy sản.

1.4.1.1. Nguồn lợi và đặc điểm sinh học của vi tảo *Nannochloropsis* sp.

Ở Việt Nam, sinh khối vi tảo *Nannochloropsis oculata* đã được nghiên cứu và nuôi thành công bằng nhiều kỹ thuật khác nhau ở trong nhà hoặc ngoài trời, gồm kỹ thuật nuôi trong túi nylon, bể composite hoặc bể xi măng và hệ thống ống dẫn trong suốt nước chảy liên tục [8, 18]. *Nannochloropsis* sp. là loài vi tảo có điều kiện sống rộng: môi trường nhiệt độ từ 0°C đến trên 30°C, độ pH khoảng 8, độ mặn từ 15 – 30 ppm, cường độ ánh sáng lớn hơn 12 klux và được phân bố rộng trên thế giới, có mặt ở thủy vực nước mặn, nước lợ và nước ngọt [86].

Loài tảo *Nannochloropsis* sp. được Droop (1955) [81] mô tả đầu tiên với hình thái đơn giản, thuộc lớp tảo lục Chlorophyceae [81]. Giai đoạn năm 1975 - 1981, các nhà khoa học đã nghiên cứu sâu về cấu trúc tế bào cho thấy chúng có hình dạng tương thích với lớp Eustigmatophyceae hơn là lớp Chlorophyceae và được xếp vào chi *Nannochloropsis* [28, 101]. Thời điểm này, hệ thống phân loại của tảo *Nannochloropsis* sp. như sau:

Giới: Chromista

Ngành: Heterokontophyta

Lớp: Eustigmatophyceae

Bộ: Eustigmatales

Họ: Monodopsidaceae

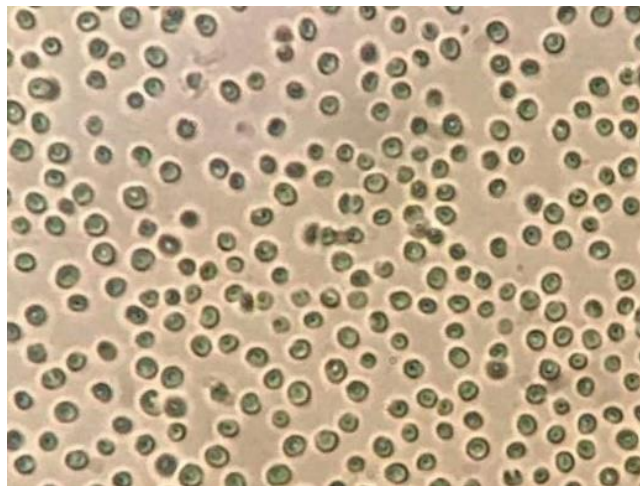
Chi: *Nannochloropsis*

Loài: *Nannochloropsis* sp.

Năm 2007, Yu và cộng sự đã xác định một loài *Nannochloropsis* Z-1 được phân lập từ một trang trại nuôi tôm ở Hải Nam, Trung Quốc và xác định đây là loài *Chlorella* (một thuộc họ Lục tảo) dựa trên thành phần acid béo, siêu cấu trúc và trình tự của rDNA 18S. Nghiên cứu này kết luận loài tảo *Nannochloropsis* Z-1 không nên phân vào lớp *Eustigmatophyceae* và không đặt trong chi *Nannochloropsis* mà là loài *Chlorella* sp. Nhưng cần xem xét lại khi Fawley và cộng sự (2015) [87] minh chứng một loài tảo gốc lấy mẫu ở Nhật gọi là marine *Chlorella* (*Chlorella* biển) được nhận diện là *Nannochloropsis oceanica*. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Maruyama (1986) [123], marine *Chlorella* xác định dựa trên bằng chứng về siêu cấu trúc và hóa sinh là *Nannochloropsis oculata*, một thành viên của họ Eustigmatophyceae [87, 123, 204]. Vậy nên, vấn đề phân loại loài vi tảo biển *Nannochloropsis* sp. chưa được xác định rõ ràng và còn đang tranh cãi do chúng có khả năng biến đổi ở cấp độ bộ gel mặc dù chúng vẫn được xếp vào chủng *Nannochloropsis* do có trình tự rDNA 18S giống hệt nhau. Một số chủng loài *Nannochloropsis* hiện có trên thị trường nuôi cấy hoặc dưới dạng bổ sung

trong công thức chế biến cho nuôi trồng thủy sản như *N. oculata* (Droop), *N. salina*, *N. gaditana*, *N. oceanica*, *N. granulate* và một loài nước ngọt *N. limnetica* [87].

Dựa vào phân tích siêu cấu trúc và hóa sinh, *Nannochloropsis* sp. (Hình 1.8) có cấu trúc gồm một nhân và chứa một thể sắc tố (Chloroplast) hình trứng hoặc hình chén được bao bọc bởi hai lớp màng kép. Lớp màng ngoài dính liền với màng nhân tế bào. Thể sắc tố (lục lạp) trong tế bào vi tảo *Nannochloropsis* sp. có nhiều bản sắc (lamella), mỗi bản gồm 3 phiến sắc tố (thylakoids) xếp song song và không có đai nối giữa các phiến sắc tố. Sắc tố quang hợp ở *Nannochloropsis* sp. chỉ tìm thấy lượng chlorophyll-a đáng kể và không thấy sắc tố chlorophyll-b và c. Ngoài ra, nó còn chứa một lượng các sắc tố carotenoid khá cao gồm chủ yếu là astaxanthin, zeaxanthin và canthaxanthin [118, 122, 123].



Hình 1.8. Tế bào vi tảo *Nannochloropsis* sp. (vật kính 100x).

Nannochloropsis sp. tồn tại ở dạng đơn bào, tế bào hình cầu đến hơi hình trứng. Vi tảo này không có khả năng di động, đường kính khoảng 2 – 4 μm , trọng lượng tế bào chỉ nhỏ khoảng 6,1 pg/tb. Tế bào của *Nannochloropsis* sp. có một thể sắc tố (Chloroplast) hình trứng chiếm dung lượng khá lớn [101, 118]. Một loài tảo *Nannochloropsis* Z-1 mới được xác định là vi tảo *Chlorella* có hình cầu, đường kính đo bằng 1 – 6 μm và được bao bọc trong các lớp vỏ dày khoảng 0,04 μm , có chứa một số ti thể nhỏ và không có không bào [204].

1.4.1.2. Vai của vi tảo *Nannochloropsis* sp. trong nuôi trồng thủy sản

Sinh khối vi tảo chứa đầy đủ các thành phần dinh dưỡng cơ bản khác nhau (tính theo trọng lượng khô) tùy thuộc vào loài, gồm carbohydrate (5 – 30%), protein (10 – 40%), lipid (10 – 30%) và khoáng chất. Đây là nguồn cung cấp dinh dưỡng tiềm năng, được đánh giá rất cao nhờ chứa rất nhiều các hoạt chất sinh học gồm chất chống oxy hóa (polyphenol, polysaccharide, tocopherol và các hợp chất phenolic, vitamin C, acid amin, acid béo...) và các sắc tố (carotenoid, chlorophyll, phycobilin...). Các hoạt chất

này có đặc tính kháng khuẩn, kháng virus, kháng nấm, chống viêm và chống khối u. Các muối khoáng thiết yếu được xác định ở các loài vi tảo gồm Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ..., một số loài tồn tại kim loại nặng nhưng không đáng kể. Ngoài ra, vi tảo cũng chứa đầy đủ hàm lượng các acid béo không no khá cao và các acid amin cần thiết cho cơ thể [28, 50, 166, 183, 194]. Tuy nhiên, thành phần dinh dưỡng của bất kỳ loài vi tảo nào phụ thuộc vào kích thước tế bào, khả năng tiêu hóa và tổng hợp các thành phần sinh hóa, chu kỳ sinh trưởng và phát triển của vi tảo, môi trường sống... [83]. Mặc dù có sự khác biệt rất lớn giữa các loài vi tảo về thành phần dinh dưỡng, nhưng kết luận chung thành phần hữu cơ chủ yếu theo thứ tự là protein, lipid, carbohydrate. Tính theo trọng lượng khô thì hàm lượng protein khoảng 12 – 35%, lipid khoảng 7,2 – 23% và carbohydrate là 4,6 – 23%. Hàm lượng acid béo không bão hòa cao (HUFA), đặc biệt là eicosapentaenoic acid (20: 5n-3, EPA), arachidonic acid (20: 4n-6, ARA) và docosahexaenoic acid (22: 6n-3, DHA), có tầm quan trọng lớn trong việc đánh giá thành phần dinh dưỡng của một loài tảo được sử dụng làm thức ăn cho các sinh vật biển [49, 118]. Riêng đối với loài vi tảo *Nannochloropsis* được nuôi dưới sự chiếu sáng liên tục thì thành phần chính của sinh khối được xác định chứa khoảng 37,6 % carbohydrate, 28,8% protein, 18,4% lipid và 9% khoáng [155]. Một nghiên cứu khác của [50] thì loài *Nannochloropsis* CS-246 thử nghiệm nuôi cho hầu ăn thì các thành phần chất dinh dưỡng có khác gồm 23% carbohydrate, 17% protein, 26% lipid, 16% khoáng. Trong đó, khoáng chất chứa nhiều muối khoáng thiết yếu cho cơ thể người như Ca (972 mg), K (533 mg), Na (659 mg), Mg (316 mg), Zn (103 mg), Fe (136 mg), Mn (3,4 mg), Cu (35,0 mg), Ni (0,22 mg) và Co (<0,1 mg) tính trong 100g sinh khối khô và hàm lượng kim loại nặng (Cd, Pb) thì không đáng kể [50].

Bên cạnh đó, nhiều hoạt chất sinh học cũng được đánh giá như chlorophylls, carotenoids, vitamin, acid amin, acid béo... Tảo *N. oculata* chứa một lượng sắc tố carotenoid đáng kể gồm violaxanthin (55-58%), vaucheriaxanthin (25-32%), carotene (3-10%), neoxanthin (0-1%), keto-carotenoids (4-5%) ... Tảo *N. gaditana* đạt mật độ tế bào khoảng 10^9 tế bào/mL thì hàm lượng các sắc tố xác định được là chlorophyll-a (350 mg/L), violaxanthin (50 mg/L), canthaxanthin (5 mg/L), astaxanthin (3 mg/L), trong đó hàm lượng canthaxanthin và astaxanthin chiếm 0,7% tính trên trọng lượng khô. Hàm lượng vitamin E (α -tocopherol) có ở tảo *Nannochloropsis* sp. được đánh giá là cao hơn nhiều lần so với các loài tảo khác (*Euglena gracilis*, *Dunaliella salina* và *Tetraselmis suecica*). Hàm lượng vitamin C và riboflavin tính trên trọng lượng khô trong vi tảo đạt lần lượt là 8 (mg/g) và 50 (mg/g) [28, 50, 122, 183]. *Nannochloropsis* có khả năng tích lũy hàm lượng acid béo không no cao với nhiều loại acid béo đa nối đôi không bão hòa, trong đó acid béo thuộc nhóm eicosapentaenoic (20:5n-3, EPA) chứa khoảng 24,5 – 40% so với tổng hàm lượng các acid

béo. Ngoài ra, *Nannochloropsis* còn chứa đầy đủ 19 loại acid amin cần thiết cho cơ thể động vật [48, 49, 194].

1.4.1.3. Ứng dụng sinh khối vi tảo trong nuôi trồng thủy sản

Vi tảo là sinh vật đơn bào có cấu trúc rất đơn giản gồm các thành phần chính như thành tế bào, không bào và nhân. Nhờ có cấu trúc đơn giản nên vi tảo có khả năng sinh trưởng và phát triển nhanh hơn các loài sinh vật có cấu trúc đa bào. Các loài vi tảo có khả năng quang hợp ở điều kiện ánh sáng (tia UV), sử dụng carbonic (CO_2) và khoáng vô cơ để tăng sinh trưởng. Do vậy, vi tảo có thể góp phần làm giảm lượng lớn CO_2 trong bối cảnh biến đổi khí hậu hiện nay. Bên cạnh đó, trong môi trường ánh sáng (400 – 700 nm) tế bào vi tảo có thể tập trung toàn bộ năng lượng để tổng hợp carbohydrate cho thành tế bào, protein cho nhân và lipid cho không bào. Vi tảo chứa hàm lượng vitamin và khoáng chất cao gồm vitamin A, C, B₂, B₆, niacin, iodine, potassium, iron, magnesium và calcium. Vì vậy, vi tảo có thể xem như là nguồn thức ăn giàu dinh dưỡng để hấp thu cho các ấu trùng nuôi thủy sản và cũng được xem là nguồn sinh học xử lý chất hữu cơ trong nước thải [10, 32, 52]. Một số loài tảo nước ngọt (*Chlorella*, *Spirulina*...) đã được công nhận là tiềm năng chứa nguồn protein cao, nhưng hiện nay các nhà khoa học quan tâm đến các loài vi tảo biển (*Nannochloropsis*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*...) hoặc loài tảo dị dưỡng (*Schizochytrium*) chứa rất nhiều hoạt chất như EPA (eicosapentaenoic acid, C20:5n-3), DHA (docosapentaenoic acid, C22:6n-3), PUFA (béo polyunsaturated acid), AA (arachidonic acid, C20:4n-6), ALA (alpha-linolenic acid, 18:3n-3)... [28, 50, 83, 155, 194]. Trong ngành dinh dưỡng động vật và nuôi trồng thủy sản, vi tảo ở dạng bột nhão dùng để bổ sung nguồn dinh dưỡng protein, chủ yếu làm thức ăn cho ấu trùng cá, tôm, động vật hai mảnh vỏ... Vi tảo *Nannochloropsis* và *Tetraselmis* thường được thu hoạch ở dạng khối đông khô hoặc dạng bột nhão, sử dụng làm thức ăn nuôi trồng thủy sản [150].

Ở Việt Nam, ngành nuôi trồng thủy sản phát triển mạnh và nhu cầu sử dụng vi tảo biển để thay thế các nguồn thức ăn công nghiệp càng cao, đặc biệt sử dụng trong sản xuất giống các loài thủy sản có giá trị cao như cá biển, động vật hai mảnh vỏ và giáp xác. Cụ thể hơn là chúng được sử dụng làm thức ăn tươi sống cho các loài nhuyễn thể hai mảnh vỏ ở các giai đoạn phát triển, các giai đoạn ấu trùng của hầu hết các loài tôm, cá biển và luân trùng. Đến nay, công nghệ nuôi vi tảo đang trên đà phát triển mạnh để đáp ứng nhu cầu sử dụng, nhưng kỹ thuật thu hoạch và lưu giữ vẫn còn hạn chế và chưa được ứng dụng thương mại hiệu quả. Trong đó loài vi tảo biển *Nannochloropsis* sp. được sử dụng nhiều do có kích thước nhỏ và chứa nguồn dinh dưỡng cao. Tuy nhiên, chủ yếu hiện nay chúng ta vẫn phải dùng sản phẩm vi tảo đậm đặc từ nguồn ngoại nhập hoặc dịch tảo loãng được vận chuyển hoặc bơm từ các ao trại nuôi vi tảo. Tế bào vi tảo *Nannochloropsis* sp. chứa

một hàm lượng EPA rất cao, chứa vitamin (ascorbic acid, vitamin B₁₂) và đầy đủ các loại acid amin cần thiết, đáp ứng nhu cầu phát triển của động vật thủy sản ở giai đoạn ấu trùng. Nó được dùng làm thức ăn sống chủ yếu cho nghề nuôi giống cá chêm và luân trùng [8, 18, 48, 183, 194]. Trong đó, các sắc tố được tổng hợp từ vi tảo có vai trò quan trọng đối với sức khỏe và năng suất nuôi trồng thủy sản, đặc biệt là giai đoạn ấu trùng của cá biển và giáp xác [143].

1.4.2. Phương pháp thu hoạch sinh khối vi tảo

Việc thu hồi sinh khối vi tảo và bảo quản vẫn còn trở ngại nên ngành kinh tế vi tảo chưa được phát triển mạnh. Vấn đề đáng kể đó là kích thước hạt vi tảo rất nhỏ (đường kính 3 – 30 μm /tế bào) và mật độ nuôi đạt được tương đối loãng ($< 0,5 \text{ kg/m}^3$ sinh khối khô trong một hệ thống sản xuất thương mại), trong khi nguyên vật liệu sử dụng trong công nghệ thu hoạch vi tảo thì quá cao. Ngoài ra, việc làm đặc vi tảo còn ảnh hưởng bởi tính kỵ nước của tế bào vi tảo, mật độ vi tảo, thành phần và độ mặn của môi trường dịch vi tảo [34]. Do đó, hiện nay vẫn chưa khẳng định phương pháp thu hoạch duy nhất nào có thể phù hợp cho tất cả các trường hợp. Một giải pháp khả thi mà những trại nuôi trồng thủy sản lớn là nuôi vi tảo tại chỗ khi đáp ứng điều kiện môi trường sống và sử dụng các hệ thống sản xuất hiệu quả nhất về chi phí. Kinh phí cho việc thu hồi vi tảo hiện nay được đánh giá khoảng 20 – 30% vào tổng chi phí sản xuất sinh khối vi tảo [95, 96, 201]. Tuy nhiên, nếu không đủ điều kiện nuôi vi tảo tại trại nuôi thủy sản thì việc ly tâm vi tảo thành dạng sệt hoặc kết hợp các phương pháp, sau đó lưu giữ lạnh và cung cấp cho các trại giống hầu đang được áp dụng rộng rãi ở các nước Bắc Mỹ và các nước trên thế giới [95, 118].

Hiện nay, đã có nhiều phương pháp thu nhận vi tảo như lắng trọng lực (gravity sedimentation), lọc (filtration), ly tâm (centrifugation), đông tụ/kết bông (coagulation/flocculation), tuyển nổi (flotation). Hầu hết các phương pháp thu hoạch tảo hiện nay đều có hạn chế về kinh tế hoặc kỹ thuật gồm chi phí năng lượng cao, độc tính của các chất hóa học sử dụng hoặc không khả thi trong việc mở rộng quy mô sản xuất [95, 115, 201].

1.4.3.1. Phương pháp ly tâm

Nguyên lý: Sử dụng lực ly tâm để tách vi tảo dạng rắn từ hỗn hợp sinh khối dạng huyền phù.

Ưu và nhược điểm: Có thể áp dụng ở quy mô công nghiệp và có thể thu hồi hầu hết các loại vi tảo và nhanh chóng với số lượng sinh khối tảo lớn. Sản phẩm không bị nhiễm bẩn do không cần đưa tác nhân nào vào. Tuy nhiên, môi trường dịch vi tảo ở nhiệt độ cao hoặc do lực ly tâm mạnh có thể gây hỏng cấu trúc tế bào vi tảo, ảnh hưởng đến chất lượng của sinh khối và gây chết. Ngoài ra, chi phí thiết bị đắt tiền và tiêu tốn năng lượng lớn [64, 95, 118, 137, 149].

1.4.3.2. Phương pháp lọc

Nguyên lý: Dựa trên quá trình phân riêng vi tảo dạng rắn từ hỗn hợp sinh khối dạng huyền phù qua lớp vật liệu lọc (màng lọc).

Ưu và nhược điểm: Phương pháp này đơn giản và phổ biến, ít gây vỡ tế bào vi tảo, không tốn nhiều kinh phí máy móc thiết bị. Tuy nhiên, thời gian thu hồi lâu và phù hợp để thu nhận sinh khối tảo đơn bào có kích thước lớn, hiệu suất thu hồi thấp và dễ bị tắc nghẽn màng lọc. Một số nghiên cứu sử dụng màng siêu lọc để tăng hiệu suất thu hồi nhưng chi phí màng lọc cao và đòi hỏi tiêu tốn thêm năng lượng [36, 44, 95, 145, 164].

1.4.3.3. Phương pháp lắng

Nguyên lý: Dựa trên lực hấp dẫn (trọng lực) của các vi tảo rắn trong dung dịch khiến chúng bị tách ra khỏi chất lỏng và lắng xuống sau một thời gian nhất định.

Ưu và nhược điểm: có thể được áp dụng dễ dàng, đơn giản về thiết bị và vận hành nên chi phí đầu tư thấp. Tuy nhiên, phương pháp không được sử dụng rộng rãi do thời gian lắng quá lâu do tốc độ lắng rất chậm (0,1 – 2,6 cm/h), hiệu quả thu hồi sinh khối thấp (khoảng 60 – 65%), tập trung chủ yếu là các tế bào lão hóa [64, 95, 125, 176, 189, 192, 195].

1.4.3.4. Phương pháp tuyển nổi

Nguyên lý: Sử dụng các chất keo tụ đa hóa trị để tạo tủa các vi tảo, đồng thời áp dụng bơm khí nén ở áp suất thấp để tạo bong bóng trong nước nhằm lôi cuốn các tủa keo tụ bám dính và nổi lên trên bề mặt nước, sau đó được gạt để thu vi tảo.

Ưu và nhược điểm: Đây là phương pháp được đánh giá là hiệu quả hứa hẹn hơn về chi phí trong công nghệ thu hoạch vi tảo hiện nay [135, 201]. Tuy nhiên, hầu hết các loài vi tảo đều mang điện tích âm ở các giá trị pH tự nhiên, có tính kỵ nước bề mặt thấp và kích thước hạt bé, cũng như có chứa thành phần các chất hữu cơ hòa tan ưa nước trong môi trường nên khó thu hoạch bằng phương pháp tuyển nổi [188, 201]. Để tăng hiệu suất thu sinh khối vi tảo có thể sử dụng ion dương để làm thay đổi bề mặt vi tảo, tăng tính kỵ nước của các tế bào vi tảo. Tuy nhiên, phương pháp này vẫn có thể tồn tại dư lượng kim loại nặng, ảnh hưởng đến sức khỏe động vật thủy sản nuôi. Do vậy, phương pháp tuyển nổi có kết hợp các hợp chất đông tụ/keo tụ cũng có nhiều nhược điểm như chi phí cho thiết bị cao và tạp nhiễm kim loại nặng.

1.4.3.5. Phương pháp keo tụ

Nguyên lý: Tế bào vi tảo mang điện tích âm nên xảy ra hiện tượng ngăn cản quá trình kết bông của các tế bào ở trạng thái huyền phù. Do đó, điện tích bề mặt tảo có thể được trung hòa hoặc giảm bằng cách sử dụng các chất keo tụ như cation đa hóa trị và polyme cation [95]. Dựa trên nguyên lý phá vỡ lực đẩy tĩnh điện giữa các tế bào vi tảo bằng cách

dùng các polyme tích điện dương hoặc các ion mang cực dương liên kết Van der Waals với các tế bào vi tảo làm chúng keo tụ lại, nặng và lắng xuống đáy [51, 149, 158].

Ưu và nhược điểm: Phương pháp này không phải tốn nhiều tiền đầu tư thiết bị, thao tác đơn giản mà có thể thu hoạch sinh khối với số lượng lớn và có thể kéo dài thời gian bảo quản sau khi làm đặc. Hiệu quả nhất là chọn chất keo tụ phải rẻ tiền, không độc hại và hiệu quả ở nồng độ thấp [95, 113, 189, 201]. Tuy nhiên, phương pháp này thường được kết hợp với phương pháp lắng hoặc lọc hoặc tuyển nổi để làm đặc sinh khối [77, 78, 201]. Các nghiên cứu này khuyến khích người nuôi tảo áp dụng vì có thể lưu trữ sản lượng dư thừa và trái vụ [118].

Chất keo tụ/trợ lắng: Có hai loại chất trợ lắng gồm chất vô cơ và hữu cơ. Các chất trợ lắng vô cơ là các hợp chất có chứa kim loại như NaOH, KOH, PAC (polyaluminum chloride) hoặc các loại muối kim loại đa hóa trị như FeCl_3 , $(\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3)$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ được sử dụng phổ biến để lắng thu hồi vi tảo do có thể đạt hiệu suất lắng cao (> 80%) mà chi phí lại thấp. Hiệu suất của chất điện phân gây keo tụ của các ion kim loại tăng khi điện tích ion tăng dần. Tuy nhiên, sử dụng các hợp chất tạo lắng này phải có biện pháp loại bỏ các ion kim loại sau khi lắng nhưng rất khó xử lý. Môi trường nuôi tồn tại các dư lượng kim loại nặng có thể gây độc hoặc gây mất cân bằng nồng độ thẩm thấu cho các đối tượng thủy sản nuôi, gây đột biến và giảm tuổi thọ động vật thủy sản. Điều này ảnh hưởng đến khả năng ứng dụng sinh khối thu được [51, 95, 103, 112, 134, 141]. Chen và cộng sự (2013) [61] đã nghiên cứu cho thấy khi dùng $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ đạt 0,3 g/L thì màu môi trường nuôi chuyển sang màu trắng đục và FeCl_3 đạt 0,2 g/L thì nước ao nuôi chuyển màu cam, đồng thời xuất hiện lớp cặn lắng đáy [61]. Chất trợ lắng hữu cơ được phân ra hai loại: (1) chất trợ lắng polyme hữu cơ polyacrylamide tổng hợp (acrylamit, acrylic acid ...) và (2) chất trợ lắng polyme sinh học tự nhiên (carrageenans, alginate, chitosan, tinh bột...). Trong đó, các polyme sinh học được khuyến khích sử dụng do chúng không gây độc hại cho sản phẩm sinh khối sau thu hoạch và môi trường, ngược lại các polyacrylamide tổng hợp gây độc hại cho vật nuôi khi tồn tại trong sinh khối vi tảo [45, 149]. Nghiên cứu của Beach và cộng sự (2012) [35] kết luận rằng phương pháp kết tủa vi tảo bằng chitosan ít tác động nguy hại đến môi trường nhất do tiêu thụ năng lượng cao so với phương pháp sử dụng keo tụ bằng Ferric sulfate hay phương pháp ly tâm (không dùng hóa chất) hay phương pháp lọc kết hợp dùng polyethylene [35].

Trong vài thập kỷ gần đây, polyme (polyelectrolytes) đã được đưa vào áp dụng như một chất keo tụ và được đánh giá cao trong việc thu hoạch vi tảo. Các polyelectrolytes này là (1) cationic viz: chitosan, inulin, diallyldimethylammonium clorua (DADMAC), ethyleneimine, polyme polyethyleneimine (PEI), vinylamine..., (2) anionic viz: acrylamido 2-metyl propan sulfonic acid (AAMPSA), alginat, pectin,

polyacrylamit, polystyren sulfonic acid (PSSA)..., (3) non-ionic viz: poly-glutamic acid (PGA) và các chất ampholyte như amylopectin chứa cả cacboxylat và amin [181, 190]. Low và Toledo (2015) [121] đã nghiên cứu thu hoạch vi tảo *Nannochloropsis oculata* bằng chất keo tụ 0,05% Floccotac Plus (polyacrylamide anion), sau đó điều chỉnh pH 10,2 – 10,4, để lắng sau 15 – 20 phút thu được 90% bông sinh khối. Tuy nhiên gần đây, các polyme cation được quan tâm nghiên cứu mang lại hiệu quả cao. Phương pháp keo tụ bằng polyme cation có thể tiết kiệm chi phí, không độc hại và hiệu quả hơn các phương pháp khác. Tuy nhiên, một số chất keo tụ sinh học đòi hỏi sử dụng với liều lượng cao để keo tụ sinh khối, nên hạn chế trong việc ứng dụng chúng trong sản xuất quy mô lớn [41, 95, 107, 196]. Ngoài việc làm giảm hoặc trung hòa điện tích bề mặt trên tế bào, chất keo tụ polyme có thể liên kết các hạt lại với nhau bằng các liên kết bắc cầu. Polyme cation đã được chứng minh sử dụng trong khoảng nồng độ từ 1 – 10 mg/ml có thể tạo tủa bông đối với các loài vi tảo nước ngọt, nhưng đối với các loài vi tảo biển ở môi trường nước biển có độ mặn cao (37 kg/m³) sẽ gây ức chế quá trình keo tụ khi sử dụng các polyelectrolytes (< 5 kg/m³) do cường độ ion quá cao. Khi đó, các polyme cation có xu hướng gấp chặt lại và không thể liên kết với các tế bào vi tảo [38, 95, 149, 180, 181]. Hiệu quả keo tụ của các polyelectrolytes phụ thuộc vào nhiều yếu tố gồm khối lượng phân tử của polyme, mật độ điện tích trên phân tử, liều lượng sử dụng, nồng độ sinh khối, cường độ ion và độ pH của môi trường dịch vi tảo, mức độ phân tán của chúng trong dung dịch. Kết quả nghiên cứu cho thấy polyelectrolytes có khối lượng phân tử cao (0,8 – 2 kDa) là chất có khả năng tạo cầu nối liên kết tốt hơn, tuy nhiên càng tăng khối lượng phân tử > 2 kDa sẽ không tăng hiệu quả keo tụ. Mật độ điện tích cao có xu hướng mở rộng phân tử polyme, cải thiện hiệu suất bắc cầu của polyme và tăng khả năng trung hòa điện tích trên bề mặt tế bào. Mật độ tế bào càng cao thì dễ dàng keo tụ do bởi khả năng gặp gỡ và tiếp xúc giữa các tế bào gần nhau. Sự kết hợp dùng cánh khuấy ở tốc độ thấp mang hiệu quả giúp cho các tế bào và chất keo tụ tiếp xúc và đến gần nhau, tuy nhiên lực cắt có thể gây phá vỡ các tủa bông tế bào [63, 95]. Đôi khi sự thay đổi giá trị pH của môi trường dịch vi tảo, quá trình keo tụ đạt được ở các giá trị pH trên diện rộng mà không cần bổ sung thêm các chất tạo lắng nào. Phương pháp này có thể thu khối bông vi tảo lên đến 95%, tuy nhiên có thể gây ra tác dụng phụ khi giá trị pH quá cao [95, 127]. Blanchemain và Grizeau (1999) [40] đã chứng minh cho thấy khi điều chỉnh môi trường dịch vi tảo lên đến pH 10,2 và hiệu suất lắng đạt 80% thì các tế bào đã ly giải và giải phóng các chất dinh dưỡng bên trong tế bào. Nhiều nghiên cứu cho thấy hiệu quả keo tụ tăng cao khi kết hợp phương pháp sử dụng chất keo tụ và điều chỉnh pH, tạo thành các bông sinh khối dễ dàng tách nước và giảm ưu nhược điểm cho mỗi phương pháp [95].

Chất keo tụ là những hợp chất sinh học tự nhiên được ưu tiên nghiên cứu trong thời gian gần đây và chitosan là một sự lựa chọn an toàn để thay thế các chất keo tụ vô cơ và hữu cơ tổng hợp. Chitosan là một chất tạo màng sinh học tự nhiên, mang điện tích dương, có nhiều đặc tính độc đáo như có khả năng phân hủy sinh học, tương thích sinh học, khả năng tái tạo và chấp nhận sinh thái, có hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, chống oxy hóa, có tính hấp thụ. Hiện nay, chitosan cũng được ứng dụng rộng rãi trong việc xử lý nước thải, kỹ thuật y sinh và chế biến thực phẩm... [60, 93, 183, 191]. Một số nghiên cứu ứng dụng chitosan để làm chất keo tụ, liều lượng chitosan sử dụng trong khoảng 5 – 200 mg/L tùy theo loài vi tảo khác nhau. Phương pháp keo tụ bằng chitosan cũng được đánh giá tiêu thụ ít năng lượng nhất so với phương pháp thu sinh khối bằng ly tâm và lọc [35, 79].

Trong ngành công nghiệp sản xuất sản phẩm sinh khối vi tảo, việc thu hoạch sinh khối tảo là một phương án hỗ trợ kinh tế hiệu quả và có ý nghĩa lớn (không thể thiếu), tuy nhiên thực tế quá trình khử nước trong thu hoạch vi tảo vẫn là khâu tốn nhiều năng lượng. Trong khi đó, phương pháp keo tụ đã được sử dụng rộng rãi do có nhiều ưu điểm như có thể thu hiệu suất cao cho nhiều loài tảo có kích thước khác nhau, ít tốn chi phí đầu tư thiết bị và nguyên vật liệu. Phương pháp keo tụ thường được áp dụng kết hợp để tăng kích thước và trọng lượng sinh khối tảo, sau đó dễ dàng kết hợp các phương pháp lắng cặn, lọc và ly tâm nhằm tăng hiệu quả và giảm nhược điểm của các phương pháp [74, 149, 188]. Ngoài ra, sự lựa chọn chất keo tụ phù hợp (polyme sinh học) có thể giúp cho tế bào vi tảo không bị ảnh hưởng bất lợi ở các công đoạn sau. Mỗi loại polyme hữu cơ khác nhau sẽ có phản ứng hóa học liên quan đến sự keo tụ sinh khối tảo khác nhau. Về mặt an toàn cho sản phẩm vi tảo sau thu hồi thì ưu tiên chọn polyme sinh học. Về mặt thương mại, chất keo tụ sinh học phù hợp được chọn là vừa có hiệu quả về chi phí và vừa đáp ứng hiệu quả thu hồi của từng loài vi tảo (khả năng kết tủa bông và khả năng phục hồi vi tảo). Trong đó, loại chất keo tụ không gây độc hại cho sản phẩm vi tảo sau thu hoạch được đánh giá là hiệu quả nhất về mặt chi phí công nghệ thu hồi sinh khối bền vững [82, 95, 149, 183].

1.4.3.6. Cơ chế kết bông vi tảo bằng polyme sinh học

Đến nay, keo tụ tự nhiên là một giải pháp thay thế ưu tiên các phương pháp đang được áp dụng hiện nay, nhằm hạn chế sự hư hỏng tế bào vi tảo, không ô nhiễm sinh khối sau thu hoạch và có thể tái phục hồi vi tảo còn sót trong nước loại. Đã có hai cơ chế keo tụ tự nhiên được xác định, gồm keo tụ tự động (quá trình keo tụ được kích hoạt bởi một phân tử hoặc kết tủa hình thành tự nhiên trong môi trường nuôi) và sự kết tụ sinh học (trong đó một phân tử được tạo ra bởi các tế bào có trong môi trường nuôi). Nhưng đối với cả quá trình keo tụ tự động hay keo tụ sinh học đều được mô tả gồm các cơ chế: (i)

nén lớp điện tích kép, (ii) trung hòa điện tích, (iii) bắc cầu, (iv) cơ chế vá lỗi và (v) cơ chế quét. Tùy thuộc vào loài vi tảo và điều kiện nuôi cấy thì cơ chế này hay cơ chế khác diễn ra. Do vậy, hầu hết các nghiên cứu thu hồi sinh khối vi tảo bằng phương pháp keo tụ sinh học được giải thích cơ chế vẫn là giả thuyết [77, 78].

(i) Cơ chế nén của lớp kép điện tích

Khi có sự thay đổi pH môi trường, các điện tích bề mặt vi tảo bị thay đổi do các lực đẩy tĩnh điện giảm thông qua sự nén của lớp điện tích kép. Lớp kép điện tích liên quan đến nồng độ ion của dung dịch và điện tích bề mặt vi tảo, giá trị điện thế zeta của vi tảo phụ thuộc vào độ pH trong phạm vi từ 4 đến 10. Do đó, khi đưa pH của dịch về gần điểm không tích điện sẽ làm giảm lực đẩy tĩnh điện và thúc đẩy quá trình keo tụ nhờ lực hấp dẫn Van Der Waals; đồng thời khi cường độ ion của dung dịch tăng thì giá trị tuyệt đối thế zeta của vi tảo càng giảm do sự nén của lớp không liên kết. Hệ thống hai lớp này được hình thành khi một số ion tích điện dương có sẵn trong dung dịch bị hấp thụ bề mặt vi tảo có điện tích âm thông qua tương tác tĩnh điện để tạo thành một lớp dày đặc và một lớp khuếch tán được hình thành bởi những ion khác vẫn ở trong dung dịch. Lưu ý, cơ chế này không phải là trường hợp tự đông tụ hoặc quá trình keo tụ sinh học, vì các thay đổi dẫn đến quá trình keo tụ không xảy ra một cách tự nhiên.

(ii) Cơ chế trung hòa điện tích

Quá trình trung hòa điện tích diễn ra khi các điện tích âm của vi tảo bị giảm do các phân tử tích điện dương trong dịch hấp thụ trên bề mặt của chúng. Sự trung hòa điện tích này làm giảm lực đẩy tĩnh điện do lực hút Van Der Waals dẫn đến sự keo tụ của vi tảo. Cơ chế này phụ thuộc vào nồng độ chất keo tụ vì nó tỷ lệ thuận với điện tích bề mặt cần trung hòa điện tích. Do vậy, khi nồng độ chất keo tụ quá cao thì điện tích bề mặt của tế bào vi tảo có thể trở nên dương, dẫn đến sự tăng lực đẩy tĩnh điện trong dịch và ổn định huyền phù.

(iii) Cơ chế bắc cầu điện tích

Các polyme điện tích dương tương tác với tế bào vi tảo thông qua tương tác tĩnh điện và hấp thụ tại bề mặt của chúng. Khi nồng độ polyme thấp hay trung bình và chuỗi polyme có thể kéo dài trong dịch mà lực đẩy tế bào đang hoạt động thì các polyme sau khi hấp thụ vào các tế bào này sẽ tiếp tục hấp thụ các tế bào khác tạo nên cầu nối giữa các tế bào. Trong trường hợp này, hiệu quả của cơ chế phụ thuộc vào nồng độ, độ dài của mạch, khối lượng phân tử, điện tích của polyme và cường độ ion của môi trường dịch. Đối với vi tảo, cơ chế bắc cầu thông qua tương tác tĩnh điện, sự hấp thụ polyme lên bề mặt cũng có thể diễn ra thông qua liên kết hydro hoặc liên kết ion trong một điều kiện nhất định.

(iv) Cơ chế keo tụ vá

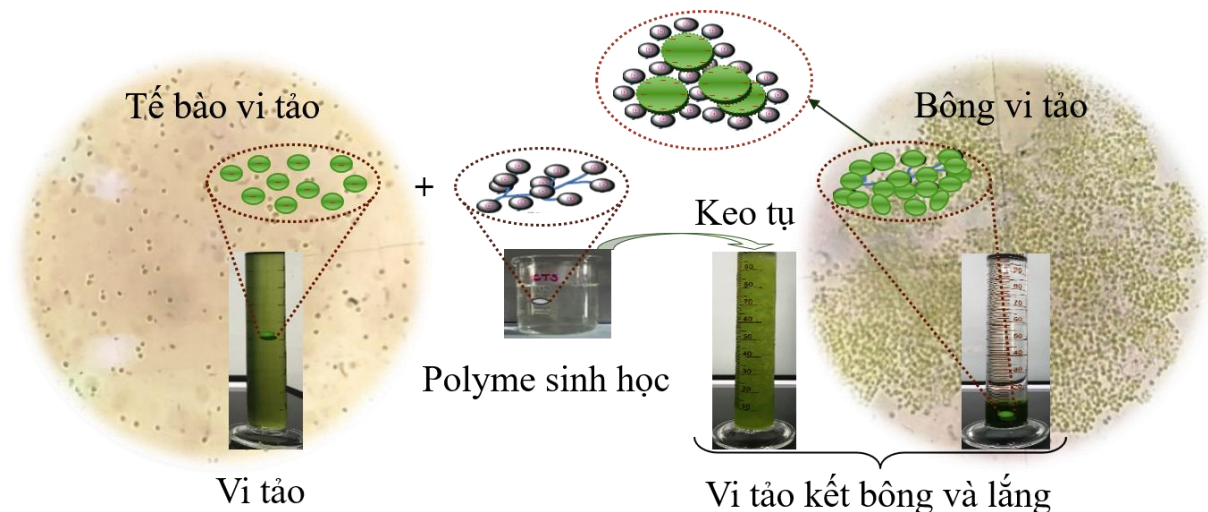
Cơ chế này liên quan đến các polyme ngắn tích điện dương hấp phụ ở bề mặt của

một tế bào tích điện âm và tạo ra sự phân bố điện tích không đều trên bề mặt của nó. Các mảng dương giữa các vùng của bề mặt polyme không được phủ có thể tương tác với các vùng tích điện âm trên bề mặt của vi tảo khác và kết nối chúng lại với nhau. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình keo tụ và là chiều dài của polyme (chỉ polyme mạch ngắn mới có thể tạo thành các mảng trên bề mặt của tế bào và điện tích của chúng).

(v) *Cơ chế keo tụ quét*

Khi khuấy trộn NaOH làm tăng pH (tăng các ion hydroxide (OH^-) trong dịch) dẫn đến kết tủa các ion Mg^{2+} , Ca^{2+} trong môi trường thành magnesium hydroxide và calcium hydroxide. Đây là sự bất cơ học của vi tảo trong cấu trúc không lồ của chất kết tủa vô cơ dẫn đến sự keo tụ của chúng.

Vậy, quá trình keo tụ vi tảo bằng polyme được thể hiện ở Hình 1.9, các tế bào có kích thước nhỏ (3 - 25 μm), tích điện âm và phân tán đều trong dịch tảo ở dạng huyền phù, lúc này môi trường dịch tảo cân bằng điện tích âm. Ngoài ra, thành tế bào vi tảo cũng được hình thành các điện tích âm bởi vi tảo chứa các thành phần chứa nhóm chức gồm cacboxylic (COOH) và amino ($-\text{NH}_2$). Do đó, khi có mặt các polyme mang điện tích dương sẽ gây mất ổn định điện tích ở bề mặt vi tảo khi hấp phụ polyme và trung hòa điện tích, tạo thành các khối bông bằng liên kết bắc cầu [149].



Hình 1.9. Quá trình kết bông vi tảo và cơ chế keo tụ polyme

Tế bào vi tảo tích điện âm trên bề mặt và có thế zeta âm, nên khi gặp các polyme cation mang điện tích dương như chitosan sẽ hấp phụ mạnh lên bề mặt vi tảo, làm suy yếu các lực đẩy tĩnh điện giữa các vi tảo và xảy ra hiện tượng trung hòa điện tích. Khi đó, các vi tảo kết bông vi tảo càng lớn, điện thế zeta của các tế bào vi tảo tích điện âm giảm và tiến về 0 ở một nồng độ chitosan nhất định. Xu hướng giảm điện tích bề mặt của tế bào vi tảo cùng với sự gia tăng nồng độ chitosan thể hiện quá trình trung hòa điện tích và chuỗi polyme đủ dài để có thể kết bông lớn (Hình 1.9). Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng nồng độ chitosan quá mức cần thiết thì xu hướng cho thấy thế zeta của tảo dương và hiệu suất thu hoạch vi tảo

không tăng đáng kể [77, 78, 201]. Lúc này, các tế bào có thể trở nên hoàn toàn mang điện tích dương sẽ làm ổn định lại huyền phù, hoặc sự kéo dài của mạch polyme trong dung dịch có thể tạo ra hiệu ứng steric ngăn cản quá trình keo tụ [77, 78]. Nghiên cứu khác giải thích cơ chế keo tụ của chitosan (100 mg/L) với vi tảo *N.oleoabundans* là sự biểu diễn hấp phụ polyme và sau đó là sự trung hòa điện tích giữa chitosan và tế bào vi tảo. Ở nồng độ chitosan cao hơn 100 mg/L thì thế zeta thể hiện cho thấy sự phục hồi của các chất keo và có tương quan với sự giảm tỷ lệ tách nước của vi tảo. Khi đó, bề mặt của các hạt vi tảo riêng lẻ được bao bọc hoàn toàn bởi chitosan nên không thể tiếp tục kết dính nhiều hạt thông qua liên kết bắc cầu. Ngoài ra, khi nồng độ chitosan trong dịch quá cao có thể xảy ra hiện tượng hấp phụ quá mức, gây ra các tương tác đẩy do vượt qua các tương tác hấp dẫn [35]. Nồng độ chitosan sử dụng keo tụ phụ thuộc vào loài vi tảo, mật độ vi tảo, tốc độ và thời gian khuấy đảo giúp cho chitosan tiếp xúc đều trong dịch tảo. Đối với loài tảo *Tetraselmis chui*, *Thalassiosira pseudonana*, *Isochrysis* sp., *Chaetoceros muellari* thì dùng chitosan từ nồng độ 40 – 150 mg/L, trong khi *Chlorella vulgaris* và *Microcystis* sp. trong môi trường nước thải chế biến cá phải dùng hơn 200 mg/L chitosan để thu hoạch vi tảo [95, 159].

Tuy nhiên, nghiên cứu của Sukenik và cộng sự (1988) [178] lưu ý rằng trong môi trường biển có độ mặn cao sẽ ảnh hưởng đến quá trình keo tụ vi tảo. Các polyelectrolyte bị ức chế trong môi trường nước biển và hiệu quả ở độ mặn dưới 5g/L. Vi tảo biển *Isochrysis galbana* và *Chlorella stigmatophora* cần liều lượng polyme hữu cơ sử dụng để tủa bông tảo cao gấp 5 – 10 lần so với vi tảo nước ngọt. Nghiên cứu của Lam và cộng sự (2016) [117] minh chứng cho thấy việc sử dụng chitosan keo tụ loài vi tảo nước ngọt có hiệu quả thu hoạch cao hơn loài vi tảo biển. Loài vi tảo *Nannochloropsis* cũng như các loài vi tảo biển khác cũng được cho là dùng chitosan ít hiệu quả hơn các loài vi tảo nước ngọt. Tuy nhiên, chitosan vẫn được đánh giá cao trong các nghiên cứu thu hoạch vi tảo do nó là polyme sinh học tự nhiên và an toàn khi sử dụng trong ngành công nghệ thực phẩm [65, 66, 117]. Các loài vi tảo nước ngọt thường được kết tủa ở pH thấp, còn các loài vi tảo nước mặn được kết tủa ở pH kiềm. Trong khi, pH của chitosan hòa tan trong môi trường acid hữu cơ tích điện dương khi pH dưới 6 và có điểm đẳng điện ở $pK_i = 6,5$. Nghĩa là, khi môi trường của chitosan ở pH cao sẽ trở thành dạng tủa gel, chitosan không tích điện nên không thể tương tác trung hòa điện tích giữa chitosan và bề mặt thành tế bào vi tảo [62]. Tuy nhiên, chitosan vẫn có thể phản ứng keo tụ ở pH cao trong môi trường nước biển do chitosan có tính chất duỗi thẳng mạch trong môi trường acid và co cuộn lại trong môi trường kiềm gây kết tủa. Các tủa chitosan tạo nhiều mạng lưới bẫy và bao bọc các tế bào vi tảo và hình thành khối bông tảo nhờ liên kết bắc cầu [43].

Nói chung, trên thực tế đã có rất nhiều phương pháp được nghiên cứu ứng dụng để thu hoạch sinh khối vi tảo trong công nghiệp sản xuất dầu sinh học như lắng, lọc chân

không, lọc áp lực, lọc dòng chảy chéo, ly tâm chồng đĩa, ly tâm gạn, tuyển nổi không khí phân tán, tuyển nổi không khí hòa tan, dao động chất lỏng, keo tụ vô cơ, keo tụ hữu cơ, keo tụ tự động, đông tụ điện tạo keo tụ sinh học, keo tụ điện phân và điện phân nổi. Tất cả các phương này được Hattab và cộng sự (2015) [100] tổng hợp và đánh giá. Kết quả chỉ ra rằng trong số 16 phương pháp thì có 4 phương pháp đạt 80/100 điểm, dựa trên các tiêu chí được coi là quan trọng nhất có thể loại nước để thu hoạch vi tảo hiệu quả ở quy mô công nghiệp. Trong đó có phương pháp keo tụ bằng các chất hữu cơ được cho là phù hợp để ứng dụng ở quy mô lớn vì tính hiệu quả cao, chi phí vận hành thấp, phù hợp nhiều loài tảo, nhanh chóng, yêu cầu bảo trì tối thiểu và thân thiện với môi trường. Tuy nhiên, việc kết hợp các phương pháp cũng được đánh giá cao để nâng cao hiệu quả thu hồi và cải thiện kinh tế. Việc sử dụng phương pháp keo tụ hữu cơ như là một bước thu hoạch ban đầu để làm đặc dịch vi tảo, sau đó cần có sự kết hợp với phương pháp ly tâm hoặc lọc như một bước khử nước thứ cấp sẽ làm giảm thời gian và chi phí liên quan đến việc khử nước. Lúc này, các sinh khối vi tảo đã được kết bông lớn nên chi phí vận hành cho kỹ thuật ly tâm hay lọc sẽ được giảm do tiêu hao năng lượng thấp.

Hiện nay phương pháp thu hồi sinh khối vi tảo bằng cách ly tâm được ưu tiên áp dụng vì khả năng thu hồi cao, phù hợp cho công nghệ tiền xử lý để tách chiết các hợp chất bên trong vi tảo. Để thu hồi sản phẩm vi tảo với yêu cầu tránh vỡ tế bào thì phương pháp vi lọc là phù hợp. Tuy nhiên cả hai phương pháp này đều đòi hỏi thiết bị đắt tiền và tiêu tốn nhiều năng lượng. Để giảm chi phí sản xuất, phương pháp keo tụ đã được nghiên cứu rộng rãi. Tuy nhiên, việc sử dụng các chất keo tụ hoặc chất trợ lắng có tính độc hại nếu tồn tại trong sinh khối vi tảo có thể ảnh hưởng xấu đến sức khỏe động vật thủy sản. Với đặc tính an toàn, chitosan đã được nghiên cứu ứng dụng thu hồi vi tảo nhưng hiệu suất thu hồi vi tảo chưa cao nên khả năng ứng dụng còn hạn chế. Ngoài ra, việc sử dụng cũng bất tiện vì chitosan không tan trong nước mà phải hòa tan trong dung dịch acid loãng. Vì vậy, việc chuyển chitosan sang một dạng muối hữu cơ có thể hòa tan trong nước có môi trường pH rộng, tăng hiệu quả thu hoạch vi tảo, sản phẩm an toàn cho động vật thủy sản là vấn đề rất cần được nghiên cứu hiện nay.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng

Vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) (Hình 2.1) được thu ở các ao trong hệ thống nuôi thâm canh tại 2 tỉnh Khánh Hòa (ao nuôi thuộc trại Thực nghiệm Chính Mỹ, xã Ninh Phú, huyện Ninh Hòa) và Cà Mau (các ao nuôi thuộc xã Tân Thuận, huyện Đầm Dơi) bằng phương pháp xi phong đáy ao trong quá trình loại nước thải, rác thải hàng ngày qua lưới lọc (Hình 2.2). Mẫu vỏ lột xác của tôm sau khi được phân loại để tách chất bẩn trong nước ao nuôi (rác, tôm chết, thức ăn thừa và phân), rửa sạch, để ráo rồi ướp lạnh bằng nước đá trong thùng cách nhiệt styrofoam và đưa ngay về phòng thí nghiệm Trường Đại học Nha Trang sử dụng cho các thí nghiệm trong nghiên cứu này.



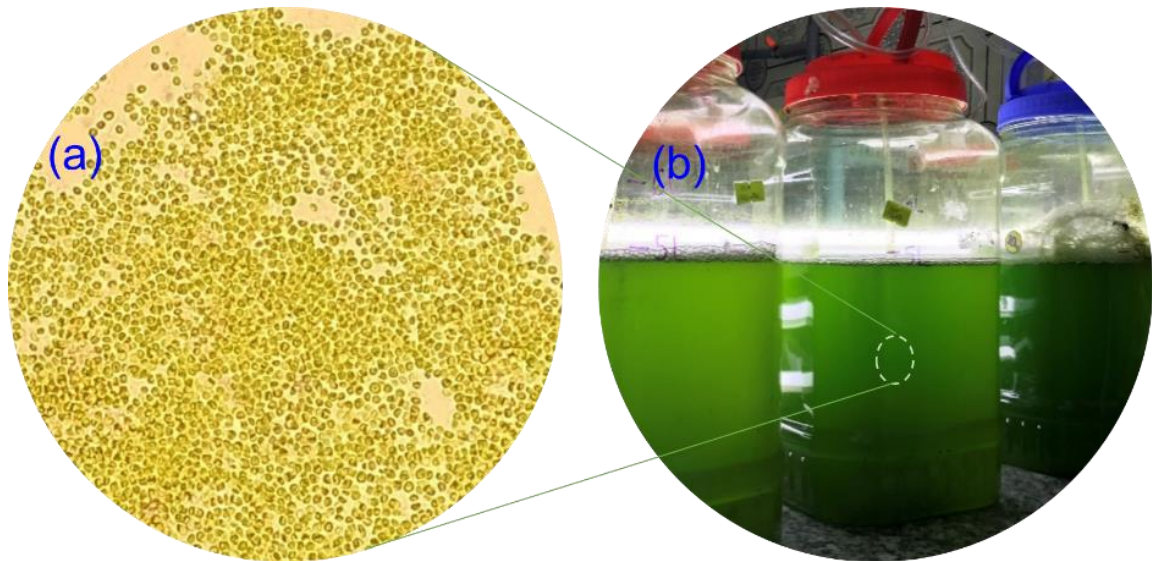
Hình 2.1. Vỏ lột xác khô của tôm thẻ chân trắng.



Hình 2.2. Hình ảnh biểu diễn quá trình thu nhận và xử lý mẫu vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng. (a) vị trí xi phong trong ao nuôi, (b) và (c) vị trí thu vỏ tôm lột xác, (d) vỏ tôm lột xác chưa rửa và (e) vỏ tôm lột xác đã rửa và phơi khô.

2.1.2. Vi tảo *Nannochloropsis* sp.

Chủng gốc vi tảo *Nannochloropsis* sp. (Hình 2.3) được cung cấp và nuôi tăng sinh khối tại phòng thí nghiệm của Trung tâm Nghiên cứu giống và dịch bệnh thủy sản, Trường Đại học Nha Trang.



Hình 2.3. Tế bào vi tảo *Nannochloropsis* sp. (a) và dịch vi tảo (b).

Phương pháp chuẩn bị mẫu: Mẫu được nuôi tăng sinh khối từ 10% vi tảo gốc *Nannochloropsis* sp. trong môi trường nước biển (5 – 7 L) đã được xử lý qua hệ thống màng lọc và thanh trùng. Các bình chứa có nắp đậy kín được gắn ống sục khí, hệ thống van điều chỉnh khí và được chia đều cho các bình nuôi. Khí được sục liên tục và duy trì nhiệt độ nước nuôi ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Các bình nuôi được chiếu sáng liên tục với cường độ trong khoảng 1000 – 3000 lux. Tất cả các vật dụng thí nghiệm được hấp khử trùng trong 20 phút ở 121°C trước khi sử dụng.

Chuẩn bị nước biển và môi trường dinh dưỡng: Nguồn nước biển sử dụng có độ mặn trong khoảng 25 – 35‰ và pH trong khoảng 7,8 – 8,3. Môi trường F/2 được chuẩn bị theo Guillard (1975) [97] rồi cho vào nước biển đã hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút và để nguội [24, 25] theo tỷ lệ 1ml dinh dưỡng F/2 trong 1L nước biển.

Phương pháp lấy mẫu: Tiến hành lấy mẫu dịch vi tảo *Nannochloropsis* sp. từ các bình sinh khối vào ngày nuôi thứ 6 - 7, lúc 15 giờ mỗi ngày (thời điểm đầu của pha ổn định).

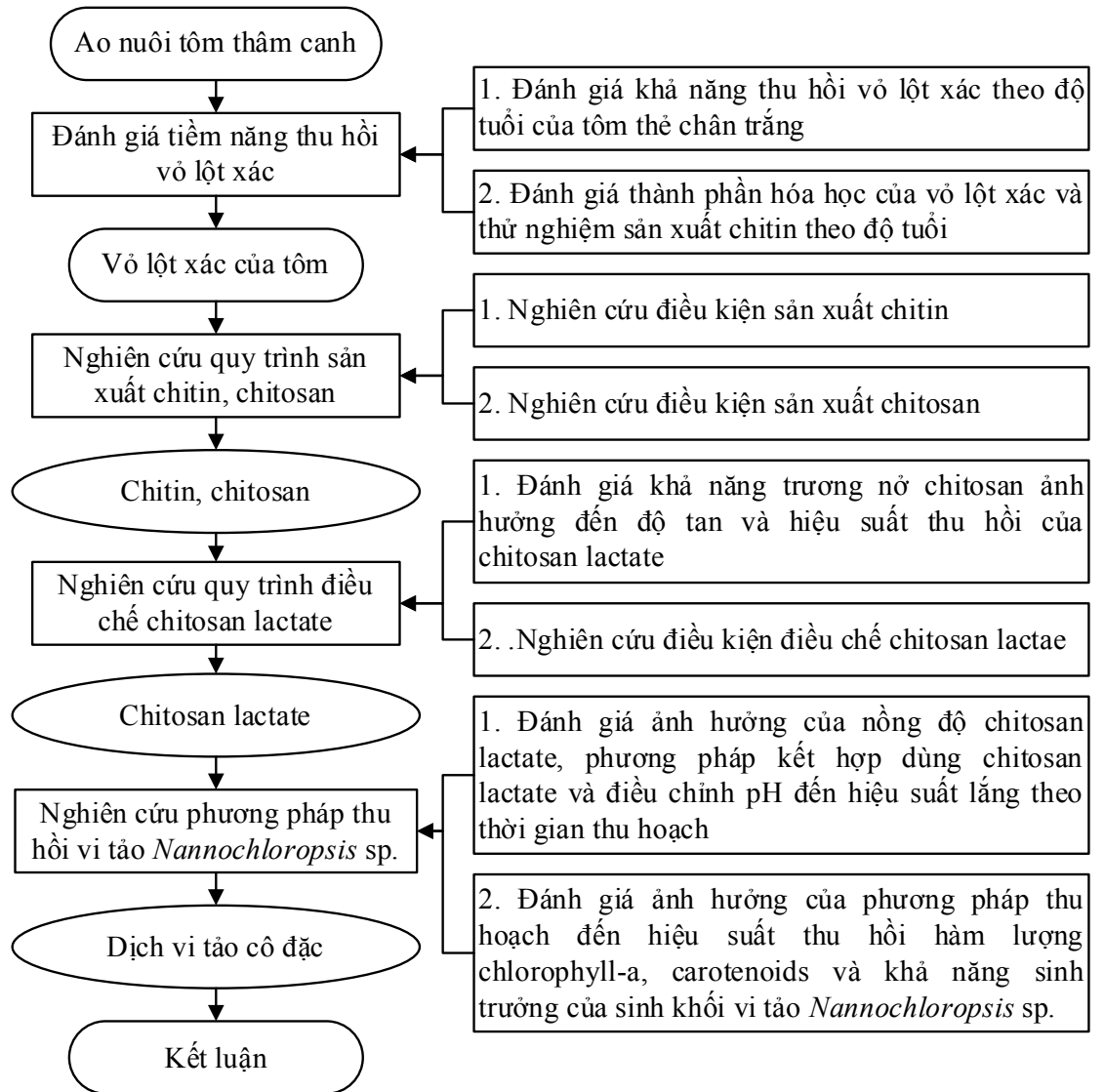
2.1.3. Hóa chất dùng trong nghiên cứu

Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đạt tiêu chuẩn phân tích gồm HCl, NaOH, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ của Merck KGaA (Germany), $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ của Fisher Scientific (United Kingdom) sản xuất. Tất cả các loại hóa chất được lưu trữ theo đúng yêu cầu của nhà sản xuất ghi trên bao bì.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sơ đồ tổng quát các nội dung nghiên cứu

Sơ đồ tổng quát các nội dung nghiên cứu trong phạm vi luận án được trình bày ở Hình 2.4.



Hình 2.4. Sơ đồ bố trí thí nghiệm tổng quát.

(1) Đánh giá tiềm năng sử dụng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng để làm nguyên liệu sản xuất chitin, chitosan

Mục tiêu của nội dung nghiên cứu này là đánh giá được tiềm năng thu vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng để làm nguyên liệu sản xuất chitin, chitosan. Do vậy, nghiên cứu đã sử dụng mẫu vỏ tôm thu từ các ao nuôi thâm canh tại tỉnh Khánh Hòa để thuận tiện cho việc quan sát đặc tính lột xác của tôm theo độ tuổi, thu mẫu phù hợp và đồng nhất, đánh giá chính xác thành phần hóa học.

Nghiên cứu thực hiện ước tính sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có thể thu hồi từ quá trình nuôi thâm canh và xác định thành phần hóa học cơ bản của vỏ lột xác để đánh giá tiềm năng sử dụng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng làm nguyên liệu sản xuất chitin, chitosan. Cơ sở khoa học và thiết kế thí nghiệm cho nội dung nghiên cứu này được trình bày chi tiết ở Mục 2.2.2.

(2) Nghiên cứu quy trình sản xuất chitin, chitosan từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng.

Mục tiêu của nội dung nghiên cứu này là xác định các thông số thích hợp cho các bước của quy trình sản xuất chitin, chitosan từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng. Do vậy, nghiên cứu đã sử dụng mẫu vỏ lột xác của tôm thu từ các ao nuôi thâm canh tại tỉnh Cà Mau (có cùng phương pháp nuôi với tỉnh Khánh Hòa, độ tuổi vỏ lột xác, phương pháp thu và xử lý, thời điểm thu phù hợp được chọn ở Mục 2.2.2 và đánh giá thành phần hóa học của vỏ lột xác) nhằm đảm bảo tính đồng nhất của mẫu trong quá trình nghiên cứu. Ngoài ra, đây là một trong những nơi có thể thu một lượng vỏ lột xác lớn và quy trình sản xuất có thể áp dụng phù hợp cho đối tượng vỏ lột xác thu tại các ao nuôi thâm canh thuộc khu vực ĐBSCL.

Nghiên cứu thực hiện xác định ảnh hưởng của điều kiện khử khoáng, khử protein và deacetyl đến chất lượng của chitin, chitosan, từ đó xác định các thông số thích hợp cho các bước của quy trình sản xuất chitin, chitosan có chất lượng cao nhưng giảm thiểu lượng hóa chất sử dụng và rút ngắn thời gian xử lý. Cơ sở khoa học và thiết kế thí nghiệm của nội dung nghiên cứu này được trình bày chi tiết ở Mục 2.2.3, Mục 2.2.4. Từ đó, đề xuất quy trình sản xuất và tiến hành đánh giá các tính chất lý hóa của sản phẩm ở Mục 2.2.4.

(3) Nghiên cứu xây dựng quy trình điều chế chitosan lactate từ chitosan thu nhận từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng.

Mục tiêu của nội dung nghiên cứu này là xác định các thông số thích hợp cho các bước của quy trình điều chế chitosan lactate từ chitosan thu nhận từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng.

Nghiên cứu thực hiện xác định ảnh hưởng của điều kiện xử lý làm trương nở chitosan và điều kiện phản ứng giữa chitosan và lactic acid đến độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate, từ đó xác định các thông số phù hợp cho các bước của quy trình điều chế chitosan lactate từ chitosan thu nhận từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng. Cơ sở khoa học và thiết kế thí nghiệm của nội dung nghiên cứu này được trình bày chi tiết ở Mục 2.2.5.

(4) Nghiên cứu ứng dụng chitosan lactate điều chế từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng để thu hồi sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. đậm đặc.

Mục tiêu của nội dung nghiên cứu này là xác định điều kiện thích hợp cho việc sử dụng chitosan lactate làm chất trợ lắng trong thu hồi sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp.

Nghiên cứu thực hiện xác định ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate đến hiệu suất lắng và hình thái tế bào vi tảo *Nannochloropsis* sp. Cơ sở khoa học và thiết kế thí nghiệm của nội dung nghiên cứu này được trình bày chi tiết ở Mục 2.2.6.

2.2.2. Đánh giá tiềm năng sử dụng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng làm nguyên liệu sản xuất chitin, chitosan

2.2.2.1. Ước tính sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có thể thu hồi từ quá trình nuôi thâm canh

Mục tiêu: Ước tính sơ bộ sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có thể thu hồi từ quá trình nuôi thâm canh.

Cơ sở khoa học:

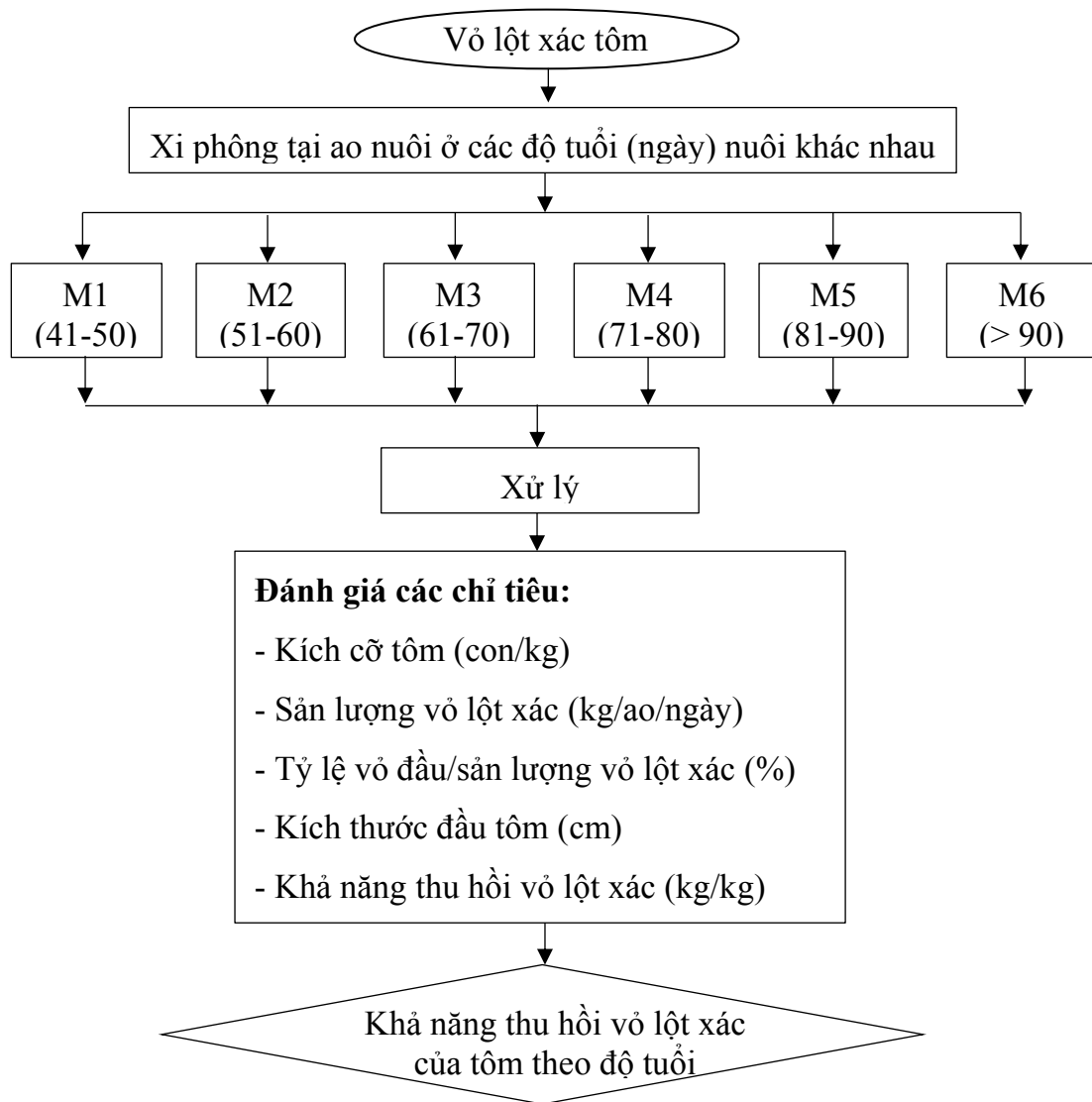
Tôm là một loại động vật giáp xác, cơ thể tôm được bao bọc bởi một lớp vỏ cứng bên ngoài. Cấu trúc của vỏ tôm được liên kết chặt chẽ giữa chitin và các thành phần khác gồm như protein, calci carbonate, lipid, chất màu, khoáng chất, các hợp chất hữu cơ khác. Trong quá trình phát triển, tôm phải lột xác thay vỏ mới để tăng trọng lượng và kích thước cơ thể. Tôm lột xác theo chu kỳ khác nhau theo từng giai đoạn phát triển và diễn ra trong suốt quá trình sống của chúng [69, 88]. Do vậy, thành phần hóa học và sản lượng vỏ lột xác của tôm cũng thay đổi theo từng giai đoạn phát triển.

Để ước tính sơ bộ sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có thể thu hồi từ quá trình nuôi thâm canh, nghiên cứu đã tiến hành khảo sát sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng theo từng giai đoạn phát triển (độ tuổi) tại một ao nuôi thâm canh dùng làm cơ sở ước tính. Thiết kế nghiên cứu được trình bày ở Hình 2.5.

Cách tiến hành:

Vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng được xi phong để thu hồi tại ao nuôi thâm canh thuộc trại Thực nghiệm Chính Mỹ, huyện Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa. Quá trình xi phong được tiến hành 2 lần/ngày vào buổi sáng (8 – 9 giờ) và buổi chiều (15 – 16 giờ). Mẫu được thu theo các độ tuổi từ: 41 – 50 ngày tuổi (M1), 51 – 60 ngày tuổi (M2), 61 – 70 ngày tuổi (M3), 71 – 80 ngày tuổi (M4), 81 – 90 ngày tuổi (M5) và lớn hơn 90 ngày tuổi (M6). Mẫu được rửa sạch và để ráo, ướp lạnh bằng đá chứa trong thùng xốp và đưa ngay về phòng thí nghiệm Trường Đại học Nha Trang để phân tích, đánh giá ngay trong ngày.

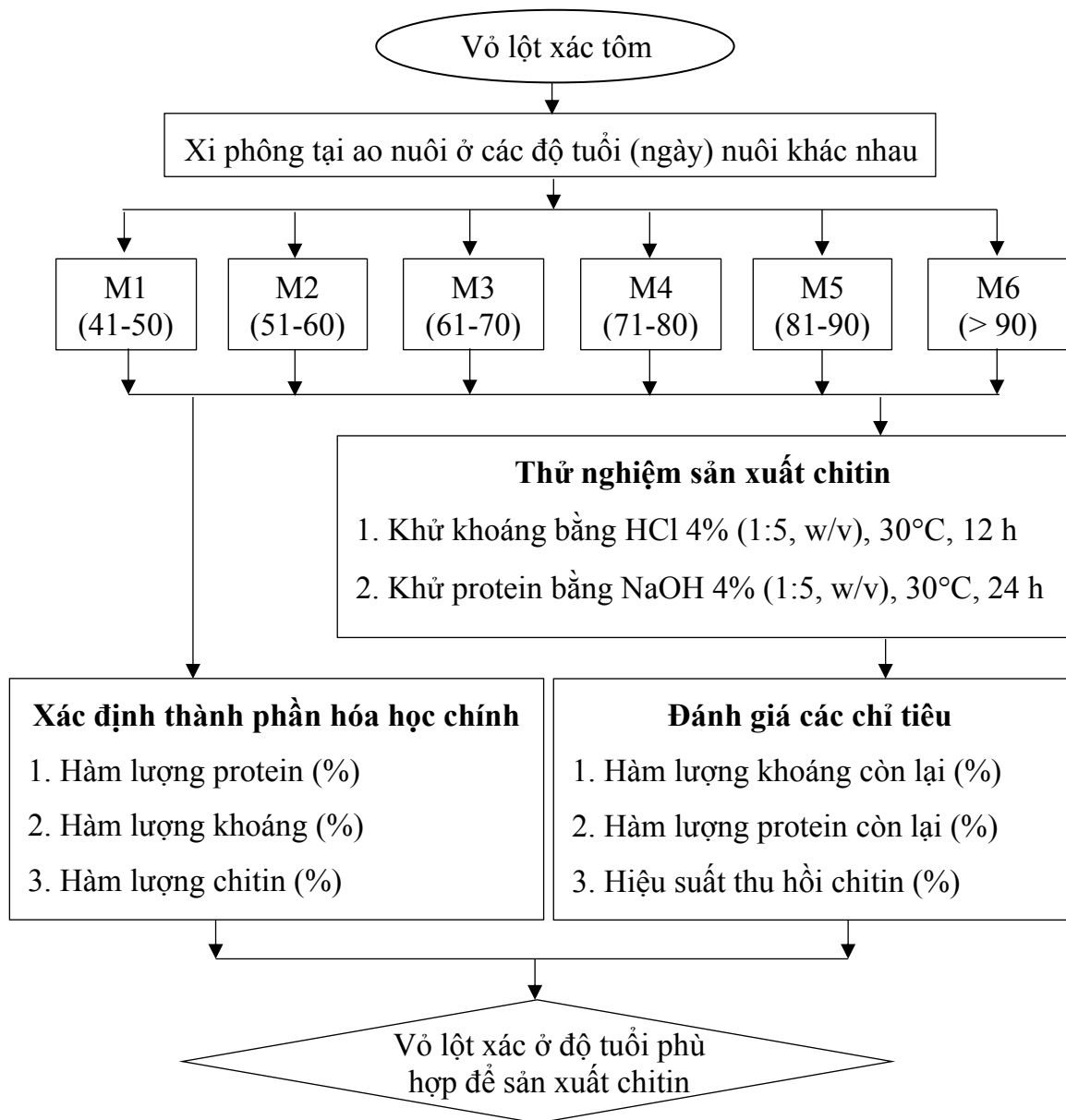
Các chỉ tiêu phân tích được xác định để ước tính sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có thể thu hồi từ ao nuôi thâm canh gồm: kích cỡ tôm (con/kg), sản lượng vỏ lột xác thu được trung bình mỗi ngày, tỷ lệ vỏ đầu/khối lượng vỏ lột xác, kích thước vỏ đầu tôm và sản lượng thu hồi vỏ lột xác của tôm.



Hình 2.5. Sơ đồ khảo sát khả năng thu hồi vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng trong ao nuôi thâm canh theo độ tuổi.

2.2.2.2. Xác định thành phần hóa học cơ bản của vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng và thử nghiệm sản xuất chitin

Mục tiêu: Xác định thành phần hóa học cơ bản của vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng theo độ tuổi nuôi và thử nghiệm sản xuất chitin từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng theo quy trình đã được công bố đối với nguyên liệu là vỏ tôm thải ra từ quá trình chế biến, nhằm đánh giá khả năng sử dụng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng làm nguyên liệu chitin.



Hình 2.6. Sơ đồ khảo sát thành phần hóa học và thử nghiệm sản xuất chitin

Cơ sở khoa học: Thí nghiệm dựa trên 2 cơ sở khoa học gồm:

(1) Mỗi giai đoạn lột xác theo độ tuổi có sự thay đổi cấu trúc và thành phần hóa học khác nhau dựa trên đặc tính của từng loài giáp xác [69, 88].

(2) Thành phần hóa học và tính chất của nguyên liệu ban đầu có ảnh hưởng lớn đến việc lựa chọn điều kiện phản ứng thu nhận chitin [21].

Cách tiến hành thí nghiệm:

Vỏ lột xác của tôm trong ao nuôi thâm canh được tiến hành xi phong và xử lý (phân loại và rửa sạch) theo các độ tuổi khác nhau từ M1 – M6. Sau đó, tiến hành phân tích thành phần hóa học cơ bản và thử nghiệm sản xuất chitin theo quy trình của Toan và cộng sự (2006) [182] như sau:

- (1) Khử khoáng bằng HCl 4% (1:5, w/v) ở 30°C trong 12 giờ.
- (2) Khử protein bằng NaOH 4% (1:5, w/v) ở 30°C trong 24 giờ.

Xác định các chỉ tiêu gồm hàm lượng khoáng và protein còn lại, hiệu suất thu hồi chitin để đưa ra kết luận lựa chọn độ tuổi của tôm thẻ chân trắng phù hợp có thể thu hồi vỏ lột xác dùng làm nguyên liệu sản xuất chitin, chitosan.

2.2.3. Nghiên cứu quy trình sản xuất chitin từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng

2.2.3.1. Xác định ảnh hưởng của điều kiện khử khoáng đến hiệu suất khử khoáng và hiệu suất thu hồi chitin

Mục tiêu: Xác định được điều kiện khử khoáng thích hợp để thu chitin có độ tinh sạch cao (hàm lượng khoáng còn lại <1%) từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng, giảm lượng hóa chất sử dụng và rút ngắn thời gian khử khoáng.

Cơ sở khoa học:

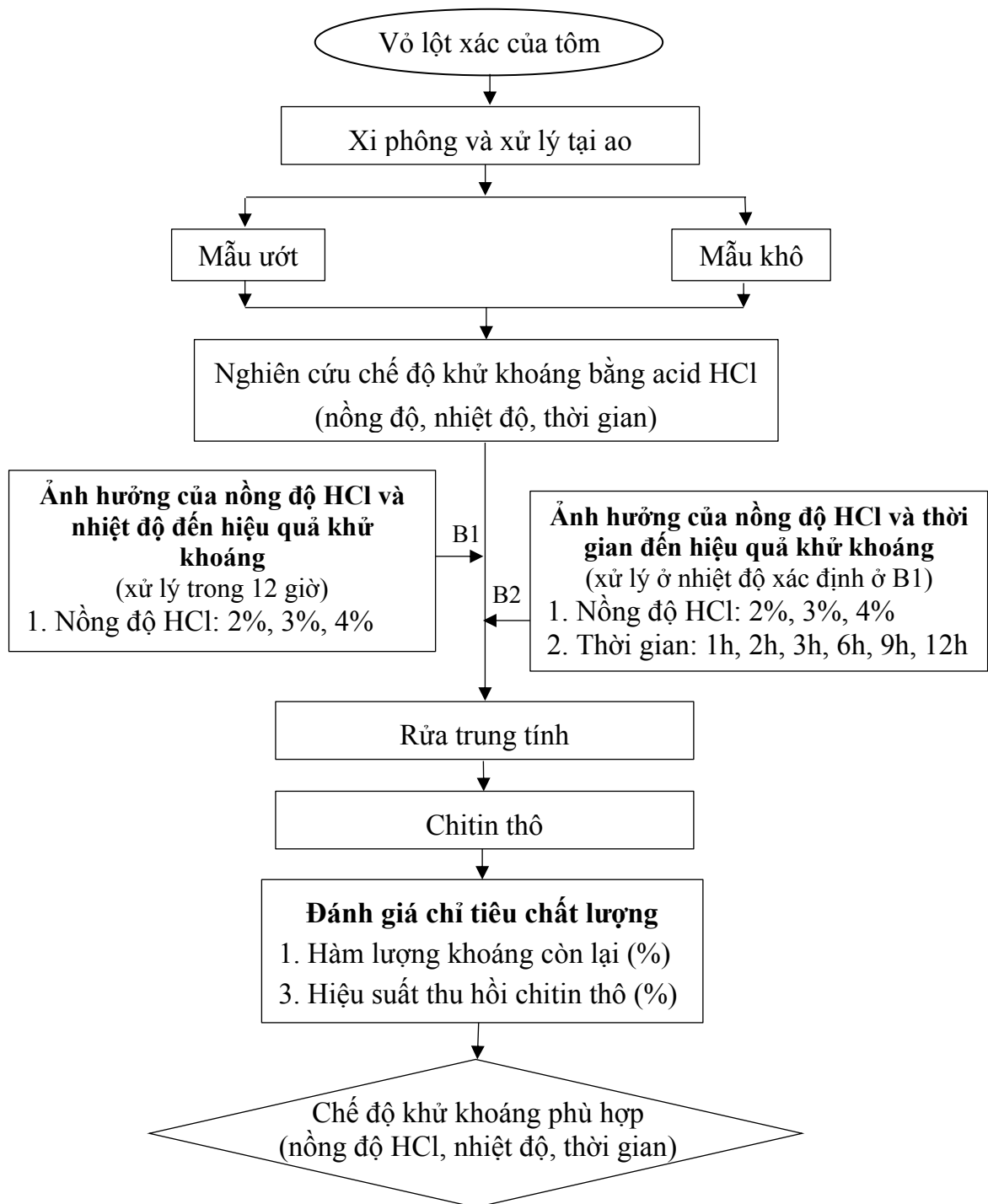
Kết quả khảo sát sơ bộ cho thấy hàm lượng khoáng của vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng khá cao do đã bị calci hóa làm cứng lớp vỏ ngoài. Tuy nhiên, khoáng tồn tại dưới dạng tinh thể calci và calci cacbonate vô định hình nằm xen kẽ với các sợi chitin-protein [88, 162] nên khả năng khử khoáng cho vỏ tôm lột xác có thể sẽ dễ dàng hơn so với vỏ tôm thu nhận từ quá trình chế biến. Do vậy, thiết kế thí nghiệm xác định điều kiện khử khoáng thích hợp dựa trên kết quả nghiên cứu trước đây về thu nhận chitin, chitosan từ vỏ tôm chế biến [182]. Mặt khác, Khả năng tiếp xúc, thấm hút hóa chất trong quá trình khử khoáng của vỏ tôm khô và vỏ tôm ướt khác nhau đáng kể nên thí nghiệm khử khoáng được thiết kế trên cả hai đối tượng để so sánh chọn điều kiện thích hợp.

Cách tiến hành thí nghiệm:

+ Mẫu vỏ lột xác khô: Vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có độ tuổi phù hợp để làm nguyên liệu sản xuất chitin (đã được chọn ở nghiên cứu Mục 2.2.2) sau khi được xi phong tại ao, phân loại, rửa sạch và phơi khô đạt độ ẩm khoảng 10%, bảo quản trong túi PE Zipper để có thể đồng bộ mẫu nghiên cứu.

+ Mẫu vỏ lột xác ướt: Vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có độ tuổi phù hợp sau khi xi phong từ ao nuôi thâm canh được xử lý để loại bỏ tạp chất, rửa sạch và để ráo nước (độ ẩm khoảng 70%). Mẫu được đóng trong các túi PE zipper và bảo quản lạnh bằng nước đá trong thùng xốp. Mẫu được vận chuyển về phòng thí nghiệm của Trường Đại học Nha Trang để tiến hành nghiên cứu.

Tiến hành khử khoáng mẫu vỏ lột xác bằng HCl với tỷ lệ 1:5 (w/v, 300 g mẫu ướt) và 1:15 (w/v, 100 g mẫu khô) thông qua hai bước:



Hình 2.7. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của điều kiện khử khoáng đến hàm lượng khoáng còn lại và hiệu suất thu hồi chitin thô từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng.

Bước 1 (B1), cố định thời gian xử lý trong 12 giờ và khử khoáng bằng HCl ở các nồng độ khác nhau (2%, 3% và 4%), nhiệt độ xử lý khác nhau (30°C, 50°C và 70°C) để xác định nồng độ và nhiệt độ khử khoáng phù hợp.

Bước 2 (B2), chọn nhiệt độ xử lý phù hợp chọn ở B1 và tiếp tục nghiên cứu khử khoáng ở các nồng độ HCl khác nhau (2%, 3% và 4%) và thời gian xử lý khác nhau (1, 2, 3, 6, 9 và 12 giờ) để xác định nồng độ và thời gian khử khoáng phù hợp.

Mẫu sau khi khử khoáng được rửa bằng nước sạch đến pH trung tính (6,5 – 7,0), phơi khô đến độ ẩm từ 9-10% và bảo quản mẫu trong túi PE zipper. Tiến hành xác định các chỉ tiêu: hàm lượng khoáng còn lại và hiệu suất thu hồi chitin thô để làm cơ sở lựa chọn chế độ khử khoáng (nồng độ HCl, nhiệt độ, thời gian) phù hợp đối với mẫu vỏ lột xác.

2.2.3.2. Xác định ảnh hưởng của điều kiện khử protein đến hiệu suất khử protein và hiệu suất thu hồi chitin

Mục tiêu: Xác định được điều kiện khử protein thích hợp để sản xuất được chitin có độ tinh sạch cao (hàm lượng protein còn lại < 1%), sử dụng hóa chất xử lý có nồng độ thấp và thời gian xử lý ngắn.

Cơ sở khoa học:

Chất lượng của chitin được tạo thành tùy thuộc vào nguyên liệu ban đầu và điều kiện xử lý. Chitin thô sau khi khử khoáng có trạng thái mềm nên dễ dàng loại protein trong cấu trúc chitin. Trong đề tài, cơ sở lựa chọn khoảng nghiên cứu phụ thuộc vào các yếu tố sau:

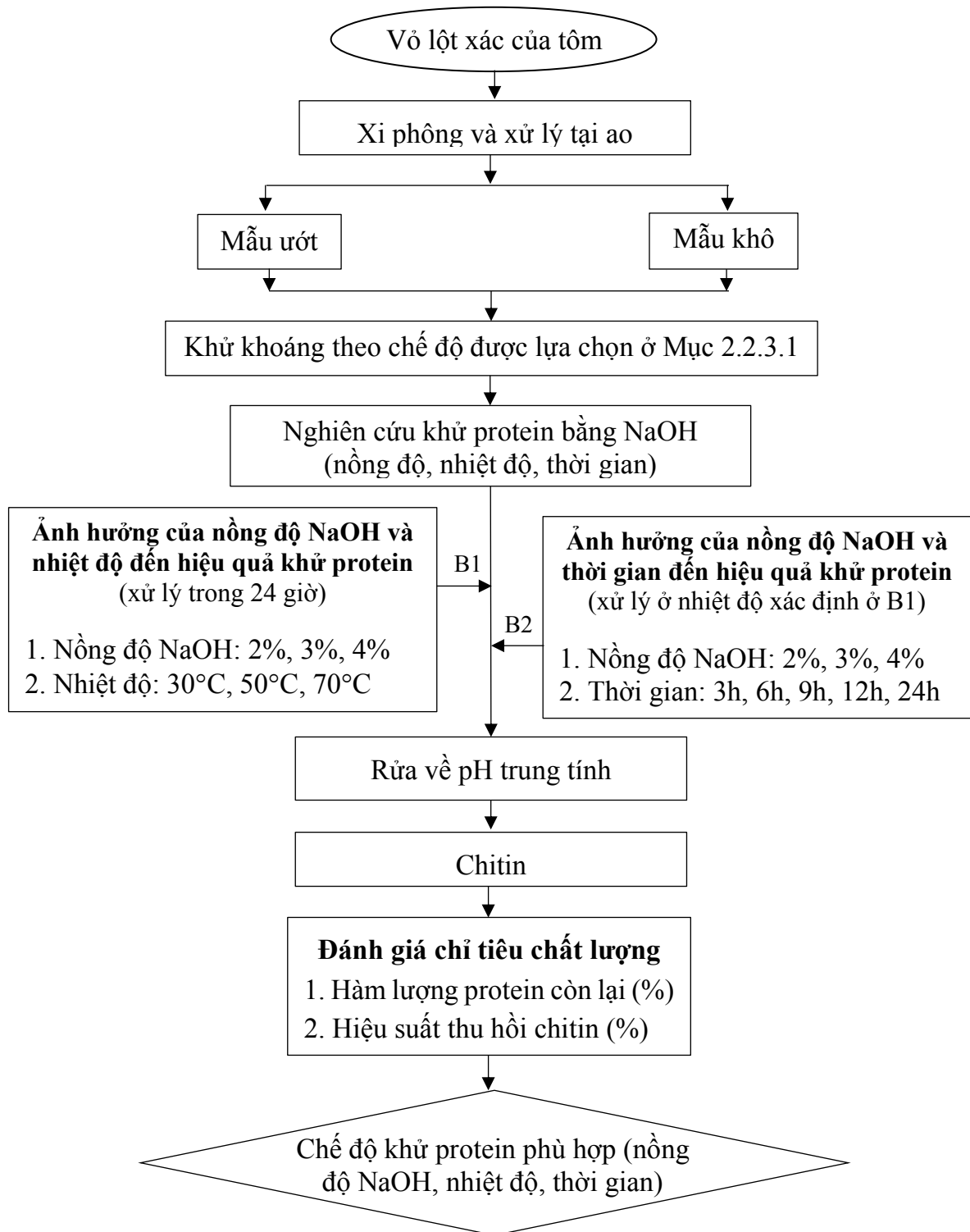
Trong vỏ lột xác của tôm, protein được liên kết chặt chẽ với chitin nhưng chỉ tập trung ở lớp biểu bì của vỏ lột xác do bị vôi hóa để hỗ trợ độ cứng của bộ xương ngoài [88] nên hàm lượng protein trong vỏ lột xác thấp hơn trong vỏ tôm thải ra từ quá trình chế biến và có thể khử dễ dàng hơn. Do vậy, thiết kế thí nghiệm xác định điều kiện khử protein thích hợp dựa trên kết quả nghiên cứu trước đây về thu nhận chitin, chitosan từ vỏ tôm chế biến. Để tránh chitin bị cắt mạch và tổn thất trong quá trình rửa, nghiên cứu chọn nồng độ NaOH là 2%, 3% và 4% và nhiệt độ xử lý 30°C, 50°C và 70°C [129]. Thời gian xử lý được cố định theo các nghiên cứu trước là 24 giờ [9, 182, 185].

Cách tiến hành thí nghiệm:

Mẫu chitin thô sau khi được khử khoáng theo chế độ phù hợp thu được ở Mục 2.2.3.1.

Tiến hành khử protein mẫu bằng NaOH với tỷ lệ 1:5 (w/v) thông qua hai bước:

Bước 1 (B1), cố định thời gian xử lý trong 24 giờ và khử protein bằng NaOH ở các nồng độ khác nhau (2%, 3% và 4%), nhiệt độ xử lý khác nhau (30°C, 50°C và 70°C) để lựa chọn nhiệt độ xử lý phù hợp.



Hình 2.8. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của điều kiện khử protein đến hàm lượng protein còn lại và hiệu suất thu hồi của chitin

Bước 2 (B2), nghiên cứu khử khoáng ở các nồng độ NaOH khác nhau (2%, 3% và 4%) và thời gian xử lý khác nhau (3, 6, 9, 12 và 24 giờ) ở nhiệt độ xử lý được lựa chọn ở B1 để xác định nồng độ và thời gian xử lý phù hợp.

Mẫu sau khi khử khoáng được rửa bằng nước sạch đến pH trung tính (6,5 – 7,0) và phơi khô đạt độ ẩm 9-10%, bảo quản mẫu trong túi PE zipper. Tiến hành xác định các chỉ tiêu: hàm lượng protein còn lại và hiệu suất thu hồi chitin để làm cơ sở lựa chọn chế độ khử protein phù hợp nhằm thu được chitin đạt chất lượng.

2.2.4. Nghiên cứu sản xuất chitosan và đề xuất quy trình

2.2.4.1. Xác định ảnh hưởng của điều kiện deacetyl đến hiệu suất thu hồi và tính chất của chitosan

Mục tiêu: Xác định được điều kiện deacetyl thích hợp để thu nhận chitosan có độ deacetyl cao (khoảng 90%), độ tan tốt ($\geq 99\%$) nhằm sử dụng làm nguyên liệu điều chế muối chitosan lactate.

Cơ sở khoa học:

Chất lượng của chitosan phụ thuộc vào nguồn chitin tinh sạch (hàm lượng khoáng và protein còn lại dưới 1%) và điều kiện deacetyl, cơ sở lựa chọn khoảng nghiên cứu phụ thuộc các yếu tố sau:

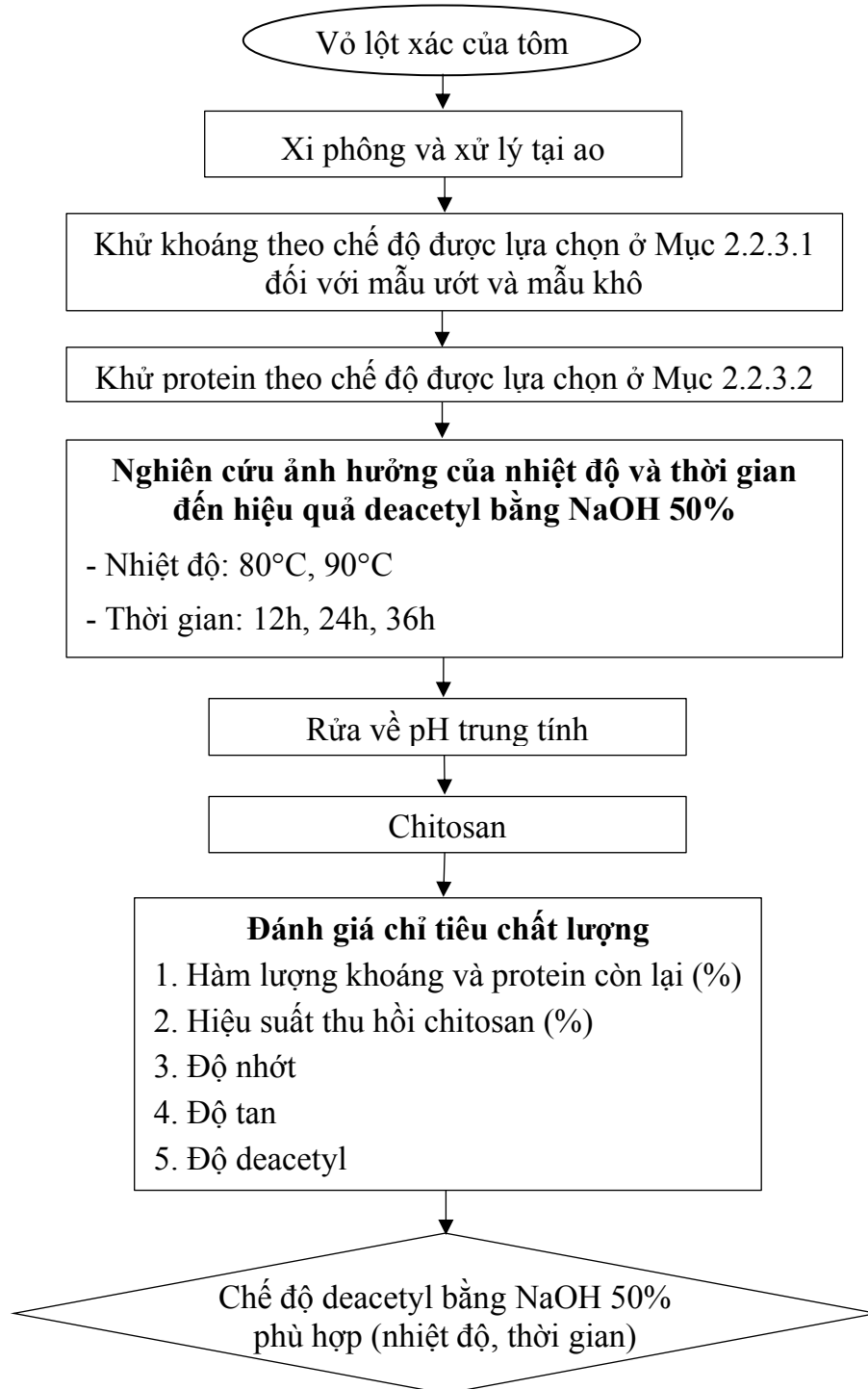
Nồng độ NaOH sử dụng được cố định ở 50% (w/v) theo các nghiên cứu trước [146, 182, 185]. Tùy thuộc vào mong muốn chất lượng của chitosan chọn chế độ deacetyl phù hợp do nồng độ NaOH cao, nhiệt độ cao, thời gian dài thì chitosan thu được có khối lượng phân tử thấp, độ nhớt thấp. Nếu nồng độ NaOH thấp hơn 50% và cần thu được chitosan có độ deacetyl cao (khoảng 90%), độ tan tốt ($\geq 99\%$) thì phải tăng nhiệt độ và thời gian xử lý dài, như vậy sẽ ảnh hưởng đến khả năng thu hồi chitosan và độ nhớt thấp [21].

Xác định điều kiện xử lý: nhiệt độ deacetyl cao (80°C, 90°C) và thời gian (12, 24 và 36 giờ) nhằm xác định điều kiện deacetyl phù hợp để thu nhận chitosan có độ deacetyl cao (khoảng 90%), độ tan tốt ($\geq 99\%$) [20, 146, 185]. Thời gian deacetyl được chọn không quá dài (ảnh hưởng đến hiệu quả sản xuất khi triển khai ở quy mô lớn) nên quá trình deacetyl cần được xử lý ở nhiệt độ cao hơn 80°C nhằm thu được sản phẩm có chất lượng đạt yêu cầu. Tuy nhiên, ở nhiệt độ quá cao trên 90°C sẽ làm chitosan bị cắt mạch, hiệu suất thu hồi chitosan thấp và màu sắc sản phẩm không tốt. Ngoài ra, độ deacetyl và độ tan của sản phẩm chitosan còn phụ thuộc vào nguồn nguyên liệu và tính chất của chitin ban đầu [21].

Cách tiến hành thí nghiệm:

Mẫu chitin được sản xuất (khử khoáng và protein) từ mẫu vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng theo chế độ phù hợp được lựa chọn ở Mục 2.2.3 được sử dụng để sản xuất chitosan. Tiếp tục được khử gốc acetyl bằng NaOH 50% (w/v), tỷ lệ chitin/dung dịch là 1/5 [21], xử lý ở các nhiệt độ khác nhau (80°C và 90°C) trong các khoảng giờ khác nhau (12, 24 và 36 giờ).

Sau khi rửa mẫu về pH trung tính (6,5 – 7,0), phơi khô đạt độ ẩm 9-10%, bảo quản trong túi PE zipper. Tiến hành phân tích các chỉ tiêu lý hóa của chitosan để làm cơ sở lựa chọn chế độ deacetyl bằng NaOH 50% phù hợp cho sản xuất chitosan có chất lượng đáp ứng yêu cầu đặt ra.



Hình 2.9. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của điều kiện deacetyl đến hiệu suất thu hồi và tính chất cơ bản của chitosan.

2.2.4.2. Đề xuất quy trình sản xuất chitosan và đánh giá tính chất lý hóa của sản phẩm

Mục tiêu: Đề xuất quy trình sản xuất chitin, chitosan quy mô phòng thí nghiệm (10 kg/mẻ) có tính ổn định cao.

Cách tiến hành thí nghiệm: Từ các kết quả nghiên cứu thu được, đề xuất quy trình sản xuất chitin và chitosan từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng. Tiến hành sản xuất thử nghiệm 10 kg/mẻ sản xuất chitin, chitosan theo quy trình đề xuất và đánh giá các chỉ tiêu lý hóa (sử dụng các kỹ thuật: SEM, XRD, FTIR, NMR) của nguyên liệu vỏ lột xác và sản phẩm chitin, chitosan thu được để đánh giá tính ổn định của quy trình. Đồng thời, so sánh với sản phẩm chitin, chitosan được sản xuất từ vỏ tôm thải ra trong quá trình chế biến theo quy trình của Toàn và cộng sự (2006) [182].

2.2.5. Nghiên cứu điều chế chitosan lactate và đề xuất quy trình

2.2.5.1. Xác định ảnh hưởng của điều kiện xử lý làm trương nở chitosan đến độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate

- (1) Xác định ảnh hưởng của tỷ lệ ethanol/nước (EtOH/H₂O, %, v/v) trong xử lý làm trương nở chitosan đến độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate

Mục tiêu: Xác định được tỷ lệ EtOH/H₂O (%, v/v) phù hợp để làm trương nở chitosan nhằm thu nhận chitosan lactate có độ tan và hiệu suất thu hồi cao.

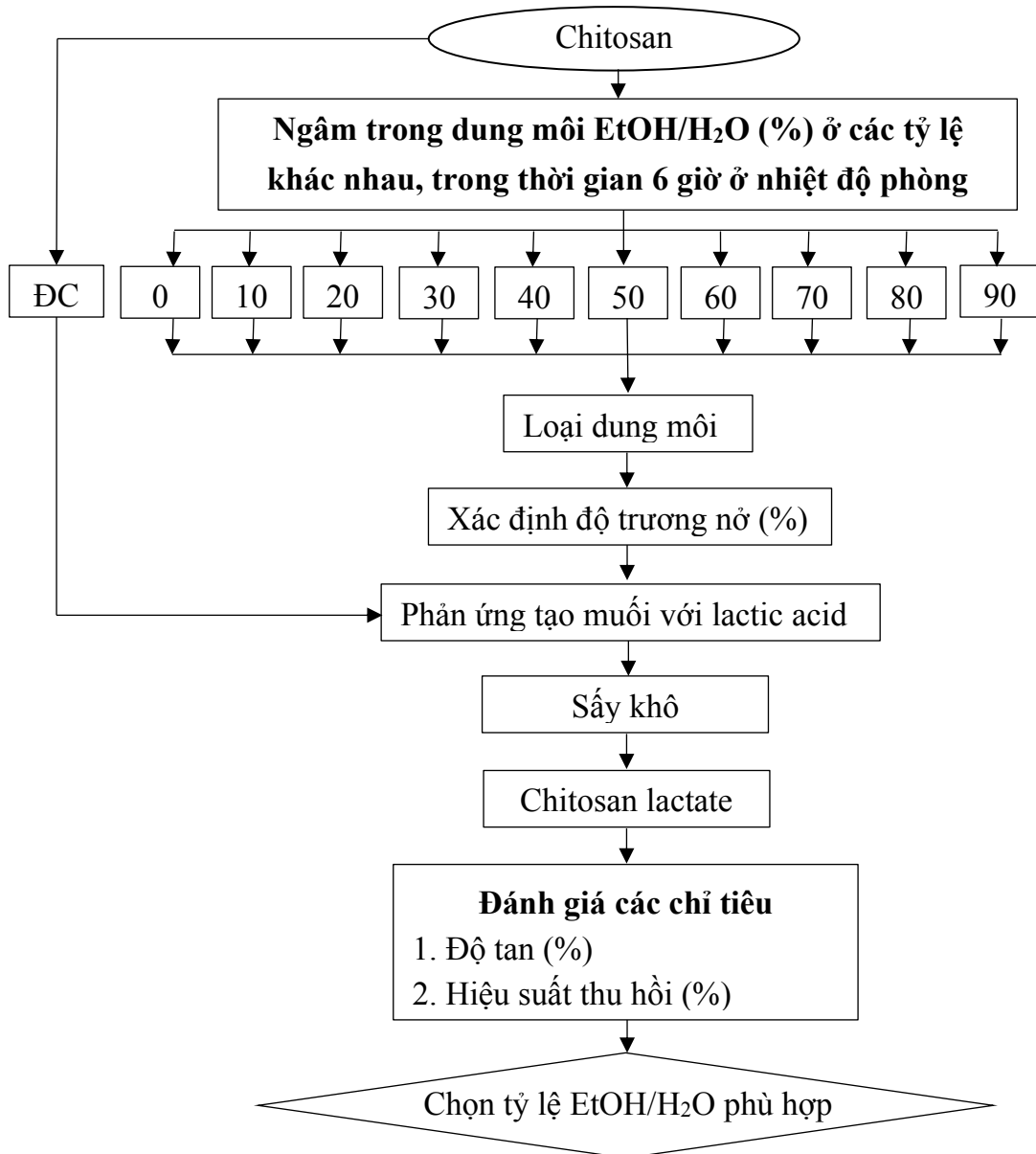
Cơ sở khoa học: Quá trình trương nở trong hỗn hợp dung môi EtOH/H₂O sẽ giúp chitosan giãn mạch, mở rộng cấu trúc, làm giảm độ cứng của cấu trúc làm tăng khả năng tiếp xúc với các chất phản ứng của phân tử chitosan. Hỗn hợp EtOH/H₂O ở nồng độ ethanol thích hợp sẽ hạn chế hiện tượng cắt mạch, tạo gel trong môi trường có acid [53, 172].

Cách tiến hành thí nghiệm:

Chitosan được chuẩn bị theo quy trình Hình 2.10. Sau đó, chitosan được nghiền đến kích cỡ hạt 35 mesh (0,5 mm).

Tiến hành ngâm 5g chitosan trong 50 ml hỗn hợp dung môi ethanol/nước (%,v/v) với các nồng độ phần trăm của EtOH là 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, và 90% trong 6 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, dung môi được loại bỏ bằng cách ly tâm ở 5.000 rpm, trong 15 phút để xác định độ trương nở của chitosan.

Chitosan sau khi được trương nở được phản ứng với lactic acid (1M) với tỷ lệ chitosan/acid là 1/10 (w/v), khuấy đảo đều trong 1,5 giờ ở nhiệt độ phòng. Chitosan lactate được rửa 2 lần với EtOH 85% (khuấy đều 10 phút) và ngâm 1 lần EtOH 99,5% trong thời gian 30 phút để loại nước với tỷ lệ chitosan/EtOH là 1/10, làm khô chitosan lactate bằng thiết bị sấy không khí nóng (40°C). Tiến hành đánh giá các chỉ tiêu về độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate để từ đó xác định được tỷ lệ EtOH/H₂O phù hợp.



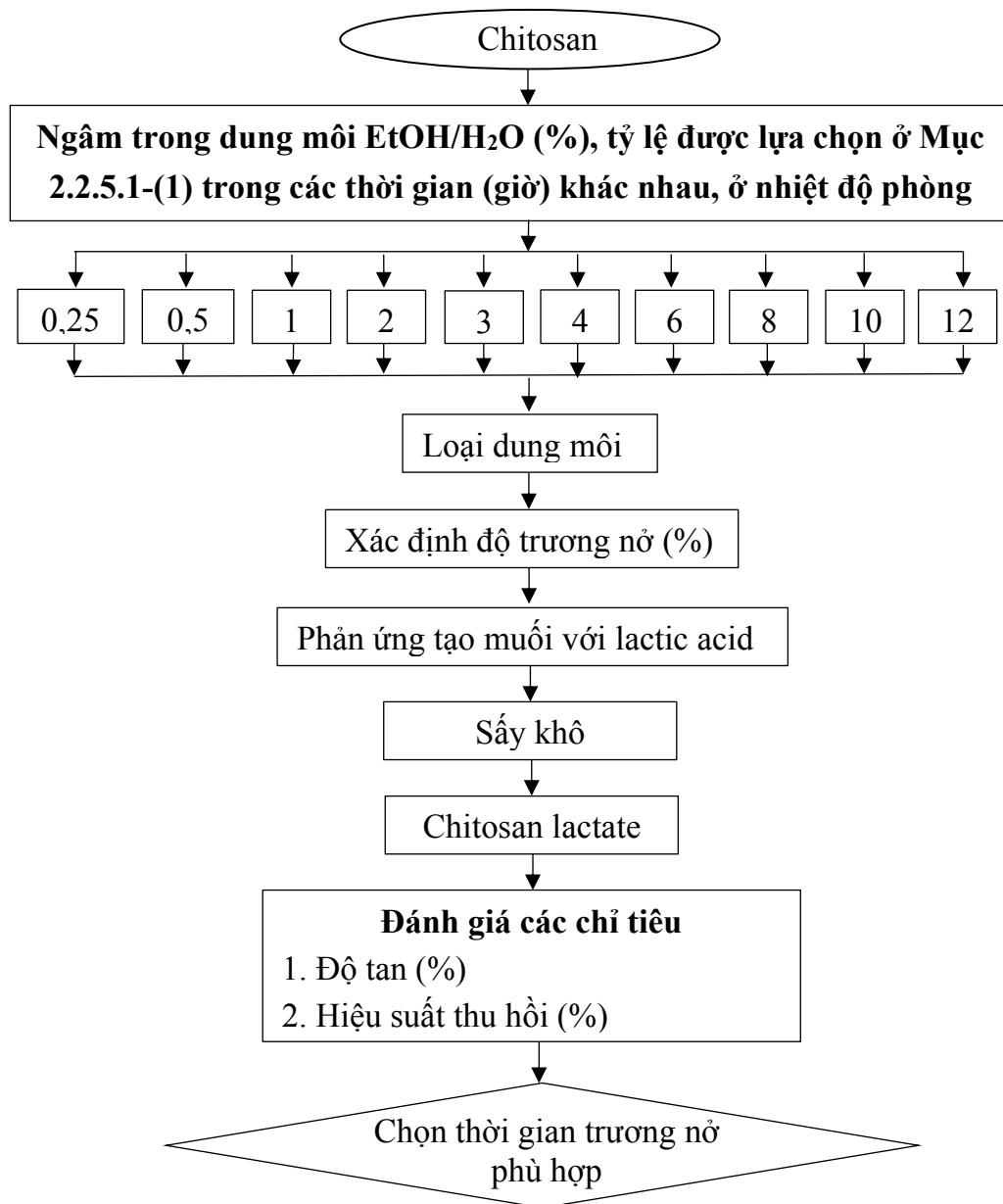
Hình 2.10. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi (EtOH/H₂O, %) đến độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate.

(2) Xác định ảnh hưởng của thời gian ngâm trong hỗn hợp dung môi EtOH/H₂O đến độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi của chitosan lactate

Mục tiêu: Xác định được thời gian ngâm chitosan trong hỗn hợp dung môi EtOH/H₂O phù hợp để thu được chitosan lactate có độ tan và hiệu suất thu hồi tốt nhất.

Cơ sở khoa học: Do nguyên liệu chitosan ở trạng thái rắn, ưa nước nhưng không tan trong nước nên thời gian tiếp xúc càng dài thì lượng nước thẩm thấu vào cấu trúc bên trong của khối chitosan càng lớn. Tuy nhiên, nếu ngâm trong thời gian quá dài sẽ

dẫn tới giảm hiệu quả và khả năng ứng dụng của quy trình trong sản xuất thực tiễn. Do vậy, các thí nghiệm được thiết kế trong khoảng thời gian trương nở từ 0,25 đến 12 giờ.



Hình 2.11. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của thời gian ngâm hỗn hợp dung môi EtOH/H₂O (%) đến độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate.

Cách tiến hành thí nghiệm:

Chitosan (5g) được ngâm trong 50 ml hỗn hợp dung môi EtOH/H₂O (% v/v) với tỷ lệ EtOH (%) được chọn ở Mục 2.2.5.1-(1), trong các khoảng thời gian khác nhau từ 0,25 đến 12 giờ. Sau đó, loại dung môi và đánh giá độ trương nở.

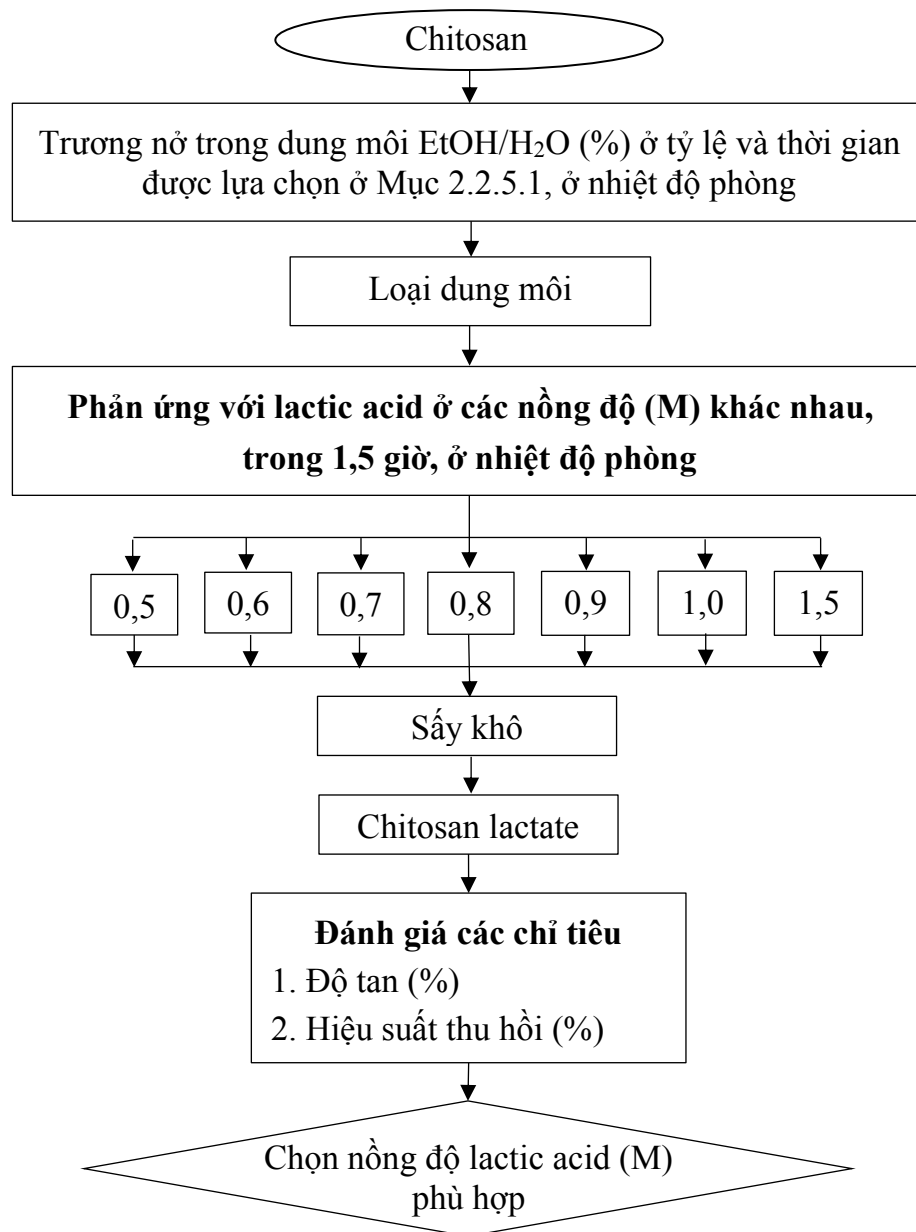
Chitosan sau khi trương nở cho phản ứng với lactic acid 1M (1/10), khuấy đảo đều trong 1,5 giờ ở nhiệt độ phòng. Lọc bỏ dung dịch acid dư và rửa 2 lần với EtOH 85% (10 phút/lần) và ngâm EtOH 99,5% trong thời gian 30 phút, làm khô chitosan

lactate ở 40°C bằng thiết bị sấy không khí nóng. Tiến hành xác định các chỉ tiêu về độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate để từ đó xác định được thời gian trương nở chitosan phù hợp.

2.2.5.2. Xác định ảnh hưởng điều kiện phản ứng giữa chitosan với lactic acid đến độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate

- (1) Xác định ảnh hưởng của nồng độ lactic acid đến độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate

Mục tiêu: Xác định được nồng độ lactic acid phù hợp để phản ứng với chitosan nhằm thu được chitosan lactate có độ tan và hiệu suất thu hồi cao.



Hình 2.12. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nồng độ lactic acid đến độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate.

Cơ sở khoa học:

Khả năng hòa tan trong nước của muối chitosan phụ thuộc vào nồng độ của acid phản ứng đến hàm lượng glucosamine của chitosan, độ deacetyl (số nhóm amin trong chuỗi) của chitosan và nồng độ acid phản ứng [59, 154, 198]. Lượng acid phản ứng thiếu hoặc dư đều ảnh hưởng đến độ hiệu quả phản ứng. Do vậy, khi cho phản ứng chitosan với lactic acid ở nồng độ nhất định sẽ thu được sản phẩm muối có độ hòa tan cao [119].

Cách tiến hành thí nghiệm:

Sau khi tiến hành trương nở 5g chitosan (kích thước 35 mesh) trong dung môi EtOH/H₂O (% v/v) với tỷ lệ 1/10 (w/v) ở nồng độ và thời gian ngâm được lựa chọn ở Mục 2.2.5.1. Loại bỏ dung môi và cho phản ứng chitosan sau trương với 50 ml dung dịch lactic acid ở các nồng độ mol khác nhau: 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 và 1,5M, trong 1,5 giờ ở nhiệt độ phòng. Chitosan lactate được rửa bằng EtOH 85% (10 phút x 2 lần) và ngâm EtOH 99,5% trong 30 phút, sấy ở 40°C. Tiến hành đánh giá các chỉ tiêu về độ tan và hiệu suất thu hồi của chitosan lactate để từ đó lựa chọn nồng độ lactic acid phù hợp.

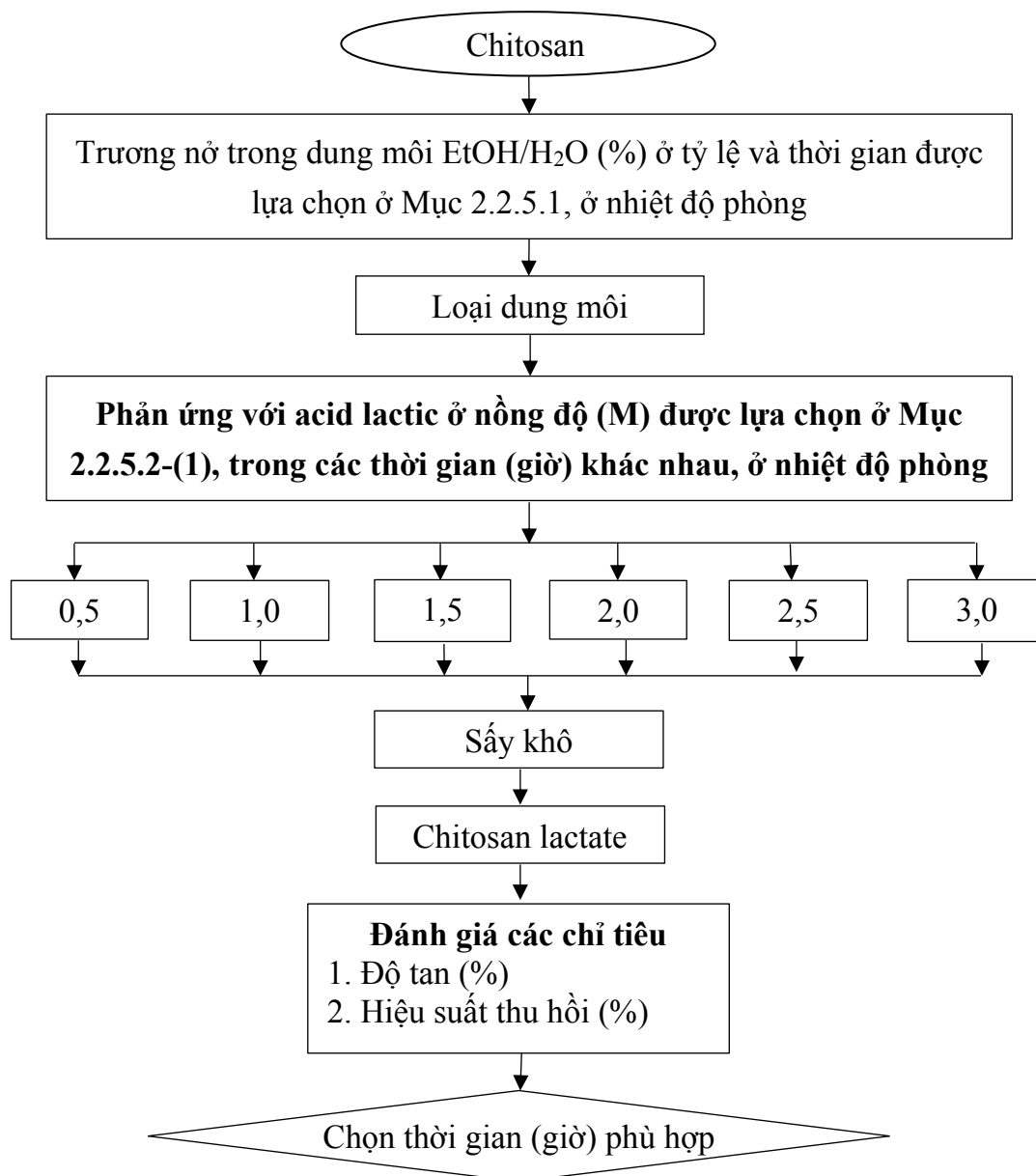
- (2) Xác định ảnh hưởng của thời gian phản ứng giữa chitosan với lactic acid đến độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate

Mục tiêu: Xác định được thời gian phù hợp để phản ứng giữa chitosan với lactic acid thu được chitosan lactate có độ tan và hiệu suất thu hồi cao.

Cơ sở khoa học: Thời gian phản ứng giữa chitosan với acid hữu cơ có ảnh hưởng đến độ tan của muối chitosan [119].

Cách tiến hành thí nghiệm:

Chitosan (kích thước 35 mesh) sau khi được trương trong hỗn hợp dung môi EtOH/H₂O (% v/v) với tỷ lệ 1/10 (w/v) ở nồng độ và thời gian ngâm được lựa chọn ở Mục 2.2.5.1. Loại bỏ dung môi và cho chitosan sau trương nở phản ứng với 50 ml dung dịch lactic acid ở các nồng độ được chọn ở Mục 2.2.5.2-(1), ở nhiệt độ phòng, trong khoảng thời gian phản ứng từ 0,5 – 3 giờ. Chitosan lactate được rửa bằng EtOH 85% (10 phút x 2 lần) và ngâm EtOH 99,5% trong 30 phút, sấy ở 40°C. Tiến hành xác định các chỉ tiêu về độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate để từ đó lựa chọn thời gian phản ứng phù hợp.



Hình 2.13. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của thời gian phản ứng tạo muối đến độ tan và hiệu suất thu hồi tương đối của chitosan lactate.

2.2.5.3. Đề xuất quy trình điều chế chitosan lactate và phân tích các tính chất lý hóa của sản phẩm

Mục tiêu: Đề xuất được quy trình điều chế chitosan lactate từ chitosan vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có độ tan tốt, hiệu suất thu hồi cao và tính chất tương đương sản phẩm thương mại.

Cơ sở khoa học: Từ các kết quả xác định điều kiện thích hợp để xử lý chitosan trước phản ứng và điều kiện phản ứng điều chế muối lactate từ chitosan vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng được xác định qua các thí nghiệm ở Mục 2.2.5.1 và 2.2.5.2, đề xuất quy trình điều chế chitosan lactate từ chitosan vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng. Tiến

hành sản xuất thử nghiệm 25 g chitosan/mẻ điều chế chitosan lactate theo quy trình đề xuất, phân tích đặc tính sản phẩm và xác định hiệu suất điều chế để đánh giá tính ổn định của quy trình.

Cách tiến hành thí nghiệm:

Chuẩn bị nguyên liệu nhằm so sánh các sản phẩm chitosan lactate được điều chế theo quy trình được chọn gồm: chitosan thu từ vỏ lột xác (sản phẩm của luận án), chitosan mua của công ty VNF (chọn chitosan có tính chất cơ bản tương đương với sản phẩm của luận án).

Thực hiện đúng các bước đã được trình bày ở các Mục trên gồm: Ngâm trương nở chitosan với tỷ lệ hỗn hợp dung môi EtOH/H₂O (%) phù hợp ở nhiệt độ phòng và loại dung môi sau thời gian ngâm đã chọn; Chitosan sau trương được phản ứng với acid lactic với nồng độ và thời gian phản ứng phù hợp ở nhiệt độ phòng. Tiến hành rửa loại acid dư bằng cách dùng hỗn hợp dung môi EtOH/H₂O (85%) và EtOH 99,5%, sấy khô sản phẩm chitosan lactate ở 40°C. Tiến hành phân tích các chỉ tiêu lý hóa (sử dụng các kỹ thuật: FTIR, NMR, XRD) và so sánh giữa các mẫu chitosan lactate thu nhận từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng (sản phẩm của đề tài luận án), chitosan lactate thu nhận từ vỏ tôm thải ra từ quá trình chế biến thủy sản (mua từ công ty VNF) và sản phẩm chitosan lactate thương mại mua từ công ty MarkNature.

2.2.6. Nghiên cứu thu nhận vi tảo *Nannochloropsis* sp. bằng chitosan lactate

2.2.6.1. Xác định ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate sử dụng thu hồi vi tảo đến hiệu suất lắng theo thời gian thu hoạch

Mục tiêu: Xác định được nồng độ chitosan lactate thích hợp để tạo kết bông vi tảo *Nannochloropsis* sp.

Cơ sở khoa học:

Chitosan là polyme sinh học đang được xem như là một phụ gia sử dụng an toàn trong công nghệ thực phẩm thức ăn nuôi thủy sản, đặc biệt là ứng dụng thu hồi vi tảo vì không để lại chất bẩn sau quá trình thu hồi [144]. Nhưng, hiệu quả thu hồi chitosan còn thấp đối với các loài vi tảo nước biển (chỉ dễ thu đối với các loài vi tảo nước ngọt) và chi phí cao hơn các chất keo tụ khác. Tuy nhiên, một số trường hợp trong ứng dụng thực phẩm, chitosan vẫn được xem xét nghiên cứu sử dụng nhờ tính an toàn sinh học, kháng khuẩn, chống oxy hóa, tính hấp phụ [21, 43, 60, 65, 93, 115, 183, 191]. Hiện nay, các phương pháp keo tụ bằng các hợp chất vô cơ đã được đánh giá rằng gây ô nhiễm sinh khối vi tảo, tác động bất lợi khi sử dụng làm thực phẩm cho người và động vật [153]. Hơn nữa, phương pháp keo tụ vi tảo bằng chitosan là phương pháp ít tiêu hao chi phí năng lượng so với các phương pháp khác (lắng, ly tâm, vi lọc...), nên đang được các

nhà khoa học ưu tiên nghiên cứu nhằm nâng cao chất lượng sản phẩm dịch vi tảo cô đặc và giảm chi phí sản xuất [35, 79, 113, 118, 153]. Chitosan lactate là một dẫn xuất của chitosan tan được trong nước và tính chất không bị thay đổi [119]. Chitosan lactate được hình thành khi các nhóm amin ($-NH_2$) trong mạch chitosan được proton hóa ($-NH_3^+-OCO-C(OH)CH_3$) bằng lactic acid, nhờ liên kết tĩnh điện ở vị trí cacbon số 2 [119]. Sau khi hình thành muối chitosan (dạng hạt hoặc vảy), hầu hết các phương pháp điều chế muối đều có công đoạn rửa acid dư trên bề mặt hạt/vảy nên pH của dung dịch muối chitosan hòa tan trong nước thường cao hơn dung dịch chitosan được hòa tan trong dung dịch acid loãng. Chitosan lactate có độ hòa tan trong nước cao nên sẽ giúp cho quá trình keo tụ vi tảo dễ dàng hơn nhờ vào các tua chitosan nhanh chóng bao bọc các hạt vi tảo và tạo nhiều mạng lưới bẫy vi tảo kết bông thông qua liên kết bắc cầu [35, 43], hạn chế hiện tượng tua gel chitosan cục bộ ở môi trường pH cao.

Theo nghiên cứu của García và cộng sự (2016) [89] muối chitosan phù hợp cho việc keo tụ các hợp chất hữu cơ làm trong nước ép trái cây, rau quả, rượu vang, trà xanh và mật hoa. Muối chitosan được xem là an toàn cho con người nhờ tính an toàn sinh học và được đề xuất sử dụng thay thế chitosan hòa tan trong acid hữu cơ nhờ khả năng hòa tan trong nước của chúng. Chitosan lactate mang lại hiệu quả keo tụ và chất lượng tổng thể của sản phẩm thu cao hơn so với sử dụng chitosan acetate.

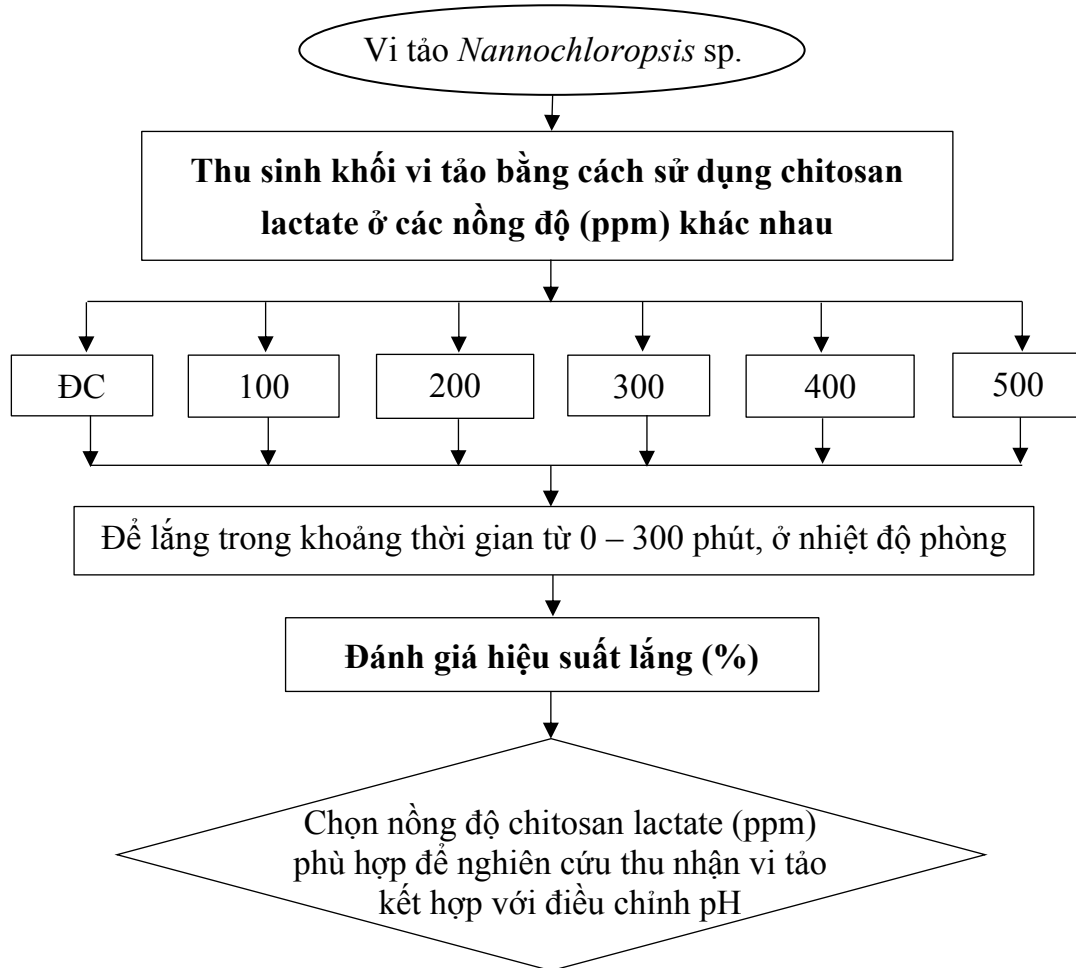
Nồng độ chitosan sử dụng keo tụ vi tảo phụ thuộc vào loài, mật độ vi tảo, môi trường nước nuôi... [95, 159]. Đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào sử dụng các muối chitosan để ứng dụng thu hồi sinh khối vi tảo cô đặc, đặc biệt đối với loài vi tảo biển. Vậy nên nghiên cứu này đã tiến hành khảo sát sơ bộ khoảng nồng độ của chitosan lactate và xác định khả năng kết bông vi tảo *Nannochloropsis* sp. trong khoảng nồng độ 100 – 500 ppm. Do chitosan tích điện dương nên hiệu quả kết bông vi tảo phụ thuộc vào khả năng trung hòa điện tích chuyển điện thế zeta của các tế bào vi tảo (tích điện âm) giảm dần về 0, tại thời điểm này bông vi tảo được tạo thành khối lớn và lắng xuống [35, 201]. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ chitosan quá cao sẽ ngăn cản quá trình kết bông và hiệu quả thu thấp [24, 25].

Cách tiến hành thí nghiệm:

Vi tảo *Nannochloropsis* sp. được cho vào cốc thủy tinh và bổ sung dung dịch muối chitosan lactate vào dịch tảo một cách từ từ với các nồng độ khác nhau: 0 (ĐC: đối chứng), 100, 200, 300, 400 và 500 (ppm). Hỗn hợp được khuấy dưới thiết bị Jarrest SW6 Stuart với tốc độ 100 rpm trong 15 phút [65, 66]. Sau đó chuyển vào ống đong 100 ml và quan sát hiện tượng kết bông và lắng vi tảo.

Lấy mẫu đo mật độ quang (OD) của dịch vi tảo trên máy quang phổ DR6000 tại bước sóng 490 nm để xác định hiệu suất lắng của vi tảo. Lấy mẫu tại vị trí 2/3 chiều cao

của mẫu được chứa trong ống đong 100 ml (Hình 2.17) theo các thời điểm khác nhau: 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 và 300 (phút), từ đó xác định nồng độ chitosan lactate phù hợp.



Hình 2.14. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate đến hiệu suất lắng vi tảo theo thời gian thu hoạch.

2.2.6.2. Xác định ảnh hưởng của kết hợp thu vi tảo bằng chitosan lactate với điều chỉnh pH đến hiệu suất lắng theo thời gian thu hoạch

Mục tiêu: Xác định được điều kiện thích hợp để kết bông vi tảo *Nannochloropsis* sp. bằng phương pháp kết hợp dùng chitosan lactate và điều chỉnh pH.

Cơ sở khoa học:

Hiệu quả keo tụ của chitosan lactate phụ thuộc vào độ pH của môi trường, do độ pH ảnh hưởng đến các điện tích trên các nhóm amin của chitosan (Blockx và cộng sự, 2018). Do vậy, hiệu quả kết bông vi tảo khi sử dụng chitosan đã được quan sát thấy không đạt kết quả cao và sẽ tăng lên đáng kể nếu có kết hợp với điều chỉnh độ pH của môi trường nước nuôi tăng lên đến 10,0 [65, 66]. Ngoài ra, Grima và cộng sự (2003)

[95] và Rashid và cộng sự (2013) [153] nhận định hiệu quả keo tụ tăng cao khi kết hợp phương pháp sử dụng chất trợ lắng và điều chỉnh pH, do sự thay đổi điện tích bề mặt vi tảo có ảnh hưởng đến sự tương tác giữa các hạt với nhau, với điện tích của chitosan và pH môi trường. Điều này giúp cho việc loại nước thu sinh khối vi tảo dạng sệt dễ dàng hơn, tăng hiệu quả thu sinh khối cô đặc.

Nannochloropsis sp. là loài vi tảo biển cần được nghiên cứu thu nhận bằng cách kết hợp sử dụng muối chitosan làm chất trợ lắng kết hợp điều chỉnh pH môi trường. Do, trong môi trường nước biển có cường độ ion cao gây ức chế quá trình keo tụ, nên khó thu hơn là loài vi tảo nước ngọt [43, 95, 149]. Ngoài ra, Blockx và cộng sự (2018) [43] cho rằng sự keo tụ của chitosan ở pH cao trong môi trường nước biển là do sự kết tủa của chitosan ở môi trường pH > 7,5, nên hiệu suất thu không cao như phương pháp điều chỉnh pH môi trường. Điều này được giải thích do một phần các nhóm amin của mạch chitosan bị khử, dẫn đến sự hình thành mạng lưới đột ngột gây ra hiện tượng keo tụ theo cơ chế quét. Nhưng, các tác giả cũng cho rằng cơ chế quét vi tảo và tạo bông của chitosan không liên quan đến sự kết tủa của các tủa hydroxid kim loại (được gọi là keo tụ tự động).

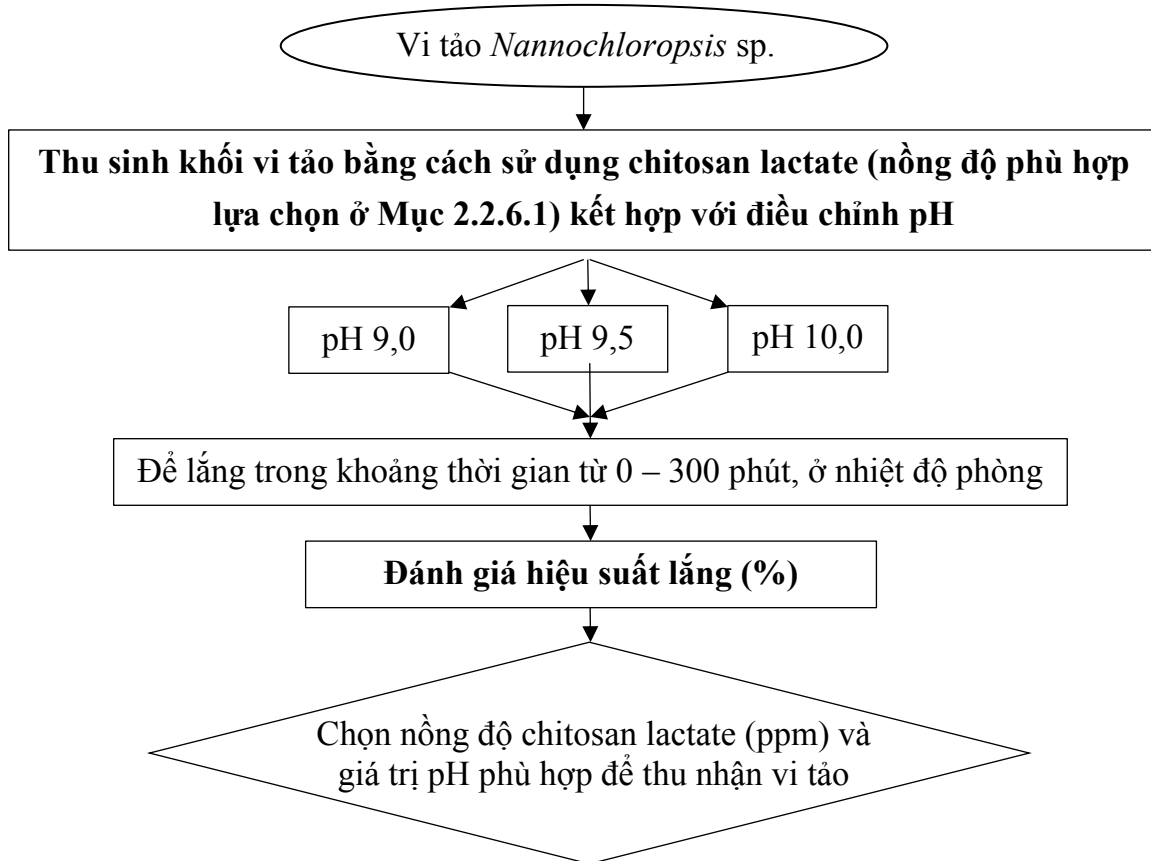
Tiến hành keo tụ bằng chitosan lactate nên được thực hiện trước khi tiếp tục điều chỉnh pH để tăng hiệu quả thu. Bởi vì, chitosan đã được minh chứng cho thấy có khả năng giảm tỷ lệ tách nước của vi tảo nhờ sự bao bọc tế bào [35]. Vậy, việc kết bông vi tảo bằng chitosan hay dẫn xuất của nó để tạo màng sinh học trước khi điều chỉnh độ pH nhằm làm giảm khả năng tác động lên màng tế bào khi pH của môi trường kiềm cao, giải phóng các hoạt chất có trong vi tảo [40, 158] và dễ hư hỏng khi bị tách ra ở dạng tự do.

Cách tiến hành thí nghiệm:

Vi tảo *Nannochloropsis* sp. được cho vào cốc thủy tinh. Chitosan lactate được bổ sung với lượng phù hợp được xác định ở Mục 2.2.6.1 và khuấy đều 10 phút [153]. Sau đó hỗn hợp được điều chỉnh pH về các giá trị pH 9,0, pH 9,5, pH 10,0 bằng dung dịch NaOH 1M [200], và khuấy đều 5 phút. Hỗn hợp được khuấy dưới thiết bị Jar-test SW6 Stuart với tốc độ 100 rpm và tổng thời gian là 15 phút. Sau đó chuyển vào ống đong 100 ml và quan sát hiện tượng kết bông và lắng vi tảo.

Lấy mẫu đo độ quang học (OD) của dịch vi tảo trên máy quang phổ DR6000 tại bước sóng 490 nm để xác định hiệu suất lắng của vi tảo. Lấy mẫu tại vị trí 2/3 chiều cao của mẫu được chứa trong ống đong 100 ml (Hình 2.17) theo các thời điểm khác nhau: 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 và 300 (phút), từ đó xác định nồng độ chitosan lactate và giá trị pH phù hợp.

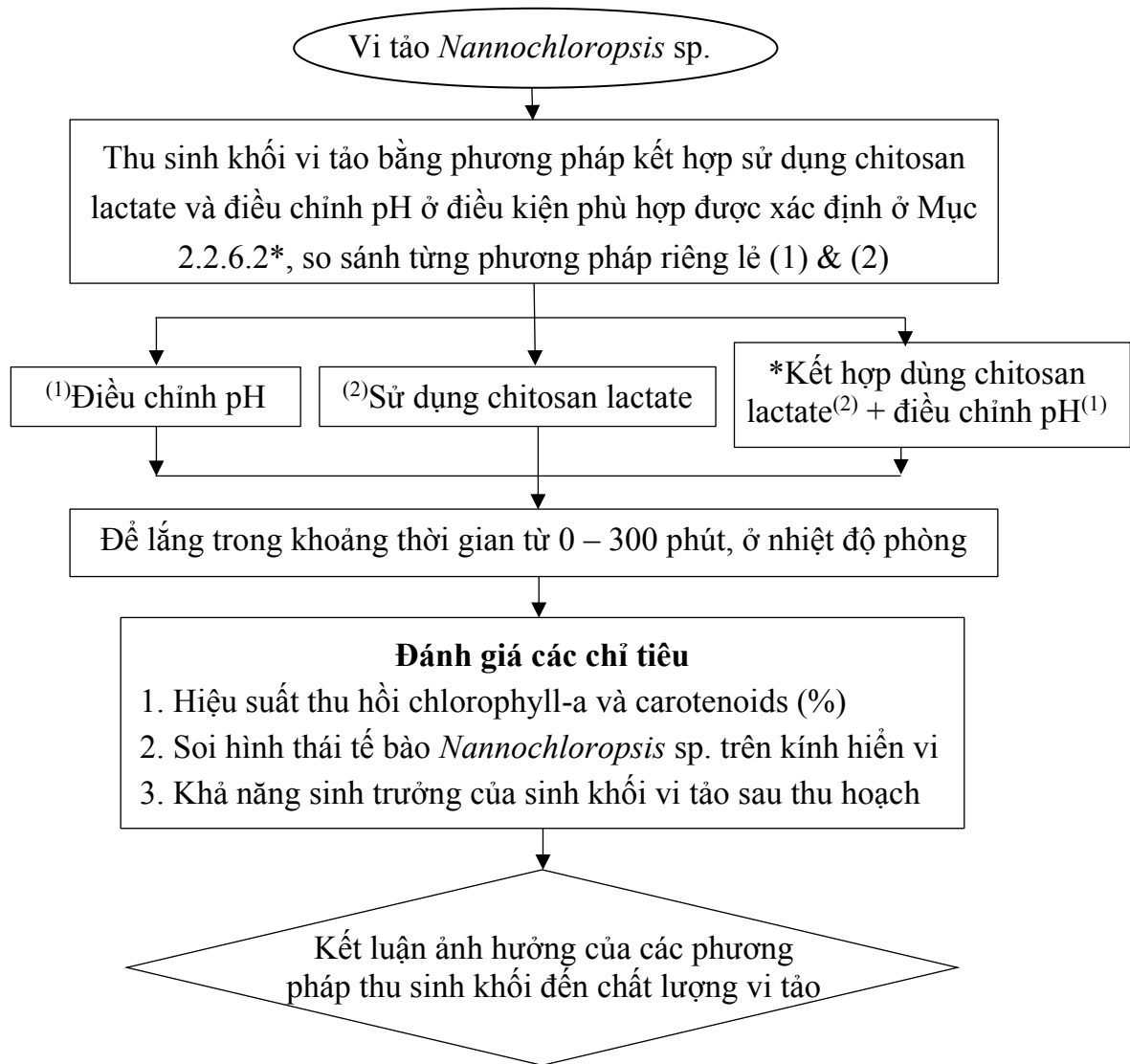
Sau khi chọn được phương pháp phù hợp để thu hoạch vi tảo *Nannochloropsis* sp., tiến hành so sánh các loại muối chitosan lactate (CTS lactate từ nguồn vỏ lột xác, CTS lactate từ nguồn vỏ tôm chế biến (công ty VNF) được điều chế cùng quy trình đề xuất ở Mục 2.2.5.3 và CTS lactate thương mại từ công ty MarkNature) và đánh giá hiệu quả thu hoạch.



Hình 2.15. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của phương pháp kết hợp sử dụng chitosan lactate và điều chỉnh pH đến hiệu suất lắng vi tảo theo thời gian thu hoạch.

2.2.6.3. *Xác định ảnh hưởng của phương pháp thu sinh khối vi tảo đến hiệu suất thu hồi lượng chlorophyll-a, carotenoids và khả năng sinh trưởng của sinh khối sau thu hoạch*

Mục tiêu: Xác định được phương pháp thích hợp để kết bông vi tảo nhằm duy trì tối đa hàm lượng chlorophyll-a, carotenoids có trong sản phẩm thu hoạch và sinh khối vi tảo sau thu có khả năng sinh trưởng, đáp ứng nhu cầu sử dụng trong ngành nuôi trồng thủy sản.



Hình 2.16. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của phương pháp thu sinh khối vi tảo đến hiệu suất thu hồi chlorophyll-a, carotenoids và khả năng sinh trưởng của sinh khối sau thu hoạch.

Cơ sở khoa học:

Tế bào vi tảo có thể bị tác động và giải phóng các chất dinh dưỡng bên trong khi ứng dụng các phương pháp keo tụ. Hiệu quả thu càng tăng thì khả năng ảnh hưởng đến màng tế bào càng lớn [40].

Sự kết hợp sử dụng cánh khuấy ở tốc độ thấp giúp các chất keo tụ và tế bào vi tảo phân tán đồng đều, dễ dàng tiếp xúc đến gần nhau hơn. Tuy nhiên, tế bào vi tảo cũng có thể bị phá vỡ do lực cắt của cánh khuấy [63, 95] có thể ảnh hưởng đến chất lượng sinh khối vi tảo sau thu hoạch.

Cách tiến hành thí nghiệm:

Vi tảo *Nannochloropsis* sp. được cho vào cốc thủy tinh và tiến hành thu hoạch theo 3 phương thức: (1) Phương pháp đối chứng (ĐC) điều chỉnh pH ở giá trị được chọn

khi áp dụng phương pháp kết hợp ($ĐC_{pH}$), (2) Phương pháp đối chứng ($ĐC$) thu hoạch bằng cách bổ sung chitosan lactate với nồng độ đã được xác định khi áp dụng phương pháp kết hợp ($ĐC_{CTs}$) và (3) Phương pháp kết hợp sử dụng chitosan lactate và điều chỉnh pH ở giá trị phù hợp được chọn tại Mục 2.2.6.2. Hỗn hợp dịch vi tảo được khuấy đều khi bổ sung chitosan lactate và điều chỉnh pH dưới thiết bị Jartest SW6 Stuart với tốc độ 100 rpm trong 15 phút. Sau đó chuyển vào ống đông, để yên cho vi tảo kết bông và lắng xuống đáy. Sau đó, tiến hành loại nước và thu mẫu dịch nhão tại thời điểm được chọn tại Mục 2.2.6.3. Tiến hành phân tích hàm lượng chlorophyll-a và carotenoids có trong mẫu dịch vi tảo trước khi thu và sau khi thu để xác định hiệu suất thu hồi các hoạt chất màu này có trong mẫu sau thu. Quan sát hình thái tế bào sau khi kết bông của các mẫu sinh khối thu hồi bằng các phương pháp khác nhau dưới kính hiển vi Olympus BX41TF. Nuôi cấy sinh khối vi tảo từ các dịch cô đặc vi tảo thu được bằng các phương pháp khác nhau và xác định mật độ tế bào/ml dịch vi tảo lúc 15 giờ sau 1 ngày nuôi, 6 ngày nuôi và quan sát đến 12 ngày nuôi.

2.3. Phương pháp phân tích

- Hàm lượng khoáng, ẩm được xác định theo phương pháp AOAC [29].
- Hàm lượng protein của vỏ lột xác của tôm được xác định theo phương pháp Biuret và hàm lượng protein của chitin, chitosan được xác định theo phương pháp Micro-Biuret, sử dụng Bovine Serum Albumin (BSA) làm chuẩn [185]. Hàm lượng protein có trong vi tảo được xác định theo phương pháp Biuret, sử dụng Bovine Serum Albumin (BSA) làm chuẩn. Mẫu sinh khối vi tảo xác định theo phương pháp của Dorsey và cộng sự (1978) [80].
- Hàm lượng chitin của vỏ tôm lột xác được xác định theo phương pháp của Black và Schwartz (1950) [39].
- Hàm lượng carotenoid trong vỏ tôm nguyên liệu được xác định theo phương pháp so màu quang phổ hấp thu DR 6000 (HACH, DR 6000, LPG441.99.00002, 1850447, Germany) [167].
- Hàm lượng lipid trong vỏ tôm và vi tảo được xác định theo phương pháp của Bligh và Dyer (1959) [42].
- Hàm lượng carbohydrate trong vi tảo bằng phương pháp phenol-sulphuric acid [124].
- Hàm lượng chlorophyll-a và carotenoids trong vi tảo được xác định bằng phương pháp của Sumanta và cộng sự (2014) [179].
- Mật độ tế bào được xác định tại thời điểm đầu của pha ổn định (Stationary phase) thông qua việc đếm số lượng tế bào vi tảo bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer improved, China.

- Kiểm soát độ mặn của môi trường nước biển nuôi vi tảo bằng thiết bị đi khúc xạ kế S-10E.
- Hình ảnh soi hình thái của chitosan ban đầu, chitosan sau trương nở và tế bào vi tảo chụp trên kính hiển vi Olympus BX41TF, 2K07583, Japan.
- Độ deacetyl (DD) của chitosan được xác định theo phương pháp của [199].
- Khối lượng phân tử trung bình (M_w) của chitosan được xác định thông qua độ nhớt nội bằng nhớt kế Ubbelohde 513 Io/13 (đường kính 0,2 mm) ở 25°C, SI Analytics GmbH, D-55122 Mainz, AVS 470, 00008927, Germany, công thức tính theo Mark-Houwink [205].
- Xác định độ hòa tan của chitosan và chitosan lactate [130].
- Độ trương nở của chitosan trong dung môi được xác định theo phương pháp của Minh và cộng sự (2017) [129].
- Độ nhớt biểu kiến được xác định bằng nhớt kế Brookfield (AMETEK BROOKFIELD, DVEELVTJ0 8748506, USA) ở 25°C (Spindle LV2 – Code 63, 30 rpm) sau khi hòa tan chitosan hoàn toàn trong acid acetic 1% với nồng độ 1g/100mL. Độ nhớt biểu kiến được xác định bằng nhớt kế Brookfield ở 25°C (Spindle LV1 – Code 61, 30 rpm) sau khi hòa tan chitosan lactate hoàn toàn trong nước cất với nồng độ 1g/100mL.
- Hình ảnh soi vỏ lột xác, chitin, chitosan chụp trên kính hiển vi điện tử (SEM), S-4800, Hitachi.
- Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) của chitin, chitosan, chitosan lactate được đo trên thiết bị Nicolet iS10, Thermo Scientific, được đo trong phạm vi 500 – 4000 cm^{-1} ở độ phân giải 16 cm^{-1} trong vòng 32 lần quét.
- Phổ nhiễu xạ tia X (XRD) của vỏ tôm lột, chitin, chitosan, chitosan lactate được đo trên thiết bị PANalytical, X'Pert-PRO-MPD, sử dụng tia chiếu xạ Cu K α ($\lambda=1,54\text{\AA}$) với hiệu điện thế 40kV và cường độ 40mA, góc quét $4^\circ < 2\theta < 44^\circ$, bước quét $0,05^\circ$, tốc độ quét $1^\circ/\text{min}$, ở 25°C. Xác định độ kết tinh tương đối (CrI) của các mẫu trên phổ XRD được tính bằng cách chia diện tích của các đỉnh tinh thể tại 20° cho tổng diện tích hai đỉnh cụ thể tại 2θ trong khoảng 10° và 20° [23].
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$) của chitosan, chitosan lactate được đo trên thiết bị quang phổ AV300 MHz, Bruker, Hoa Kỳ. Cân khoảng 20 mg chitosan được thêm vào một ống NMR có chứa 1 ml dung dịch D_2O (1ml 99,9% D_2O và 2 μl DCl) cho chitosan và sau đó được đun nóng ở 35°C trong 45 phút để tăng độ hòa tan.

2.4. Phương pháp tính toán và xử lý số liệu

2.4.1. Phương pháp tính toán

Ước tính sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có thể thu nhận từ quá trình nuôi thâm canh:

Sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có thể thu hồi từ quá trình nuôi thâm canh được ước tính theo công thức sau:

$$G = \frac{M_S}{M_0} \quad (1.1)$$

Trong đó:

G (kg/kg) là sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có thể thu hồi từ quá trình nuôi thâm canh.

M_S (kg) là lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có thể thu hồi và M_0 (kg) là lượng tôm thương phẩm thu hoạch được từ cùng một vụ nuôi thâm canh.

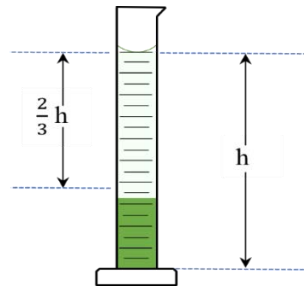
Hiệu suất thu hồi của sản phẩm:

Xác định hiệu suất thu hồi (tương đối) (RE) theo công thức (1.2). Trong đó, M và R (g) là khối lượng mẫu ban đầu và mẫu sau khi xử lý.

$$RE (\%) = \frac{R \cdot 100}{M} \quad (1.2)$$

Xác định hiệu suất lắng của sinh khối vi tảo:

Hiệu quả thu hồi của quá trình keo tụ sinh khối vi tảo được xác định thông qua chỉ tiêu hiệu suất lắng của sinh khối vi tảo. Hiệu suất lắng (FE: Flocculation efficiency) được xác định bằng cách đo mật độ quang học (OD) tế bào vi tảo trước và sau khi tiến hành keo tụ dung dịch trong môi trường nuôi. Mật độ quang học (OD) được đo trên máy quang phổ UV-VIS ở bước sóng 490 nm (bước sóng được chọn sau khi quét mẫu trên thiết bị đo quang phổ DR 6000 (HACH, DR 6000, LPG441.99.00002, 1850447, Germany) được nhận diện cao nhất). Phương pháp lấy mẫu: Dịch vi tảo được cho vào ống đong 100 mL để quan sát hiện tượng lắng của vi tảo. Tiến hành lấy mẫu đo mật độ quang học (OD) của vi tảo tại vị trí có khoảng cách $(2/3)h$, h là chiều cao của dịch vi tảo ban đầu và h_c là chiều cao của phần chất rắn lắng được (Hình 2.17), OD được xác định tại bước sóng 490 nm trên máy quang phổ DR6000.



Hình 2.17. Phương pháp xác định chiều cao cột lắng để lấy mẫu [175]

Công thức tính hiệu suất lắng (1.3) bằng phương pháp đo mật độ quang học [175]:

$$FE (\%) = \frac{OD_d - OD_s}{OD_d} \times 100 \quad (1.3)$$

Trong đó, OD_d : mật độ quang học của dung dịch tảo trước khi keo tụ, OD_s : mật độ quang học của dung dịch sau khi keo tụ.

Xác định hiệu suất thu hồi của các chất màu:

Xác định hiệu suất thu hồi hàm lượng của các chất màu (chlorophyll-a: RE_{Ch-a} , carotenoid tổng số: $RE_{Carotenoid}$) theo công thức (1.4) và (1.5):

$$RE_{Ch-a} (\%) = \frac{Ch_s \times 100}{Ch_T} \quad (1.4)$$

$$RE_{Carotenoids} (\%) = \frac{C_s \times 100}{C_T} \quad (1.5)$$

Trong đó, Ch_T , $C_T(g)$ là lượng chlorophyll-a, carotenoids trong mẫu vi tảo ban đầu; Ch_s , C_s là lượng chlorophyll-a, carotenoids trong mẫu sinh khối vi tảo sau khi thu hoạch.

Xác định khả năng sinh trưởng của vi tảo:

Khả năng sinh trưởng của sinh khối vi tảo được xác định bằng cách cấy sinh khối vi tảo đã thu được vào môi trường nuôi cấy F/2 (đã được hấp thanh trùng) trong điều kiện nước mặn 25 – 35‰. Sục khí liên tục trong quá trình nuôi, nhiệt độ duy trì ở $25 \pm 2^\circ C$, cường độ chiếu sáng khoảng 1000 - 3000 lux, pH môi trường không chế trong khoảng 7,5 – 8,5. Mật độ tế bào được xác định thông qua việc đếm số lượng tế bào bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer improved, China.

2.4.2. Xử lý số liệu

Số liệu báo cáo là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm lặp lại với 3 lần phân tích, có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm IBM SPSS Statistics 20 để so sánh giá trị trung bình của các mẫu nghiên cứu. Sử dụng phần mềm Microsoft Excel, Visio Profesional, Origin để vẽ các sơ đồ khối, đồ thị, các phổ FTIR, XRD.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thực trạng và tiềm năng sử dụng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng làm nguyên liệu sản xuất chitin, chitosan

3.1.1. Thực trạng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng tại cơ sở nuôi tôm thâm canh

Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát thực tế tại cơ sở nuôi tôm thâm canh tại miền Trung (trại Thực nghiệm NTTS Chính Mỹ - Ninh Hòa, Khánh Hòa) để làm cơ sở đánh giá tiềm năng sử dụng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng làm nguyên liệu sản xuất chitin, chitosan.

Trại nuôi tôm Thực nghiệm Chính Mỹ áp dụng kỹ thuật nuôi thâm canh với 3 giai đoạn nuôi [12], các ao nuôi được lót bạt chuyên dụng có độ dày 0,3 – 0,5 mm. (1) Ao ương giống có diện tích khoảng 500 m² theo thiết kế hình tròn, mật độ thả giống là 200 con/m², tôm được nuôi trong 20 ngày đầu; (2) Ao nuôi sinh trưởng (ao trung gian) có diện tích 800 m², thiết kế hình vuông được bo tròn góc, tiếp tục nuôi 20 ngày; (3) Ao nuôi thương phẩm (Hình 3.1) được thiết kế hình vuông được bo tròn góc, có diện tích là 1500 m², chiều sâu là 250 cm với mực nước dao động là 140 – 160 cm, hệ số mái bờ là 1,25 để đảm bảo dòng chảy tốt trong ao. Ao thương phẩm được trang bị 4 giàn quạt nước với tốc độ quay là 60 – 80 vòng/phút và hệ thống sục khí đáy với 40 vòi rải đều quanh bờ ao, công suất máy nén khí là 3 mã lực. Tôm được nuôi từ 41 ngày đến khi thu hoạch (tôm nuôi đạt trên 90 ngày). Thời điểm thu hoạch tôm tránh chu kỳ lột xác (khoảng sau 7 ngày) bằng cách quan sát tôm giảm ăn vào ngày trước và sau khi lột xác, lượng vỏ lột xác thu được. Sản lượng tôm thương phẩm 4,5 – 6 tấn tôm/ao/vụ/năm. Mỗi năm thu hoạch khoảng 5 – 6 vụ/năm tùy thuộc vào thời tiết thuận lợi, tôm có độ tuổi khoảng 90 – 95 ngày nuôi. Nhờ trại áp dụng công nghệ nuôi liên hoàn các ao theo 3 giai đoạn nên số vụ thu hoạch lớn. Sau mỗi vụ ao nuôi được tiến hành vệ sinh và bảo trì bạt lót khoảng 10 ngày.

Lượng vỏ lột xác của tôm khoảng: 14 – 27 kg/ao/ngày (hàm lượng ẩm khoảng 70%), tương đương khoảng 4 – 8 kg vỏ lột xác khô thu được mỗi ngày/ao.

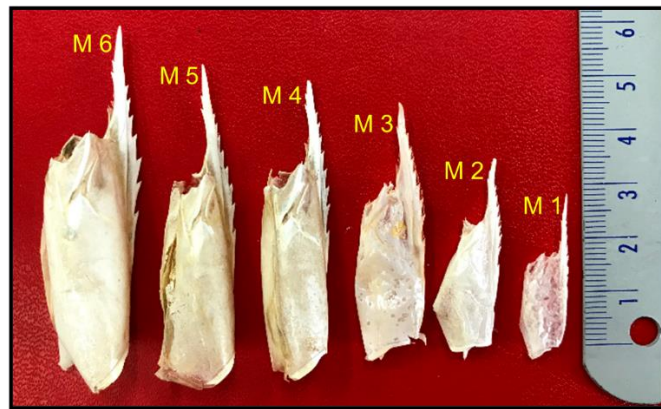


Hình 3.1. Ao nuôi thâm canh thuộc xã Ninh Hòa, Khánh Hòa: (a) ao tôm, (b) hồ lấy chất thải, (c) vỏ tôm lột xác của tôm thẻ chân trắng

Từ thực trạng khảo sát tại cơ sở nuôi tôm thâm canh trên đây nhận thấy, vỏ lột xác của tôm được tạo ra liên tục trong quá trình nuôi thâm canh. Khi diện tích nuôi tăng nhanh thì lượng vỏ lột xác của tôm sẽ tăng đáng kể có thể gây ô nhiễm nguồn nước nuôi hoặc khu vực ao nuôi nếu không được thu gom và xử lý đúng cách. Trong khi đó, vỏ lột

xác của tôm lại chứa các thành phần có giá trị như chitin, khoáng chất. Hơn nữa, vỏ lột xác của tôm có thể thu gom dễ dàng bằng hệ thống xi phông tại các ao nuôi thâm canh. Vì vậy, nghiên cứu khảo sát sản lượng vỏ tôm lột xác theo chu kỳ sinh trưởng, từ đó đề xuất thu gom và sử dụng làm nguyên liệu cho sản xuất các sản phẩm giá trị gia tăng là cần thiết. Nghiên cứu không chỉ nhằm cung cấp thông tin để thu gom và quản lý lượng phế thải trong quá trình nuôi một cách hiệu quả, hạn chế sự ô nhiễm môi trường mà còn định hướng phát triển sản xuất sản phẩm giá trị gia tăng từ nguồn phế liệu ở các ao nuôi thâm canh, góp phần nâng cao hiệu quả kinh tế và giảm lãng phí tài nguyên.

3.1.2. Sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng theo độ tuổi có thể thu hồi trong quá trình nuôi thâm canh



Hình 3.2. Ảnh chụp các mẫu vỏ đầu tôm lột xác khô theo độ tuổi nuôi.

Bảng 3.1. Sản lượng và đặc điểm vỏ tôm lột xác của tôm thẻ chân trắng theo độ tuổi tôm thu tại trại Thực nghiệm Chính Mỹ, Ninh Phú, Khánh Hòa

Mẫu	Độ tuổi (ngày)	Kích cỡ tôm (con/kg)	Sản lượng vỏ (kg/ao/ngày)*	Tỷ lệ vỏ đầu/khối lượng vỏ (%)	Chiều dài vỏ đầu (cm)
M1	41 - 50	387 ± 49 ^d	1,9 ± 0,5 ^a	97,1 ± 0,3 ^e	2,8 ± 0,2 ^a
M2	51 - 60	247 ± 37 ^c	3,7 ± 0,6 ^b	91,1 ± 0,3 ^d	3,5 ± 0,1 ^b
M3	61 - 70	123 ± 16 ^b	5,2 ± 0,3 ^c	82,7 ± 0,8 ^c	4,1 ± 0,3 ^c
M4	71 - 80	88 ± 11 ^{ab}	7,2 ± 0,9 ^d	77,6 ± 1,2 ^b	4,8 ± 0,1 ^d
M5	81 - 90	56 ± 3 ^a	7,5 ± 0,3 ^d	76,1 ± 0,7 ^{ab}	5,5 ± 0,1 ^e
M6	> 90	41 ± 3 ^a	8,3 ± 0,2 ^d	75,3 ± 0,7 ^a	6,1 ± 0,1 ^f

* Tính theo lượng chất khô tuyệt đối. Các giá trị trong bảng (theo cột) có ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 3.1 trình bày sản lượng và đặc điểm của vỏ tôm lột xác của tôm thẻ chân trắng theo độ tuổi tôm thu ở các ao nuôi tại trại Thực nghiệm Chính Mỹ tại Ninh Phú, Ninh Hòa, Khánh Hòa (Hình 3.1). Kết quả cho thấy, sản lượng vỏ lột xác của tôm thu được và chiều dài phần vỏ đầu (Hình 3.2) tỷ lệ thuận với độ tuổi. Ở độ tuổi của tôm nhỏ hơn 70 ngày, lượng vỏ

thân thu được ít, có thể do cấu trúc vỏ mềm nên dễ dàng bị cắt nát qua các trục quay tạo khí trong ao nuôi, nên hầu hết vỏ lột xác của tôm thu được là vỏ đầu. Các mẫu vỏ lột xác của tôm ở độ tuổi 60 ngày trở đi bắt đầu xuất hiện vỏ thân và vỏ đuôi nhiều hơn nhưng không đáng kể. Độ tuổi tôm lớn hơn 70 ngày, tỷ lệ vỏ thân và vỏ đuôi chiếm không quá 25% lượng vỏ lột xác của tôm thu được.

Ngoài ra, kết quả trên Bảng 3.1 cũng cho thấy trong giai đoạn từ 41 – 90 ngày tuổi, kích cỡ tôm tăng đáng kể ($p < 0,05$) sau mỗi giai đoạn 10 ngày tuổi, kích cỡ tôm tăng từ 387 ± 49 con/kg (M1) đến 56 ± 3 con/kg (M5) và sản lượng vỏ lột xác của tôm cũng tăng tương ứng từ $1,9 \pm 0,5$ kg/ao/ngày (M1) đến $7,5 \pm 0,3$ kg/ao/ngày (M5). Ở giai đoạn sau 70 ngày tuổi, kích cỡ tôm và sản lượng vỏ lột xác của tôm không khác biệt thống kê ($p > 0,05$). Điều này phù hợp với sự phát triển của tôm nhanh ở các giai đoạn đầu (2 – 9 g/con) với tần suất lột vỏ của tôm cao (7 – 9 ngày/giữa 2 lần lột vỏ), và tôm sẽ phát triển chậm hơn ở giai đoạn trưởng thành (16 – 40 g/con) với tần suất lột vỏ của tôm chậm (12 – 16 ngày/giữa 2 lần lột vỏ) [12].

Bảng 3.2. Tiềm năng thu hồi vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa trong giai đoạn 2021 - 2025

Nhóm tuổi tôm nuôi	Số ngày lấy vỏ/vụ nuôi	Sản lượng vỏ lột xác (kg/ao/ngày)	Sản lượng vỏ thu hồi tương đối (kg/ao/vụ)	Khả năng thu hồi vỏ lột xác tương đối (kg/kg)	Tiềm năng thu sản lượng vỏ lột xác (tấn/5 năm)
M1-M6	50	5,6	280,0	0,056	318,08
M2-M6	40	6,38	255,2	0,051	289,68
M3-M6	30	7,07	211,5	0,042	238,56

Kết quả (Bảng 3.2) về sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có thể thu hồi từ quá trình nuôi thâm canh ở độ tuổi nuôi thương phẩm (40 ngày tuổi trở lên) đạt trung bình (M_s) là khoảng 280 (kg/ao/vụ). Trong khi sản lượng tôm thương phẩm tại ao khảo sát đạt khoảng 4.500 – 6.000 kg/ao/vụ (trung bình khoảng 5.000 kg/ao/vụ = M_o) nên khả năng thu hồi vỏ lột xác của tôm là 0,056. Điều đó có nghĩa là cứ có 1 tấn sản lượng tôm thương phẩm thu hoạch thì có khoảng 56 kg sản lượng vỏ lột xác khô thu được từ 1 vụ nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh đối với ao là 1500 m² và mật độ thả giống là 200 con/m². Như vậy, sản lượng vỏ lột xác có thể thu được tương đương khoảng 5% so với sản lượng tôm thương phẩm. Tại trại Thực nghiệm Chính Mỹ ở Ninh Phú, mỗi năm có thể thu hoạch khoảng 5 - 6 vụ/năm tùy thuộc vào thời tiết thuận lợi trong năm khi áp dụng mô hình nuôi thâm canh với 3 giai đoạn và các ao nuôi liên hoàn; trung bình 5 tấn

tôm thương phẩm/ao/vụ thì có thể thu được khoảng 1,40 – 1,68 tấn vỏ lột xác khô tuyệt đối/ao/năm.

Theo kế hoạch hành động phát triển ngành tôm tỉnh Khánh Hòa giai đoạn 2021 – 2025, hệ thống cơ sở hạ tầng và các dịch vụ kỹ thuật được đầu tư đồng bộ theo công nghệ cao. Mục tiêu diện tích nuôi tôm thẻ chân trắng đạt 1.365 ha (Cam Ranh 65 ha, Ninh Hòa 1.000 ha, Cam Lâm 50 ha, Vạn Ninh 250 ha), tương ứng sản lượng tôm thu hoạch là 5.680 tấn (Cam Ranh 300 tấn, Ninh Hòa 3.130 tấn, Cam Lâm 250 tấn, Vạn Ninh 2.000 tấn) [22]. Theo đó, với sản lượng tôm thu hoạch ước đạt 5.680 tấn/5 năm thì có thể thu hồi được khoảng 238 – 318 tấn vỏ lột xác/5 năm (Bảng 3.2), chỉ tính trên địa bàn tỉnh Khánh (2021 – 2025).

Kết quả thu hồi vỏ tôm lột xác ở ao nuôi thâm canh tại Trại thực nghiệm Chính Mỹ cho thấy tiềm năng thu nhận vỏ lột xác của tôm là rất lớn. Vỏ lột xác được thu mỗi ngày và tăng tỷ lệ thuận với sản lượng tôm nuôi thu hoạch được. Tuy nhiên, sản lượng vỏ lột xác của tôm thu được còn tùy thuộc vào kỹ thuật nuôi, diện tích nuôi, mật độ thả giống và năng suất nuôi. Ước tính sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có thể thu hồi từ quá trình nuôi thâm canh ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long được trình bày ở Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Ước tính sản lượng vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng thuộc Đồng bằng sông Cửu Long trong giai đoạn 2020 - 2022

Năm	Sản lượng thu hoạch (tấn/năm)	Tiềm năng thu sản lượng vỏ lột xác (tấn/năm)	Tham khảo
2020	632.300	31.615	Hội nghề cá Việt Nam (2021) [6]
2021	666.000	33.300	Tổng cục thủy sản (2021) [15]
2022	675.000	33.750	Tổng cục thủy sản (2022) [16]
Giai đoạn 2020 - 2022		98.665 tấn/3 năm	

Năm 2018, Chính phủ Việt Nam đã ban hành kế hoạch hành động quốc gia phát triển ngành tôm đến năm 2025 và phê duyệt Đề án tổng thể phát triển ngành công nghiệp tôm nước lợ Việt Nam đến năm 2030, nhằm ứng dụng mô hình nuôi thâm canh công nghệ cao và giải quyết ô nhiễm môi trường nuôi trồng thủy sản [2, 11, 14]. Đến nay, đã có nhiều công ty nuôi trồng thủy sản lớn ở các tỉnh khu vực ĐBSCL đã ứng dụng thành công mô hình này. Đây là mô hình sử dụng lưới che, bạt trải đáy, có hệ thống sục khí làm sạch ao, có thể áp dụng kỹ thuật xử lý chất thải thông qua ao lắng và tách lọc [16, 17]. Vậy nên thu hồi vỏ lột xác qua việc xi phông nước thải, rác thải hằng ngày giúp các

cơ sở nuôi dễ dàng tách loại rác thải rắn và xử lý sạch để có thể tận thu một lượng lớn vỏ lột xác của tôm.

Tính đến năm 2020, tổng diện tích nuôi trồng thủy sản gần như không thay đổi so với năm 2019, tuy nhiên, sản lượng tôm thẻ chân trắng đạt 632.300 tấn, tăng 8,5% so với cùng kỳ [6]. Sản lượng vỏ tôm lột xác tương ứng có thể thu hồi năm 2020 là 31.615 tấn. Sản lượng tôm thẻ chân trắng tiếp tục tăng đến 666.000 tấn (năm 2021) [15] và được đặt mục tiêu ước đạt 675.000 tấn (năm 2022) [16], tương ứng đạt sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng thứ tự là 33.300 tấn và 33.750 tấn. Theo đó, sản lượng vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có thể thu hồi từ quá trình nuôi thâm canh trong giai đoạn 2020 – 2022 ước đạt khoảng 98.665 tấn/3 năm (Bảng 3.3). Đây là một lượng vỏ lột xác rất lớn có thể sử dụng làm nguyên liệu để sản xuất chitin, nâng cao giá trị cho tôm thẻ chân trắng nuôi thay vì chỉ sử dụng làm phân bón hay chôn lấp gây ô nhiễm môi trường [4].

3.1.3. Thành phần hóa học của vỏ lột xác và thử nghiệm sản xuất chitin

3.1.3.1. Thành phần hóa học cơ bản của vỏ lột xác theo độ tuổi tôm

Qua các kết quả trình bày ở Bảng 3.1 và 3.2 cho thấy, vỏ lột xác của tôm cần được thu hồi và có thể tận dụng để làm nguyên liệu sản xuất chitin sau khi xi phông và xử lý sạch. Tuy nhiên, kết quả về thành phần hóa học chính gồm khoáng, protein và chitin có trong vỏ lột xác của tôm có sự thay đổi theo độ tuổi (Bảng 3.4). Hàm lượng khoáng của vỏ lột xác có xu hướng tăng dần trong khi hàm lượng protein giảm dần từ độ tuổi lớn hơn 40 ngày đến dưới 70 ngày. Ở độ tuổi M1, kế cận với giai đoạn tuổi của tôm Post, lớp vỏ được tập trung làm giàu protein tạo nên các loại gen có liên quan đến lớp vỏ ngoài, đáp ứng sự sinh trưởng nhanh chóng và sự lột xác thường xuyên của tôm [88]. Điều này phù hợp với kết quả phân tích cho thấy tại độ tuổi M1, hàm lượng protein có trong vỏ lột xác chiếm tỷ lệ cao ($13,1 \pm 1,4\%$) so với các giai đoạn tuổi lớn hơn. Giai đoạn M2, có sự khoáng hóa ở lớp vỏ bên ngoài của tôm (chủ yếu là calci cacbonat) giúp cho bộ khung (lớp vỏ bên ngoài) trở nên cứng hơn, tạo điều kiện cho tôm lột xác dễ dàng. Tuy nhiên, sự hấp thu hàm lượng lớn calci cần thiết để hình thành lớp vỏ cứng lột xác phần lớn là từ môi trường nước (95%) hơn là lượng tích trữ trong cơ thể [88, 94]. Từ độ tuổi lớn hơn 70 ngày trở đi (M3 – M6), hàm lượng khoáng và protein ổn định và không có sự khác biệt đáng kể ($p > 0,05$) giữa các giai đoạn tuổi. Trong khi đó, hàm lượng chitin tăng đáng kể ($p < 0,05$) trong giai đoạn tôm có độ tuổi từ 41 – 70 ngày và ổn định ở độ tuổi từ 60 ngày nuôi trở đi. Tổng hàm lượng ba thành phần chính (khoáng, protein, chitin) của vỏ lột xác tôm từ 60 ngày tuổi trở lên đạt trên 90%, tuy nhiên của vỏ lột xác tôm dưới 60 ngày tuổi thấp hơn 90%. Do đó, cần nghiên cứu quy trình sản xuất chitin phù hợp với loại nguyên liệu vỏ tôm này nhằm thu hồi chitin đạt hiệu quả cao nhất.

Quan sát thấy vỏ lột xác của tôm có trạng thái dòn và dễ vỡ tăng dần theo độ tuổi, điều này cho thấy lượng khoáng có ảnh hưởng lớn đến cấu trúc của vỏ tôm. Hàm lượng khoáng thấp nhất xác định được khoảng $52,8 \pm 2,6\%$ (M1) và cao nhất là khoảng $60,8 \pm 1,9\%$ (M3), hàm lượng protein thấp hơn 14% đối với tất cả các độ tuổi. Thành phần của vỏ lột xác chứa hàm lượng khoáng và protein trái ngược với loại đầu vỏ tôm thải ra từ quá trình chế biến (hàm lượng khoáng là $21,2 \pm 1,6\%$ và hàm lượng protein là $54,4 \pm 1,8\%$) [184]. Điều này do quá trình tích khoáng trong vỏ tôm nhằm làm cứng lớp vỏ, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình lột vỏ của tôm [128, 162]. Tương ứng hiện tượng này thì hàm lượng protein được hình thành trong lớp vỏ lột xác thấp và tập trung tích khoáng đạt đến giai đoạn vôi hóa cao, cho phép con tôm liên tục hấp thu calci từ thức ăn và từ nguồn nước. Protein được liên kết với chitin, tích lũy chủ yếu ở lớp biểu bì đã bị vôi hóa hỗ trợ độ cứng của bộ xương ngoài [73, 88, 120]. Ngoài ra, thành phần đầu tôm từ quá trình chế biến chứa một lượng thịt lớn và bao gồm cả phần nội tạng nên hàm lượng lipid khá cao (khoảng 11,9%) và hàm lượng chitin thấp (khoảng 9,3%) [184].

Bảng 3.4. Thành phần hóa học của vỏ tôm lột xác tôm thẻ chân trắng theo độ tuổi ở ao nuôi thâm canh tại Ninh Phú

Mẫu	Độ tuổi (ngày)	Khoáng (%) [*]	Protein (%) [*]	Chitin (%) [*]
M1	41 - 50	$52,8 \pm 2,6^a$	$13,1 \pm 1,4^b$	$20,6 \pm 0,6^a$
M2	51 - 60	$57,1 \pm 1,6^{bc}$	$11,8 \pm 0,5^{ab}$	$21,8 \pm 1,1^a$
M3	61 - 70	$60,8 \pm 1,9^c$	$10,4 \pm 0,7^a$	$23,4 \pm 0,5^b$
M4	71 - 80	$53,4 \pm 0,5^{ab}$	$12,9 \pm 0,6^b$	$23,7 \pm 0,2^b$
M5	81 - 90	$55,1 \pm 0,8^{ab}$	$12,4 \pm 0,9^b$	$23,5 \pm 0,6^b$
M6	> 90	$55,9 \pm 2,1^{ab}$	$12,7 \pm 0,6^b$	$23,6 \pm 0,5^b$

^{*} Tính theo lượng chất khô tuyệt đối. Các giá trị trong bảng (theo cột) có ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Từ độ tuổi > 60 ngày trở đi, có sự xuất hiện vỏ thân lột xác của tôm (> 10%) làm cho hàm lượng khoáng của hỗn hợp vỏ lột xác (gồm cả phần đầu và thân đuôi tôm) giảm xuống dưới 56%. Kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng khoáng của thân đuôi ($42,4 \pm 2,6\%$) thấp hơn hàm lượng khoáng của phần đầu ($58,1 \pm 1,1\%$). Tuy nhiên, phần vỏ thân đuôi lột xác của tôm thẻ chân trắng vẫn có hàm lượng khoáng tích tụ cao gấp 1,6 lần so với vỏ thân đuôi tôm thu hồi từ quá trình chế biến ($26,5 \pm 1,9\%$) [9]. Ngược lại, kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Đan Phượng và Trang Sĩ Trung (2012) [9] phân tích các thành

phần chính khác trong vỏ lột từ quá trình chế biến cao hơn khi so trong vỏ lột xác ở ao nuôi. Trong đó, hàm lượng protein cao hơn khoảng 1,9 lần (24,3%), hàm lượng lipid cao hơn khoảng 4,4 lần (2,2%) [9]. Chỉ riêng hàm lượng chitin thu được đạt khoảng 29,4% [9] cao hơn so với hàm lượng chitin phân tích từ vỏ lột xác (Bảng 3.4) tùy theo độ tuổi của tôm khác nhau. Sự khác biệt có thể do ảnh hưởng bởi điều kiện xử lý để loại bỏ khoáng và protein trong nguyên liệu ban đầu [21].

3.1.3.2. Thử nghiệm sản xuất chitin

Tiến hành thử nghiệm sản xuất chitin theo phương pháp của Toan và cộng sự (2006) [182]: khử khoáng bằng HCl 4% (1:5, w/v) ở 30°C trong 12 giờ và khử protein bằng NaOH 4% (1:5, w/v) ở 30°C trong 24 giờ để xem xét khả năng thu hồi chitin và chất lượng chitin thu được ở các giai đoạn tuổi của tôm nuôi.

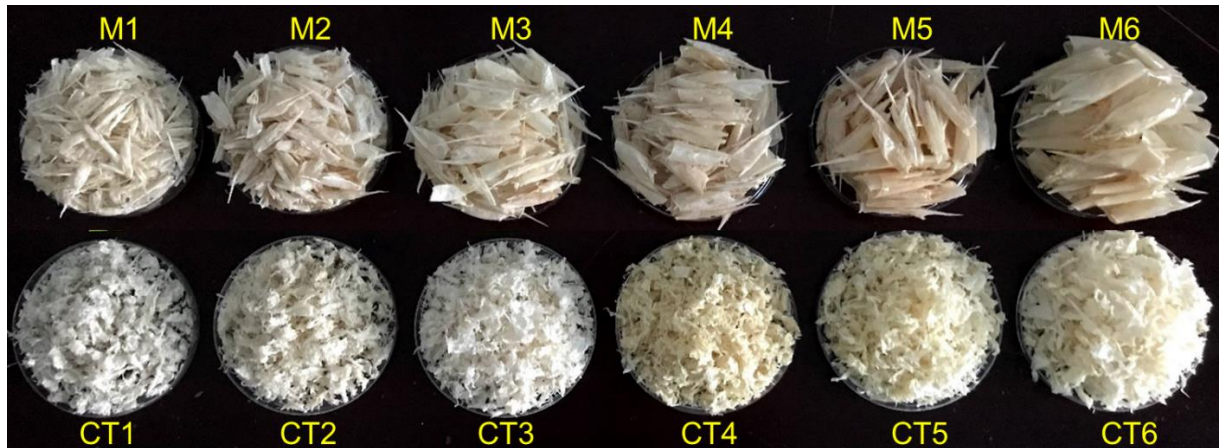
Bảng 3.5. Độ tinh sạch của chitin thu hồi từ vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng theo độ tuổi

Chitin	Độ tuổi (ngày)	Khoáng (%) [*]	Protein (%) [*]	HSTH chitin (%) [*]
CT 1	41 - 50	1,6 ± 0,2 ^c	1,10 ± 0,05 ^d	19,5 ± 1,3 ^a
CT 2	51 - 60	0,8 ± 0,1 ^b	1,66 ± 0,12 ^e	20,6 ± 0,7 ^a
CT 3	61 - 70	0,3 ± 0,1 ^a	0,72 ± 0,06 ^{bc}	23,7 ± 1,2 ^b
CT 4	71 - 80	0,4 ± 0,2 ^{ab}	0,89 ± 0,03 ^c	23,1 ± 0,9 ^b
CT 5	81 - 90	0,4 ± 0,2 ^{ab}	0,54 ± 0,10 ^b	23,5 ± 1,2 ^b
CT 6	> 90	0,5 ± 0,3 ^{ab}	0,31 ± 0,10 ^a	23,4 ± 0,8 ^b

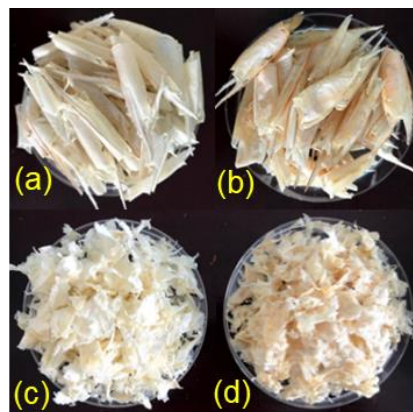
^{*}Tính theo lượng chất khô tuyệt đối. Các giá trị trong bảng (theo cột) có ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả trình bày ở Bảng 3.5 và Hình 3.3 cho thấy, độ tinh sạch chitin (CT) thu được từ vỏ lột xác ở các giai đoạn tuổi khác nhau (M1-M6) có hàm lượng khoáng và protein còn lại khác nhau. Hàm lượng khoáng và protein của chitin sản xuất từ vỏ lột xác của tôm ở độ tuổi từ 40 ngày đến 60 ngày không đạt yêu cầu tinh sạch mong muốn (hàm lượng khoáng và protein dưới 1%). Đồng thời, hiệu suất thu hồi chitin từ các mẫu vỏ lột xác của tôm ở độ tuổi từ 40 - 60 ngày thấp hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với các mẫu vỏ lột xác của tôm từ độ tuổi lớn hơn 60 ngày. Trong khi đó, ở độ tuổi trên 60 ngày nuôi, vỏ tôm lột xác có khả năng thu hồi chitin cao (khoảng 23%) và có chất lượng tinh sạch cao (hàm lượng khoáng và protein dưới 1%). So với kết quả phân tích thành phần của vỏ lột xác ban đầu trình bày Bảng 3.4, hàm lượng khoáng và protein ở các giai đoạn tuổi không có sự khác biệt ($p > 0,05$) đáng kể nhưng

khả năng thu hồi chitin ở độ tuổi M1, M2 thấp hơn và hàm lượng khoáng, protein còn lại cao hơn. Kết quả này có thể do cấu trúc vỏ lột xác xốp và mềm (lớp vỏ bị thoái hóa) nên dễ bị tác động trong quá trình xử lý (nồng độ hóa chất, nhiệt độ và thời gian) nên chitin bị cắt mạch và nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng đầu tôm (Bảng 3.1: M1-M2 chiếm 90 – 100% vỏ đầu) chứa mũi chùy cứng chắc nên khó khử tạp chất thu sản phẩm chitin tinh sạch [21]. Vậy, độ tuổi vỏ lột xác của tôm phù hợp để chọn làm nguyên liệu sản xuất chitin, chitosan là 60 ngày nuôi trở lên, với độ tuổi dưới 60 ngày nuôi cần được nghiên cứu riêng nhằm tận dụng hiệu quả nguồn lợi vỏ lột xác.



Hình 3.3. Mẫu nguyên liệu vỏ tôm lột xác (M1-M6) và sản phẩm chitin (CT1-CT6) theo độ tuổi nuôi.



Hình 3.4. Mẫu nguyên liệu vỏ tôm lột xác (a,b) và sản phẩm chitin (c,d) thu được khi thu mẫu vào buổi sáng (a,c) có phơi nắng và buổi chiều (b,d) không phơi nắng.

Hình 3.3 cho thấy màu sắc của chitin phụ thuộc vào màu sắc của nguyên liệu ban đầu, mặc dù không ảnh hưởng đến chất lượng chitin yêu cầu nhưng cũng có ảnh hưởng đến cảm quan sản phẩm. Do vậy, nghiên cứu so sánh giữa các mẫu nguyên liệu thu vào buổi sáng (a) và buổi chiều (b) đã được thực hiện và kết quả được trình bày ở Hình 3.4. Kết quả cho thấy màu sắc của mẫu nguyên liệu được xi phong vào buổi sáng, xử lý rửa sạch kịp phơi nắng buổi trưa và mẫu chitin (b) có

màu sáng hơn so với mẫu nguyên liệu thu vào buổi chiều (b) và chitin (d). Điều này có thể do dưới tác động của ánh nắng mặt trời làm phân hủy astaxanthin (màu sắc cam) trên bề mặt của vỏ [102]. Tác động này được ứng dụng vào tẩy màu trong quá trình sản xuất chitin để có màu sắc trắng đẹp [21]. Đối với mẫu nguyên liệu sản xuất chitin từ nguồn vỏ tôm thải ra trong quá trình chế biến cần phải qua công đoạn khử màu do hàm lượng protein lớn và có liên kết chặt chẽ trong phức protein-astaxanthin và chitin. Để khử màu tốt, ngoài phương pháp phơi nắng có thể sử dụng một số hóa chất tẩy màu thông dụng như H_2O_2 , $NaOCl$...; quá trình tẩy màu được tiến hành trong thời gian dài (trên 15 giờ). Tuy nhiên, quá trình tẩy màu dễ gây ra hiện tượng cắt mạch chitin dẫn đến chitosan có phân tử lượng thấp và độ nhớt thấp [21]. Do vậy, nguyên liệu vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng ở độ tuổi 60 ngày trở lên thu từ quá trình nuôi thâm canh có hàm lượng protein thấp (Bảng 3.4) hoàn toàn phù hợp để sản xuất chitin đạt chất lượng thương mại (hàm lượng khoáng và protein dưới 1%). Vỏ lột xác tôm cần được thu gom vào buổi sáng để cải thiện màu của nguyên liệu và màu của sản phẩm chitin.

3.2. Nghiên cứu điều kiện sản xuất chitin từ vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng

3.2.1. Thành phần hóa học cơ bản của vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng

Để đảm bảo độ đồng nhất của nguyên liệu trong nghiên cứu quy trình sản xuất chitin, chitosan từ vỏ lột xác và ứng dụng quy trình sản xuất ở quy mô công nghiệp hiệu quả, mẫu nguyên liệu được tiến hành thu nhận với trữ lượng lớn tại các ao nuôi thâm canh ở tỉnh Cà Mau. Mẫu vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng ở độ tuổi từ 60 ngày trở lên được đánh giá thành phần hóa học cơ bản trình bày ở Bảng 3.6. Kết quả cho thấy các thành phần chính trong vỏ lột xác được thu nhận tại Cà Mau không có sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) so với mẫu thu nhận tại Khánh Hòa (Bảng 3.4) ở độ tuổi > 60 ngày nuôi: khoáng (53-61%), protein (10-13%) và chitin (23-24%).

Thành phần hóa học của vỏ tôm lột xác chứa hàm lượng khoáng khá cao (khoảng 57%) cao hơn 1,5 lần (khoảng 36%) so với lượng khoáng có trong vỏ tôm thu từ quá trình chế biến thủy sản (Bảng 3.6). Ngược lại, hàm lượng protein có trong vỏ tôm lột xác chỉ xấp xỉ 13%, thấp hơn khoảng 2 lần (khoảng 29%) so với vỏ tôm thu từ nhà máy chế biến. Sự khác biệt lớn giữa hàm lượng khoáng và protein của vỏ lột xác tôm thu từ ao nuôi và vỏ tôm thải ra từ quá trình chế biến thủy sản là do tính chất tích khoáng ở lớp vỏ ngoài ở các giai đoạn phát triển và thời điểm thay vỏ (Hình 1.3, 1.4). Ở giai đoạn tiền lột xác (pre-molt), sự khoáng hóa đã diễn ra (hiện tượng hấp thu/tái hấp thu khoáng chất) làm cứng lớp vỏ giúp cho tôm có thể dễ dàng tự lột lớp vỏ cũ ra ngoài (vỏ lột xác) [72, 73, 88, 120, 128, 162]. Đây là hiện tượng hấp thu khoáng chất (chủ yếu là calci cacbonat) từ nước biển hoặc tái hấp thu từ tôm và phần lớn là từ môi trường [88, 94]. Chính vì

vậy, hàm lượng khoáng chiếm tỷ lệ rất cao ($> 50\%$) so với tổng các thành phần của vỏ lột xác. Do vậy, việc khử khoáng để thu hồi chitin thô trước khi khử protein là cần thiết, nhằm tránh sự gãy vụn trong quá trình khuấy đảo để khử loại các tạp chất và tăng hiệu quả thu hồi chitin. Ngoài ra, hàm lượng lipids và carotenoids có trong vỏ lột xác rất thấp và không đáng kể so với trong vỏ tôm thải ra từ quá trình chế biến. Kết quả này phù hợp với sự chuyển đổi sinh lý của tôm qua các chức năng trao đổi chất và nội tiết tố xoay quanh đều các chu kỳ của quá trình lột xác [57, 69]. Giai đoạn tiền lột xác và lột xác, hiện tượng hấp thu/tái hấp thu khoáng chất diễn ra là chủ yếu, đồng thời protein liên kết với chitin cũng bị vôi hóa để hỗ trợ độ cứng của bộ xương ngoài (lớp vỏ lột xác của tôm) [72, 73, 88, 120, 128, 162]. Hơn nữa, lipids và carotenoids có thể bị phân hủy trong thời gian tồn tại ở ao nuôi từ khi lột vỏ đến khi xi phông.

Bảng 3.6. Thành phần cơ bản của vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng và của vỏ tôm thải ra từ quá trình chế biến thủy sản

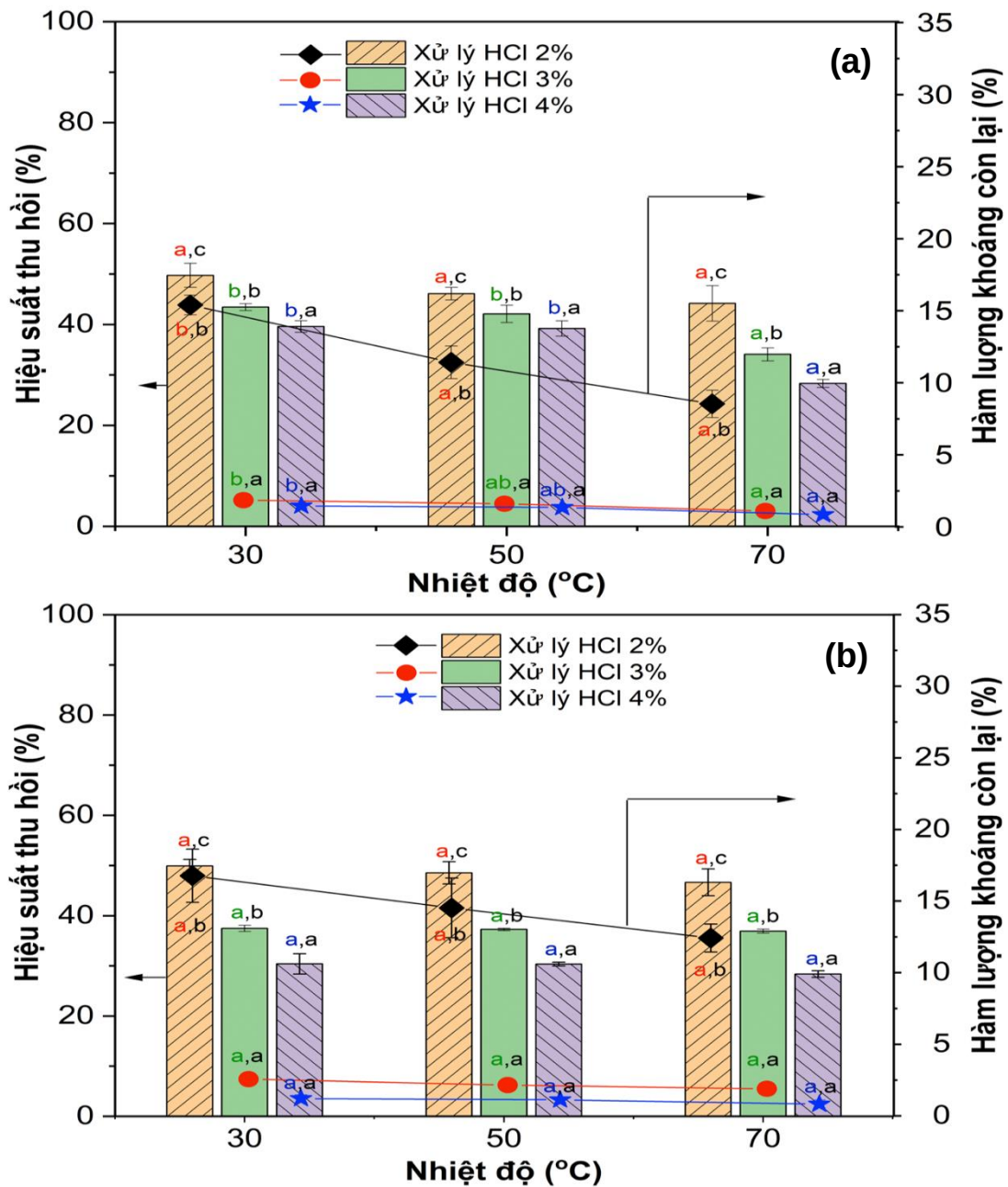
Thành phần *	Vỏ lột xác từ ao nuôi tôm	Vỏ tôm thải ra từ quá trình chế biến thủy sản
Khoáng (%)	$56,8 \pm 2,7$	$35,5 \pm 0,5$
Protein (%)	$12,7 \pm 1,9$	$28,8 \pm 0,8$
Chitin (%)	$23,5 \pm 0,8$	$18,8 \pm 0,9$
Lipid (%)	$0,5 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,4$
Carotenoid (mg/kg)	-	$137 \pm 10,9$

*Tính trên hàm lượng chất khô tuyệt đối; (-) Không phát hiện.

Mặc dù hàm lượng khoáng chất của vỏ lột xác rất cao nhưng chúng ở dạng tinh thể calci và calci cacbonat vô định hình nằm xem kẽ và bao quanh bởi các sợi chitin-protein [88, 162], nên cấu trúc xốp. Điều này sẽ giúp cho quá trình tiếp xúc hóa chất nhanh và quá trình khử sẽ diễn ra dễ dàng hơn. Ngược lại, hàm lượng protein được tích lũy trong lớp vỏ lột xác thấp nhưng có sự liên kết chặt giữa protein với chitin và chủ yếu ở lớp biểu bì của vỏ (Hình 1.4) đã bị vôi hóa nhằm hỗ trợ độ cứng trước khi quá trình lột xác xảy ra [73, 88, 120]. Hàm lượng chitin trong vỏ lột xác tôm 23,5% cao hơn nhiều so với hàm lượng chitin trong vỏ tôm thải ra từ quá trình chế biến thủy sản (khoảng 19%). Ngược lại, hàm lượng lipid trong vỏ lột xác tôm rất thấp (khoảng 0,5%) nên dễ dàng được loại bỏ trong công đoạn khử protein [21].

3.2.2. Ảnh hưởng của điều kiện khử khoáng đến hiệu suất khử khoáng và hiệu suất thu hồi chitin

Ảnh hưởng của nhiệt độ và nồng độ HCl đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng ở trạng thái khô và ướt được trình bày ở Hình 3.5.



Hình 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ và nồng độ HCl đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô; (a) đối với vỏ lột xác ướt, (b) đối với vỏ lột xác khô.

Các ký tự khác nhau trên đồ thị (màu sắc theo cột nồng độ (đỏ: HCl 2%, xanh lục: HCl 3%, xanh: HCl 4%), riêng màu đen theo nhiệt độ) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả cho thấy ở cùng một nhiệt độ, khi tăng nồng độ HCl thì hàm lượng khoáng còn lại và hiệu suất thu hồi chitin thô có xu hướng giảm dần trên cả hai đối tượng vỏ lột xác tôm ướt (Hình 3.5a) và vỏ lột xác tôm khô (Hình 3.5b). Khi xử lý ở nồng độ HCl 2% ở các nhiệt độ (30, 50, 70°C) trong 12 giờ, hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô dao động từ 8,4% đến 15,3%, quá cao so với yêu cầu (xấp xỉ 1%). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ HCl lên 3% và 4% thì hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô giảm rõ rệt (dao động từ 0,6%

đến 1,6%), ngay cả khi xử lý ở điều kiện nhiệt độ 30°C. Từ kết quả có thể khẳng định, nồng độ HCl là yếu tố quan trọng, quyết định đến hiệu quả khử khoáng đối với vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng. Mẫu xử lý ở nồng độ acid HCl thấp cho hiệu suất thu hồi chitin thô cao hơn so với mẫu xử lý ở nồng độ HCl cao. Kết quả một phần do hàm lượng khoáng còn lại trong mẫu chitin thô xử lý ở nồng độ acid HCl thấp cao hơn so với mẫu chitin thô xử lý ở nồng độ acid HCl cao, điều này thể hiện độ tinh khiết của chitin rất thấp, khoáng còn lại trong chitin rất cao. Kết quả cũng cho thấy, ở cùng một chế độ xử lý, hiệu suất thu hồi chitin thô trên mẫu ướt cao hơn so với mẫu khô, hàm lượng khoáng còn lại thấp hơn. Điều này có thể được giải thích do mẫu vỏ lột xác khô dễ bị vỡ vụn một phần trong quá trình khuấy đảo dẫn đến thất thoát trong quá trình lọc thu hồi và rửa mẫu. Hiệu quả khử khoáng của mẫu ướt cao hơn so với mẫu khô là do quá trình làm khô vỏ lột xác đã làm thay đổi cấu trúc của vỏ, ảnh hưởng đến hiệu quả khuếch tán của HCl vào bên trong và khả năng tiếp xúc với calci carbonat để phản ứng loại bỏ khoáng.

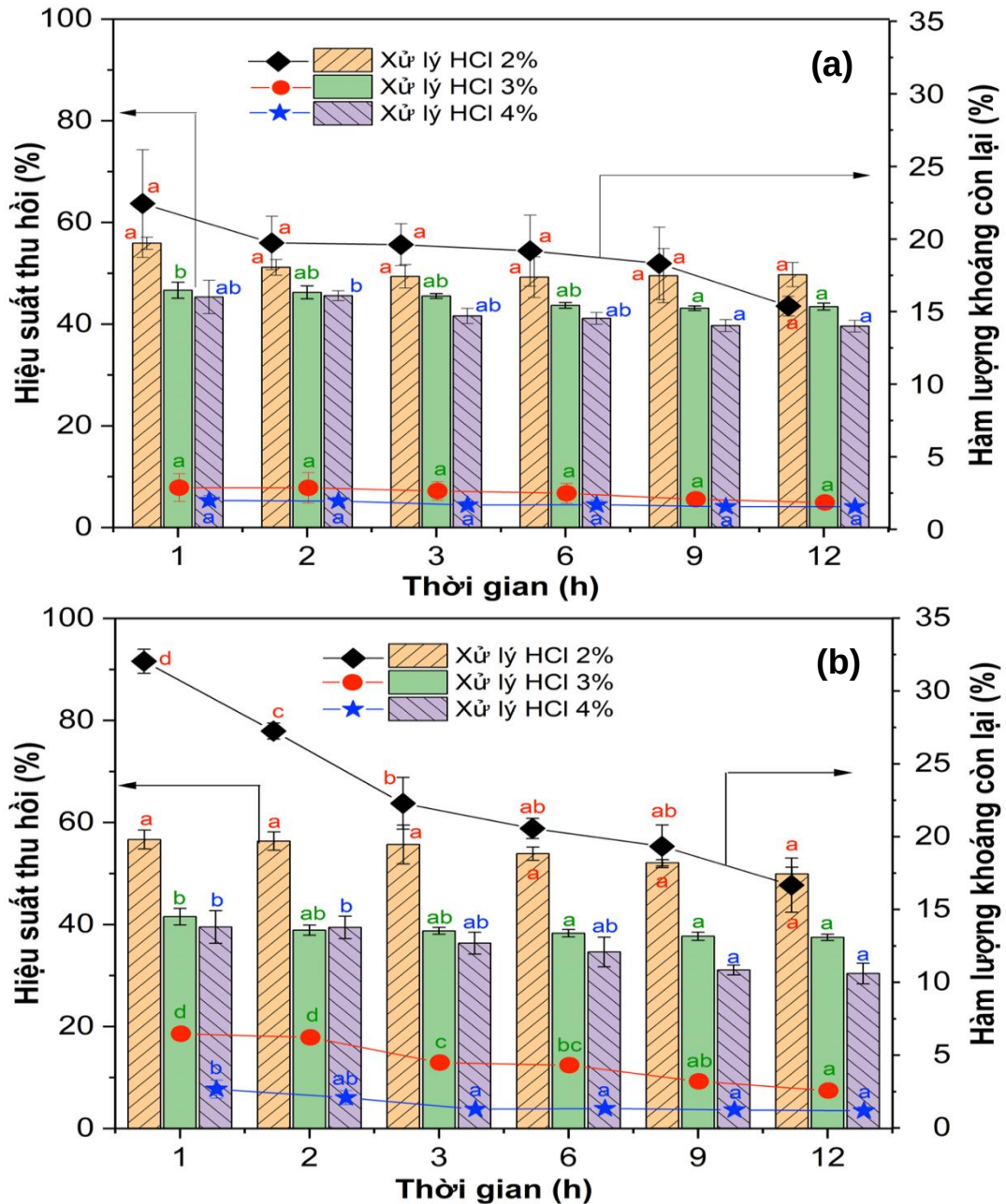
Hàm lượng HCl trong dung dịch có ảnh hưởng quyết định đến hiệu quả khử khoáng có thể giải thích rằng thành phần khoáng chủ yếu trong vỏ lột xác là muối CaCO_3 không tan trong nước, do đó phản ứng chính xảy ra trong quá trình khử khoáng sử dụng dung dịch acid mạnh HCl là:



Đây là một phản ứng xảy ra nhanh, hoàn toàn và dễ dàng ở nhiệt độ phòng do sản phẩm giải phóng ra là muối CaCl_2 tan trong nước, chất kém điện ly H_2O và chất dễ bay hơi CO_2 . Theo phản ứng trên, khi sử dụng số mol HCl trong dung dịch ≤ 2 lần số mol CaCO_3 thì lượng CaCO_3 sẽ không thể phản ứng hoàn toàn dù có tăng nhiệt độ phản ứng. Ngược lại, khi số mol HCl ≥ 2 lần số mol CaCO_3 thì dù ở nhiệt độ phòng, phản ứng vẫn xảy ra hoàn toàn. Ngoài ra, khoáng trong vỏ lột xác tồn tại dưới dạng tinh thể calci và calci carbonat vô định hình nằm xen kẽ với các sợi chitin-protein [88, 162] nên tạo điều kiện dễ dàng cho quá trình khử khoáng. Động lực của quá trình khuếch tán HCl vào bên trong cấu trúc của vỏ lột xác là do chênh lệch nồng độ HCl (gradient nồng độ) và nhiệt độ (gradient nhiệt độ), tuy nhiên do cấu trúc của vỏ lột xác xốp nên động lực chính là do gradient nồng độ (nhiệt độ ảnh hưởng không đáng kể). Tuy nhiên, một lượng nhỏ khoáng (khoảng 1%) vẫn còn lại trong sản phẩm dù sử dụng lượng HCl đủ để phản ứng với CaCO_3 có thể do phần khoáng này nằm sâu bên trong thể tích mẫu rắn và liên kết chặt chẽ với chitin và protein.

Vì vậy, để đảm bảo cho hàm lượng khoáng trong mẫu chitin thô còn lại khoảng 1% nhằm thu được sản phẩm chitin tinh sạch có hàm lượng khoáng đạt dưới 1% sau khi thực hiện công đoạn khử protein, đồng thời có thể tiết kiệm được nhiệt năng, đầu tư thiết bị nên đã chọn chế độ xử lý bằng HCl 4% ở 30°C (trong 12 giờ) để thực hiện các nghiên

cứu tiếp theo. Đây cũng là xu hướng được lựa chọn khi đưa vào quy mô sản xuất công nghiệp (dùng HCl loãng ở nhiệt độ thường để tránh hiện tượng cắt mạch polymer của chitin, giảm thiểu ảnh hưởng đến môi trường) [21].



Hình 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ HCl và thời gian đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô; (a) đối với vỏ lột xác ướt, (b) đối với vỏ lột xác khô.

Các ký tự khác nhau trên đồ thị (màu sắc theo cột nồng độ (đỏ: HCl 2%, xanh lục: HCl 3%, xanh: HCl 4%), riêng màu đen theo nhiệt độ) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Hình 3.6 biểu diễn kết quả ảnh hưởng của nồng độ HCl và thời gian xử lý đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô. Nhìn chung, hiệu suất thu hồi và hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô thu từ mẫu vỏ lột xác ướt (Hình

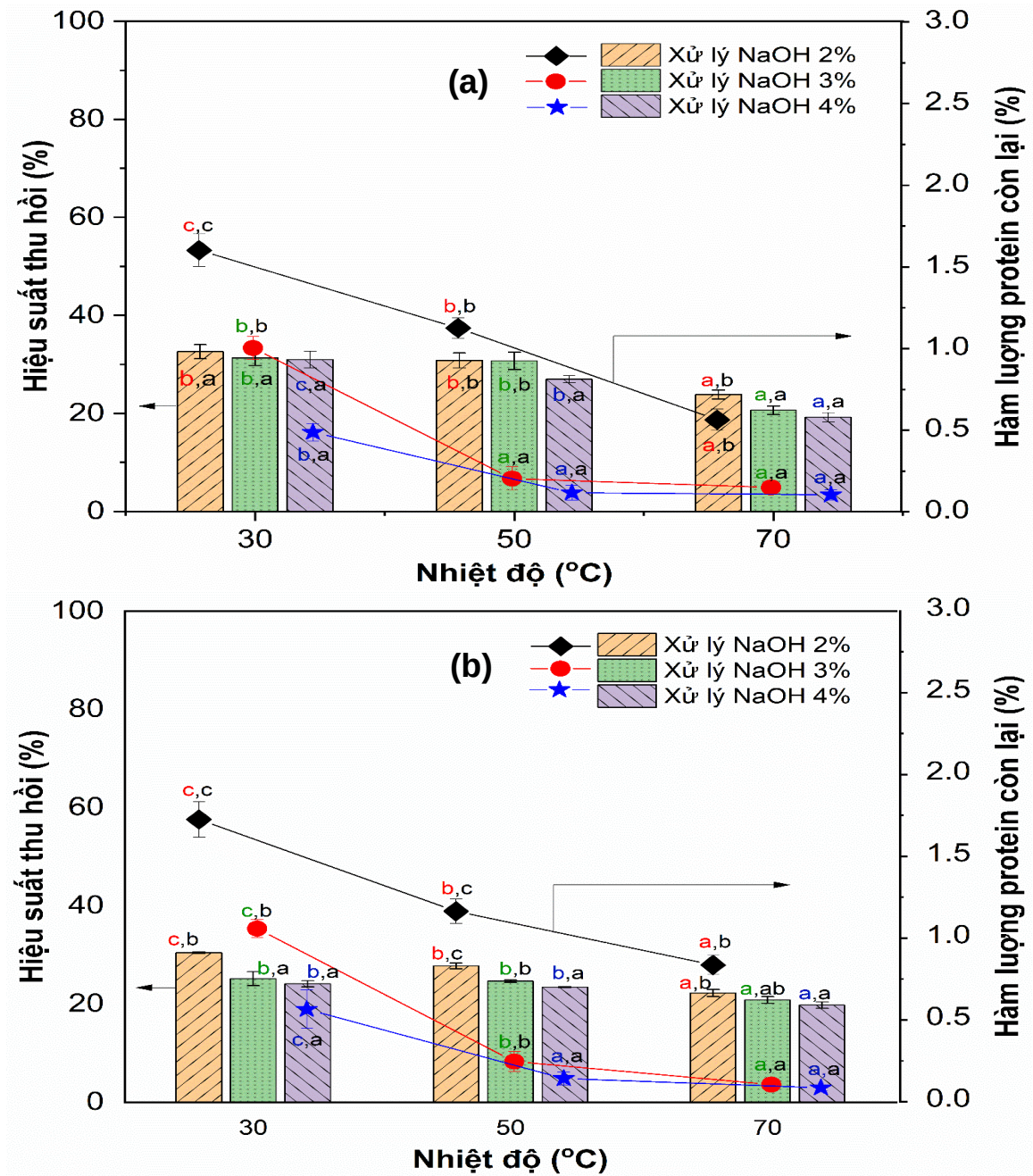
3.6a) và vỏ lột xác khô (Hình 3.6b) giảm dần khi tăng nồng độ acid HCl và tăng thời gian xử lý. Hiệu suất thu hồi và hàm lượng khoáng còn lại trong mẫu chitin thô xử lý ở nồng độ HCl 2% cao hơn so với mẫu xử lý ở nồng độ HCl 3% và HCl 4% trên cả mẫu vỏ lột xác tươi và khô. Kết quả do hàm lượng khoáng trong vỏ lột xác cao (56,8%) nên ở nồng độ HCl 2% thì không đủ lượng HCl để phản ứng hết với calci carbonat (để khử 1 phân tử CaCO_3 thì cần 2 phân tử HCl). Hàm lượng khoáng còn lại trong sản phẩm chitin thô thu từ mẫu vỏ lột xác ở trạng thái ướt (Hình 3.6a) thấp hơn so với mẫu từ vỏ lột xác khô (Hình 3.6b) ở cùng một điều kiện xử lý. Điều này có thể do cấu trúc của mẫu vỏ lột xác khô đã bị thay đổi trong quá trình làm khô, dẫn đến làm giảm khả năng khuếch tán của HCl vào bên trong, giảm khả năng tiếp xúc giữa HCl và calci carbonat nên hiệu quả khử khoáng kém hơn.

Đối với mẫu vỏ lột xác ướt (Hình 3.6a), hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô không có sự khác biệt ý nghĩa khi tăng thời gian xử lý từ 1 lên 12 giờ ở cả ba nồng độ HCl. Tuy nhiên, hàm lượng khoáng còn lại trong mẫu chitin thô thu nhận từ vỏ lột xác khô giảm ý nghĩa sau 3 giờ xử lý, sau đó giảm không đáng kể khi tăng thời gian xử lý lên 12 giờ (Hình 3.6b). Kết quả này cho thấy, thời gian xử lý ảnh hưởng không đáng kể đến hiệu quả khử khoáng. Nguyên nhân do vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có cấu trúc xếp và mỏng nên HCl dễ dàng khuếch tán vào bên trong để phản ứng khử calci carbonat. Tương tự, nghiên cứu của [21] cho thấy, quá trình khử khoáng diễn ra nhanh ở thời gian đầu, sau đó diễn ra chậm hơn. Để đảm bảo hàm lượng khoáng còn lại trong mẫu chitin tinh sạch thấp hơn 1% thì yêu cầu hàm lượng khoáng của chitin thô (vỏ tôm sau khi khử khoáng) phải xấp xỉ 1%. Nguyên nhân do lớp vỏ của tôm sau khi lột xác đã bị vôi hóa ở 3 lớp bên ngoài, khoáng chất tồn tại dưới dạng tinh thể calci và calci carbonat vô định hình và được bao quanh bởi chất nền lipid-protein [88, 162]. Do vậy, khi chitin thô được đưa vào khử protein ở công đoạn tiếp theo, sự liên kết chặt chẽ giữa phân tử protein và chitin được phân tách, mở rộng cấu trúc tạo điều kiện cho calci carbonat được tách ra làm cho hàm lượng khoáng còn lại trong mẫu chitin tinh sạch sẽ thấp hơn 1%.

Từ kết quả đánh giá ảnh hưởng của cặp yếu tố (nồng độ HCl và nhiệt độ, nồng độ HCl và thời gian) đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô thu nhận từ mẫu vỏ lột xác ướt và mẫu vỏ lột xác khô cho thấy, nồng độ HCl là yếu tố quan trọng quyết định đến hiệu quả khử khoáng, nhiệt độ và thời gian là hai yếu tố có ảnh hưởng không đáng kể. Để làm giảm chi phí sản xuất ở quy mô công nghiệp, hạn chế ảnh hưởng không có lợi đến chất lượng của chitin, đồng thời thỏa mãn điều kiện hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô xấp xỉ 1% cho phép lựa chọn chế độ khử khoáng phù hợp cho cả mẫu vỏ lột xác ướt và khô là: nồng độ HCl 4%, nhiệt độ 30°C và thời gian 3 giờ. Khi đó hàm lượng khoáng còn lại trong mẫu chitin thô thu nhận từ mẫu vỏ lột xác ướt là $1,3 \pm$

0,2% và khô là $1,3 \pm 0,1\%$, hiệu suất thu hồi chitin thô đạt lần lượt là $41,6 \pm 1,5\%$ (ướt) và $36,3 \pm 2,1\%$ (khô).

3.2.3. Ảnh hưởng của điều kiện khử protein đến hiệu suất khử và hiệu suất thu hồi của chitin



Hình 3.7. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH và nhiệt độ đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng protein còn lại trong chitin tinh sạch; (a) đối với vỏ lột xác ướt, (b) đối với vỏ lột xác khô.

Các ký tự khác nhau trên đồ thị (màu sắc theo cột nồng độ (đỏ: NaOH 2%, xanh lục: NaOH 3%, xanh: NaOH 4%), riêng màu đen theo nhiệt độ) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Thu nhận chitin thô bằng cách khử khoáng nguyên liệu vỏ lột xác ở chế độ xử lý: HCl 4% ở 30°C trong 3 giờ, sau đó tiến hành nghiên cứu các chế độ khử protein phù hợp

để thu được chitin tinh sạch (hàm lượng khoáng và protein < 1%). Hình 3.7 biểu diễn kết quả đánh giá ảnh hưởng của nồng độ NaOH (2%, 3% và 4%), nhiệt độ khử (30°C, 50°C và 70°C) đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng protein còn lại trong chitin. Nhìn chung, hiệu suất thu hồi và hàm lượng protein còn lại trong chitin thu nhận từ mẫu vỏ lột xác ướt (Hình 3.7a) và mẫu vỏ lột xác khô (Hình 3.7b) giảm dần khi tăng nồng độ NaOH và nhiệt độ xử lý. Hàm lượng protein còn lại trong mẫu chitin xử lý ở nồng độ NaOH 2% (mẫu vỏ lột xác khô và ướt) cao hơn so với các mẫu chitin còn lại ở các chế độ nhiệt độ khác nhau. Tuy nhiên, không có sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) về hàm lượng khoáng còn lại trong mẫu chitin xử lý ở nồng độ NaOH 3% và 4%. Khi tăng nhiệt độ xử lý từ 30°C lên 50°C thì hàm lượng protein còn lại trong các mẫu chitin giảm có ý nghĩa, nhưng khi tăng nhiệt độ lên 70°C thì hàm lượng protein còn lại giảm không đáng kể.

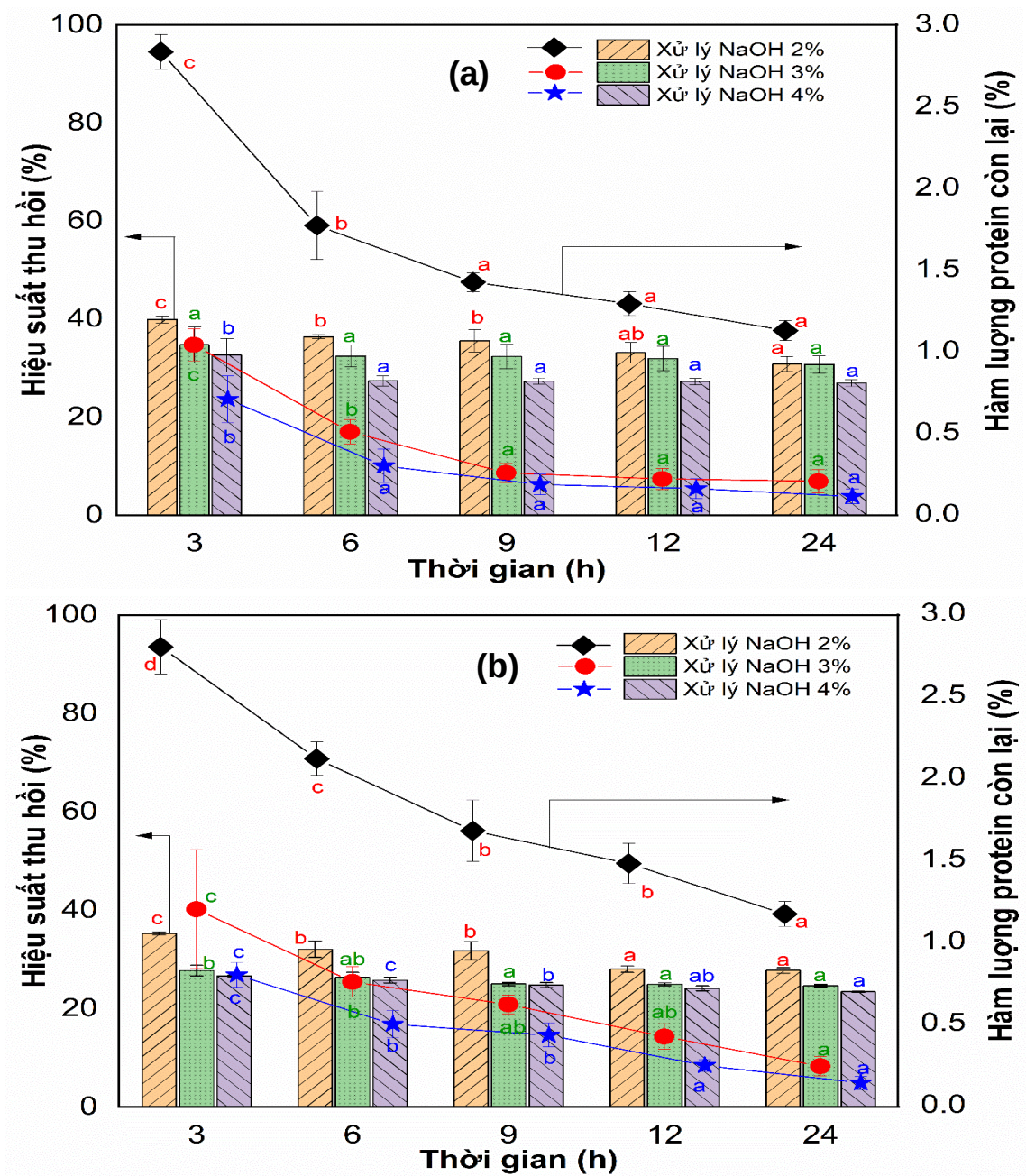
Kết quả (Hình 3.7) cho thấy cả hai yếu tố nồng độ NaOH và nhiệt độ xử lý đều ảnh hưởng lớn đến hiệu quả khử protein từ chitin thô sau khử khoáng. Nồng độ NaOH và nhiệt độ xử lý tăng sẽ làm tăng khả năng khuếch tán NaOH vào bên trong cấu trúc của chitin thô, đồng thời làm tăng vận tốc phản ứng khử protein. Cơ chế và tốc độ của quá trình loại bỏ protein trong vỏ tôm bằng dung dịch NaOH liên quan trực tiếp đến bản chất liên kết giữa chitin và protein. Rất nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng có sự liên kết chặt chẽ giữa chitin và protein trong các vỏ giáp xác [161]. Theo Brine (1982) [46], Chang và Tsai (1997) [58], các liên kết giữa chitin-protein có thể chia thành 4 nhóm chính gồm: (1) liên kết loại bazơ Schiff, (2) liên kết acetal (O-glycosidic), (3) liên kết amide (N-glycosidic và N-acylglucosaminyl) và (4) các liên kết cộng hóa trị mạnh. Ba loại liên kết đầu đóng góp 68-91% tương tác giữa chitin và protein. Trong khi, các liên kết cộng hóa trị đóng góp 32-9% và rất khó bị loại bỏ trong quá trình khử protein. Mặt khác, về mặt không gian, các phân tử/chuỗi protein có thể được phân trong nền chitin theo các vị trí khác nhau (trên bề mặt, trong vùng vô định hình, hoặc trong vùng có độ rắn cao) [46, 99, 142]. Hơn nữa, thành phần của các protein có trong vỏ tôm cũng khác nhau tùy theo loài và lứa tuổi [46]. Do đó, trong quá trình loại bỏ protein trong vỏ tôm để thu hồi chitin bằng NaOH, tốc độ phản ứng sẽ có sự khác nhau đáng kể theo thời gian phản ứng, nhiệt độ phản ứng và nồng độ NaOH. Các phân tử protein có liên kết lỏng lẻo với chitin và tồn tại trên bề mặt và tại các vùng vô định hình giữa các lớp chitin sẽ bị khử trước. Trong khi đó, các protein liên kết cộng hóa trị chặt chẽ với chitin và nằm trong vùng có độ rắn cao khó bị khử hơn rất nhiều. Quá trình thủy phân protein ở các lớp sâu bên trong đòi hỏi năng lượng hoạt hóa lớn hơn và tương tác nhiều hơn hay nói cách khác cần nhiệt độ cao hơn, thời gian dài hơn, nồng độ NaOH cao hơn. Đặc biệt, yếu tố nhiệt độ đóng vai trò quan trọng đến hiệu quả khử protein. Cụ thể, khi nhiệt độ tăng thì động năng chuyển động của các phân tử OH⁻ (tách ra từ NaOH) sẽ tăng, dẫn đến tương tác của các ion này với liên kết chitin-protein tăng, dẫn đến hiệu quả cắt các liên

kết trên tăng lên. Khi nồng độ NaOH cao hơn và thời gian phản ứng kéo dài thì số lượng các ion OH⁻ tăng và thời gian đi sâu hơn vào cấu trúc chặt chẽ của chitin-protein ở các lớp bên trong. Do đó, hiệu quả khử protein tăng lên nhưng vẫn chậm hơn giai đoạn đầu và ở nồng độ NaOH thấp hơn. Cần lưu ý, với thời gian dài và nồng độ NaOH cao sẽ xảy ra sự cắt mạch chitin mạnh hơn và hiệu suất thu hồi sẽ giảm.

Căn cứ theo yêu cầu đặt ra, hàm lượng protein còn lại trong chitin phải < 1%, nhiệt độ khử protein 50°C là nhiệt độ phù hợp cho cả mẫu vỏ lột xác ướt và khô. Mẫu chitin xử lý ở nồng độ NaOH 2% và 50°C không đáp ứng yêu cầu (hàm lượng protein còn lại trong chitin thu nhận từ mẫu vỏ lột xác ướt và khô lần lượt là 1,1% và 1,2%). Hàm lượng protein còn lại trong mẫu chitin xử lý ở nồng độ NaOH 3% và 4% ở nhiệt độ 50°C đều thỏa mãn yêu cầu chất lượng (hàm lượng protein < 1%), tuy nhiên hiệu suất thu hồi chitin của mẫu xử lý ở nồng độ NaOH 4% thấp hơn ý nghĩa so với mẫu xử lý ở nồng độ NaOH 3% (đối với cả mẫu vỏ lột xác khô và ướt). Nguyên nhân có thể do ở nồng độ NaOH cao kết hợp với nhiệt độ cao sẽ thúc đẩy quá trình thủy phân cắt mạch chitin, làm tăng khả năng hòa tan và thất thoát chitin trong quá trình rửa trung tính nên làm giảm hiệu suất thu hồi. Như vậy, căn cứ vào các phân tích trên, cho phép lựa chọn điều kiện khử protein phù hợp cho chitin thô sau khi khử khoáng đối với cả mẫu vỏ lột xác ướt và khô là nồng độ NaOH 3% và nhiệt độ 50°C.

Nhiệt độ khử protein 50°C được lựa chọn để tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nồng độ NaOH (2%, 3% và 4%) và thời gian (3, 6, 9, 12 và 24 giờ) đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng protein còn lại trong chitin. Kết quả thu được cho thấy, nồng độ NaOH và thời gian xử lý ảnh hưởng lớn đến hiệu quả khử protein đối với cả chitin thô thu nhận từ mẫu vỏ lột xác ướt (Hình 3.8a) và mẫu vỏ lột xác khô (Hình 3.8b). Hàm lượng protein còn lại trong mẫu chitin xử lý ở các nồng độ NaOH khác nhau (2%, 3% và 4%) giảm sau 6 giờ xử lý đầu tiên, tuy nhiên khi kéo dài thời gian xử lý lên 24 giờ thì hàm lượng protein còn lại giảm không đáng kể. Do vậy, xử lý trong 6 giờ là thời gian phù hợp để khử protein khỏi chitin thô sau khi khử khoáng. Mẫu chitin xử lý ở nồng độ NaOH 2% trong 6 giờ (mẫu ướt và mẫu khô) đều không thỏa mãn yêu cầu đặt ra do hàm lượng protein đều > 1%. Nguyên nhân do hàm lượng NaOH không đủ để phản ứng loại bỏ protein khỏi chitin thô. Đối với mẫu chitin xử lý ở nồng độ NaOH 3% và 4% (mẫu ướt và mẫu khô) đều thỏa mãn yêu cầu về chất lượng (hàm lượng protein < 1%), tuy nhiên hiệu suất thu hồi của mẫu xử lý ở nồng độ NaOH 4% thấp hơn so với mẫu xử lý ở nồng độ NaOH 3%. Kết quả một phần do hàm lượng protein còn lại trong mẫu chitin xử lý ở nồng độ NaOH 4% thấp hơn so với mẫu xử lý ở nồng độ NaOH 3%. Ngoài ra, ở nồng độ NaOH cao hơn sẽ thúc đẩy quá trình thủy phân cắt mạch chitin làm thất thoát trong quá trình thu hồi. Hàm lượng protein còn lại trong mẫu chitin thu từ vỏ lột xác ướt thấp

hơn so với mẫu vỏ lột xác khô. Kết quả này có thể được giải thích do quá trình làm khô vỏ lột xác sau xi phong đã làm thay đổi cấu trúc, gây cản trở quá trình khuếch tán và tiếp xúc của NaOH để khử protein.



Hình 3.8. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH và thời gian đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng protein còn lại trong chitin tinh sạch; (a) đối với vỏ lột xác ướt, (b) đối với vỏ lột xác khô.

Các ký tự khác nhau trên đồ thị (màu sắc theo cột nồng độ (đỏ: NaOH 2%, xanh lục: NaOH 3%, xanh: NaOH 4%), riêng màu đen theo nhiệt độ) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Với yêu cầu đặt ra là hàm lượng protein trong mẫu chitin tinh phải $< 1\%$, đồng thời làm giảm chi phí hóa chất trong sản xuất, làm giảm tác động xấu của hóa chất đến môi trường và chất lượng của chitin cho phép lựa chọn chế độ khử protein phù

hợp đối với cả chitin thô thu nhận từ vỏ lột xác ướt và vỏ lột xác khô là nồng độ NaOH 3% và thời gian 6 giờ, khi đó hiệu suất thu hồi chitin là 32,4% % cho vỏ lột xác ướt và 26,3% % cho vỏ lột xác khô. So với các nghiên cứu khác đã công bố trên đối tượng vỏ tôm từ quá trình chế biến, hiệu suất thu hồi chitin chỉ đạt khoảng 17-29% [9, 21, 129]. Hiệu quả thu nhận chitin cao có thể do cấu trúc của nguyên liệu vỏ lột xác khác với của vỏ tôm được lột từ quá trình chế biến, mềm và xốp do chất khoáng tồn tại dưới dạng tinh thể calci và calci carbonat vô định hình [88, 162]. Protein trong vỏ lột xác vẫn được liên kết với các lớp chitin, tuy nhiên tập trung chủ yếu ở lớp biểu bì nên hàm lượng có trong nguyên liệu thấp [73, 88, 120]. Đây là yếu tố quan trọng để chitin có thể được thu hồi dễ dàng hơn, tiết kiệm hóa chất và thời gian xử lý nhưng có thể thu được sản phẩm có chất lượng cao, đồng thời hiệu suất thu cao hơn so với đối tượng vỏ tôm từ nhà máy chế biến.

Từ những đánh giá ảnh hưởng của nồng độ NaOH và nhiệt độ, ảnh hưởng của nồng độ NaOH và thời gian đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng protein còn lại trong chitin thu nhận từ mẫu vỏ lột xác ướt và mẫu vỏ lột xác khô cho phép rút ra điều kiện khử protein phù hợp là nồng độ NaOH 3%, nhiệt độ 50°C và thời gian 6 giờ.

Theo chế độ sản xuất chitin từ vỏ tôm lột xác (độ ẩm khoảng 70%) bằng HCl 4%, 30°C, 3 giờ và NaOH 3%, 50°C, 6 giờ (Hình 3.8b), chúng ta có thể thu hồi chitin cao hơn 1/3 so với kết quả ở Bảng 3.6 ($32,4 \pm 2,2$, %). So với các nghiên cứu khác đã công bố và được sản xuất từ phụ phẩm của quá trình chế biến tôm thải ra, hàm lượng chitin của quy trình nghiên cứu này thu được cao hơn hẳn, chỉ thu hồi trong khoảng 17 – 29% [9, 21, 129]. Kết quả cho thấy chế độ xử lý của quy trình nghiên cứu phù hợp để sản xuất ra sản phẩm chitin có chất lượng cao (hàm lượng khoáng và protein đạt dưới 1%), hiệu suất thu cao (32%), thời gian rút ngắn (khử khoáng 3 giờ, khử protein 6 giờ), hóa chất sử dụng nồng độ thấp (HCl 4%, NaOH 3%) và nhiệt độ thấp (30 – 50°C) nên dễ kiểm soát và ứng dụng ở quy mô công nghiệp (tỷ lệ nguyên liệu ướt/dung dịch là 1/5, w/v).

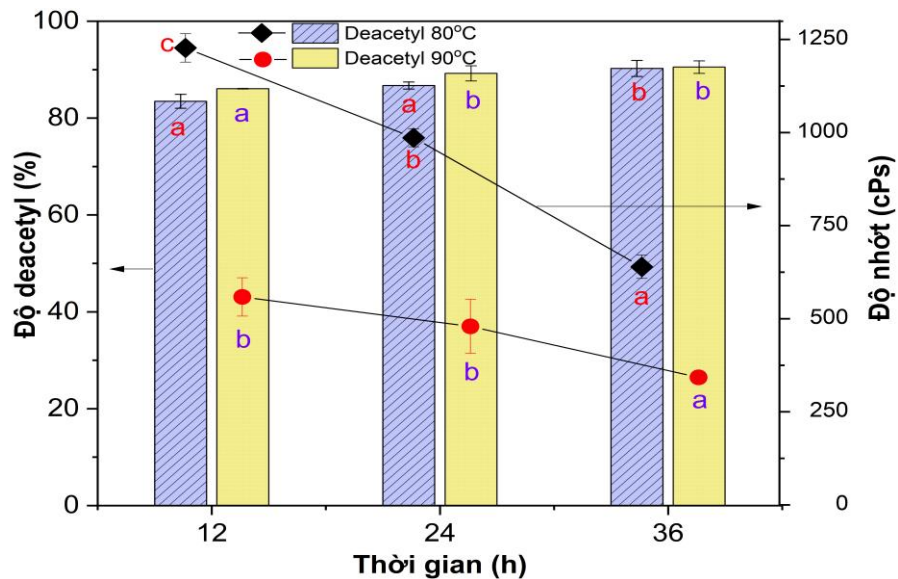
Điều kiện sản xuất chitin của nghiên cứu trong luận án có ưu điểm vượt trội hơn so với quy trình cải tiến của Minh và cộng sự (2017) [129], xử lý qua 3 giai đoạn: (1) khử khoáng bằng HCl 4% (1/5, w/v) ở 50°C trong 10 giờ, (2) khử protein bằng NaOH 3% (1/5, w/v) ở 70°C trong 12 giờ và (3) khử màu với H₂O₂ 0,5% (1/15, w/v) ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Quy trình này được đánh giá cải tiến về thời gian xử lý ngắn và nâng cao chất lượng sản phẩm chitin (hàm lượng khoáng và protein < 1%) được sản xuất từ đầu vỏ tôm thu nhận từ quá trình chế biến thủy sản. Vậy, ưu điểm của quy trình sản xuất chitin từ vỏ lột xác là chỉ cần 2 giai đoạn khử khoáng và protein (không cần qua giai đoạn khử màu), hiệu suất thu hồi chitin cao và đạt chất lượng cao. Giai đoạn

khử khoáng (1): hàm lượng khoáng cao nhưng vẫn được xử lý bằng HCl 4%, nhiệt độ thấp (30°C), thời gian rất ngắn (3 giờ). Giai đoạn khử protein (2): NaOH 3%, nhiệt độ thấp (50°C), thời gian rất ngắn (6 giờ).

Vậy, quy trình sản xuất chitin từ nguyên liệu vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng được thực hiện qua hai bước khử khoáng và protein (không cần thêm bước khử màu) với thời gian rất ngắn. Chế độ khử khoáng bằng HCl 4% ở nhiệt độ 30°C trong 3 giờ và chế độ khử protein bằng NaOH 3% ở nhiệt độ 50°C trong 6 giờ. Sản phẩm chitin thu được có chất lượng cao (hàm lượng khoáng và protein dưới 1%), đạt tiêu chuẩn chitosan thương mại.

3.3. Nghiên cứu điều kiện sản xuất chitosan và đề xuất quy trình sản xuất chitosan từ vỏ tôm lột xác

3.3.1. Ảnh hưởng của điều kiện deacetyl đến hiệu suất thu hồi và tính chất cơ bản của chitosan



Hình 3.9. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian xử lý đến độ deacetyl và độ nhớt của chitosan.

Các ký tự khác nhau trên đồ thị (màu sắc theo nhiệt độ (đỏ: 80°C, tím: 90°C)) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Để xác định ảnh hưởng của điều kiện sản xuất chitosan, lựa chọn mẫu chitin thu nhận từ vỏ lột xác ướt từ quy trình đề xuất (Hình 3.9). Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ (80°C và 90°C) và thời gian (12, 24 và 36 giờ) đến hiệu suất thu hồi và tính chất lý hóa cơ bản của chitosan được thể hiện trên Hình 3.9 và Bảng 3.7. Độ deacetyl tăng khi tăng nhiệt độ và thời gian xử lý, trong khi độ nhớt của chitosan giảm (Hình 3.9). Mẫu chitosan xử lý ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 12 và 24 giờ đạt DD từ 86% đến 90%. Trong đó, các mẫu chitosan xử lý ở 80°C trong 12 và 24 giờ có độ DD đạt lần lượt $83,5 \pm 1,4\%$ và $86,7 \pm 0,7\%$, kết quả tương đương với mẫu chitosan được xử lý ở 90°C

trong 12 giờ (DD 86%) (Hình 3.9). Kết quả cho thấy việc sử dụng NaOH 50% trong khoảng thời gian 12 – 24 giờ đạt hiệu quả deacetyl cao hơn so với nghiên cứu của Phạm Thị Đan Phượng và Trang Sĩ Trung (2012) [9] với chế độ deacetyl NaOH 60% (nhiệt độ 65°C, thời gian 20 giờ) đạt DD khoảng 84%. Sự khác biệt về hiệu quả deacetyl là do cấu trúc vỏ lột xác của tôm khác so với cấu trúc của vỏ tôm thu nhận từ nhà máy chế biến. Sự giảm độ nhớt của chitosan khi tăng nhiệt độ và thời gian xử lý là do tăng quá trình cắt mạch chitosan. Yếu tố nhiệt độ và thời gian có ảnh hưởng lớn đến sự cắt mạch và làm giảm độ nhớt của chitosan, vì trong quá trình deacetyl đến khi chitosan đạt đến DD nhất định thì hiện tượng cắt mạch chitosan xảy ra là chủ yếu [98, 136].

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian deacetyl đến hiệu suất thu hồi chitosan, độ tan và hàm lượng khoáng, protein còn lại

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giờ)	Hiệu suất thu hồi chitosan (%) [*]	Độ tan (%) [*]	Khoáng (%) [*]	Protein (%) [*]
80°C	12h	24,2 ± 2,5 ^a	97,0 ± 0,8 ^a	0,5 ± 0,1 ^a	0,11 ± 0,0 ^b
	24h	23,6 ± 2,9 ^a	99,0 ± 0,1 ^b	0,5 ± 0,1 ^a	0,07 ± 0,0 ^{ab}
	36h	23,3 ± 3,0 ^a	99,0 ± 0,2 ^b	0,3 ± 0,1 ^a	0,02 ± 0,0 ^a
90°C	12h	24,2 ± 2,6 ^a	97,7 ± 0,7 ^a	0,3 ± 0,2 ^a	0,15 ± 0,1 ^a
	24h	23,0 ± 2,4 ^a	99,0 ± 0,2 ^b	0,2 ± 0,1 ^a	0,10 ± 0,1 ^a
	36h	22,1 ± 3,3 ^a	99,1 ± 0,2 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,09 ± 0,0 ^a

^{*}Tính trên hàm lượng chất khô tuyệt đối; Các giá trị trong bảng (theo cột) có ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Khi tăng nhiệt độ (từ 80°C lên 90°C) và tăng thời gian xử lý từ 12 giờ lên 24 giờ và 36 giờ thì hiệu suất thu hồi chitosan, hàm lượng khoáng và hàm lượng protein có xu hướng giảm dần, nhưng không có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê. Tuy nhiên, độ tan của mẫu chitosan xử lý ở nhiệt độ 80°C và 90°C tăng có ý nghĩa khi tăng thời gian xử lý từ 12 giờ lên 24 giờ, sau đó có xu hướng không đổi khi tăng thời gian xử lý lên 36 giờ (Bảng 3.7). Dựa vào mục tiêu thu hồi chitosan để điều chế muối chitosan lactate (hòa tan tốt trong nước) để có thể ứng dụng trong thu hoạch vi tảo biển: độ deacetyl cao (khoảng 90%), độ tan cao (trên 99%) để chọn sản phẩm chitosan đạt yêu cầu. Đồng thời để tiết kiệm thời gian xử lý và độ nhớt của sản phẩm không quá thấp (khối lượng phân tử thấp) thì chế độ xử lý ở 90°C trong 24 giờ là phù hợp, sản phẩm có độ nhớt đạt khoảng 479 cPs và hiệu suất chitosan đạt khoảng 23%.

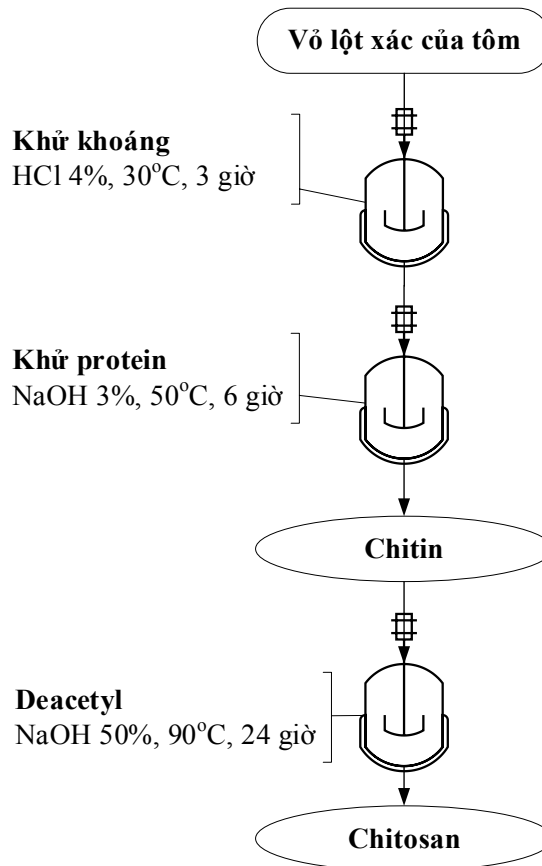
3.3.2. Đề xuất quy trình sản xuất chitosan và đánh giá tính chất hóa lý của sản phẩm

Vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng nuôi thâm canh được thu hồi bằng phương pháp xi phông vào mỗi buổi sáng, loại bỏ nước thải ao nuôi. Vỏ tôm lột xác được tiến hành rửa bằng nước sạch (3 lần) đảm bảo sạch phân, thức ăn thừa, phân loại tôm chết và chất thải rắn khác.

Khử khoáng vỏ tôm lột xác bằng HCl 4% ở 30°C trong vòng 3 giờ với tỷ lệ là 1:5 (mẫu/acid). Lưu ý khuấy đều trong vòng 30 phút đầu tiên đến khi giảm bọt và chìm mẫu ngập acid, để yên đến khi đúng giờ thì lọc và rửa mẫu về pH trung tính thu chitin thô.

Tiếp tục, khử protein mẫu chitin thô bằng NaOH 3% ở 50°C với tỷ lệ 1:5 (mẫu/kiềm). Để yên mẫu ủ trong vòng 6 giờ và rửa về trung tính sau khi lọc để thu chitin tinh sạch.

Chitin tinh sạch được deacetyl hóa bằng NaOH 50% (w/v) ở 90°C trong vòng 24 giờ (tỷ lệ 1:5, w/v). Sau khi lọc và rửa về trung tính, thu được sản phẩm chitosan tinh sạch.



Hình 3.10. Quy trình sản xuất chitin, chitosan từ vỏ lột xác của tôm.

So sánh quy trình sản xuất chitin, chitosan của luận án (Hình 3.10) từ nguồn vỏ lột xác với quy trình của Phụng và Trung (2012) [9] từ nguồn vỏ tôm thẻ chân trắng thu từ quá trình chế biến thủy sản có sự khác biệt về các bước thực hiện, lượng hóa chất sử dụng, nhiệt độ và thời gian xử lý. Đối với vỏ tôm lột từ quá trình chế biến, hàm lượng protein (24,3%) và khoáng (26,5%) cao gấp đôi và thấp hơn một nửa theo thứ tự so với hàm lượng chứa trong vỏ lột xác. Do vậy, quá trình được khử protein được tiến hành trước khi khử khoáng với các thông số kỹ thuật: NaOH 5% (1:5, w/v), nhiệt độ phòng, 24 giờ và HCl 4% (1:5, w/v), nhiệt độ phòng, 12 giờ. Vậy, Hình 3.10 cho thấy lượng hóa chất sử dụng để khử

khoáng có nồng độ và nhiệt độ xử lý tương đương nhưng thời gian xử lý rất ngắn trong khi hàm lượng khoáng trong nguyên liệu rất cao. Quy trình tiết kiệm được lượng NaOH để khử protein đáng kể với thời gian ngắn $\frac{1}{2}$ thời gian xử lý nhưng nhiệt độ không quá cao (50°C). Đặc biệt, đối với nguyên liệu vỏ lột xác của tôm thì không cần công đoạn khử màu trong quá trình sản xuất chitin.

Mẫu vỏ lột xác ướt (10 kg/mẻ) được sản xuất theo quy trình Hình 3.10, sản phẩm (Hình 3.11) được phân tích thành phần và tính chất cơ bản ở Bảng 3.8. Hiệu suất thu hồi chitin (32%) và chitosan (23%) đạt rất cao. Trong đó, các thành phần khoáng và protein còn lại đảm bảo < 1%, màu sắc của mẫu trắng sáng, độ ẩm của mẫu khoảng 10%, đáp ứng điều kiện của chitosan thương mại [21]. Ngoài ra, sản phẩm chitin, chitosan được đánh giá các chỉ tiêu: hàm lượng amino acid còn lại, hàm lượng khoáng chất còn lại và kim loại nặng, xác định cấu trúc và các nhóm chức bằng phương pháp SEM, FTIR, $^1\text{H-NMR}$ và XRD.

Bảng 3.8. Thành phần và tính chất cơ bản của chitin, chitosan được sản xuất từ vỏ tôm lột xác

Thành phần và tính chất	Chitin	Chitosan
Hiệu suất thu hồi (%) [*]	32,4 $\pm$ 2,2	23,0 $\pm$ 2,4
Hàm lượng khoáng còn lại (%) [*]	0,6 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2
Hàm lượng protein còn lại (%) [*]	0,5 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1
Độ deacetyl (%) [*]	-	89,4 $\pm$ 1,6
Độ nhớt (cPs) [*]	-	479 $\pm$ 72
Độ tan (%) [*]	-	99,0 $\pm$ 0,2
Khối lượng phân tử (Mw, kDa)	-	512,2 $\pm$ 42,0
Màu sắc	Trắng	Trắng
Trạng thái	Khô	Khô

^{*}Tính trên hàm lượng chất khô tuyệt đối; (-) Không phân tích



Hình 3.11. Sản phẩm chitin (a), chitosan (b) từ vỏ tôm lột xác.

Bảng 3.9. Thành phần amino acid còn lại trong chitosan

Amino acid (%)*	Kết quả	Amino acid (%)*	Kết quả
Cystine	-	Isoleucine	-
Aspartic	-	Leucine	-
Methionine	-	Tyrosine	-
Threonine	-	Phenylalanine	-
Serine	-	Histidine	-
Glutamic	-	Lysine	-
Glycine	-	Arginine	-
Alanine	-	Proline	-
Valine	-	Tryptophane	-

*Phương pháp phân tích amino acids: EC152/2009 (VF); LOD: Amino acids 0,01g/100g;

“-” Không phát hiện.

Bảng 3.10. Thành phần khoáng còn lại và kim loại nặng trong chitosan

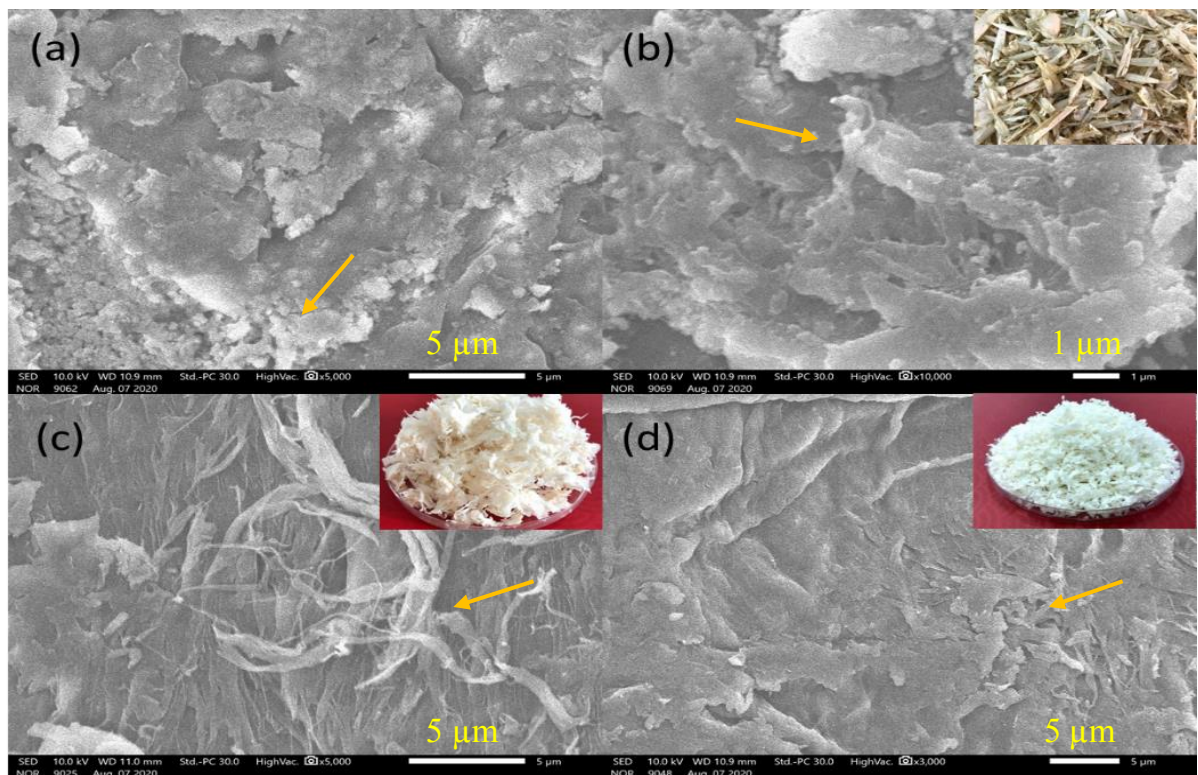
STT	Kim loại	Phương pháp phân tích	Kết quả (mg/kg)	Tiêu chuẩn sản phẩm chitosan thương mại*
1	Arsenic (As)	GE297-ICP MS (VF)	0,02	$\leq 0,5$
2	Mercury (Hg)	GE297-ICP MS (VF)	0,01	-
3	Cadmium (Cd)	GE297-ICP MS (VF)	0,01	-
4	Lead (Pb)	GE297-ICP MS (VF)	0,50	≤ 10
5	Sodium (Na)	GE297-ICP MS (VF)	28,28	-
6	Potassium (K)	GE297-ICP MS (VF)	20,89	-
7	Calcium (Ca)	GE297-ICP MS (VF)	21,57	-
8	Magnesium	GE297-ICP MS (VF)	7,20	-
9	Iron (Fe)	GE297-ICP MS (VF)	57,22	-
10	Zinc (Zn)	GE297-ICP MS (VF)	5,69	-
Hàm lượng khoáng tổng (%)		EC 152/2009 (VF)	$< 0,2$	$\leq 0,5$

“-” Không quy định; *Standard SC/T3403-2004 [206].

Theo kết quả phân tích tại Bảng 3.8 và Bảng 3.9 cho thấy chất lượng chitosan rất tinh sạch. Hàm lượng protein quá thấp để có thể nhận diện, 18 amino acid được phân tích nhưng không phát hiện được. Hàm lượng khoáng còn lại $< 0,2\%$, đạt yêu cầu chất lượng của sản phẩm chitosan thương mại quy định theo tiêu chuẩn Standard SC/T3403-2004. Trong đó, thành phần kim loại nặng (As, Hg, Cd, Pd) được xác định với hàm lượng (mg/kg) thấp hơn tiêu chuẩn quy định dư lượng cho phép [206]. Vậy, sản phẩm

chitosan được sản xuất theo quy trình đề xuất đảm bảo chất lượng để ứng dụng để thu hồi vi tảo làm thức ăn nuôi thủy sản.

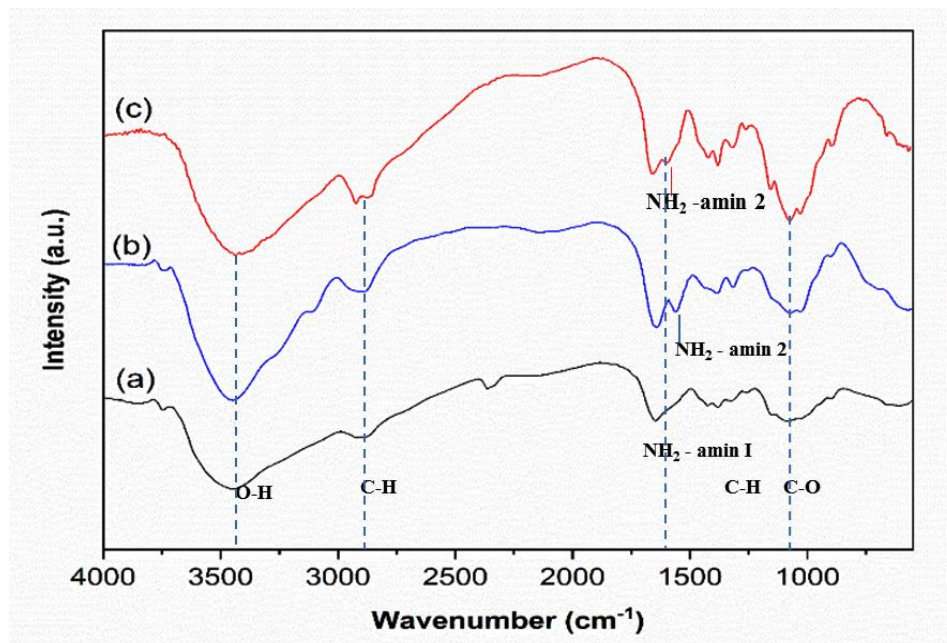
Hình 3.12 chụp ảnh SEM của các mẫu vỏ tôm lột xác ở các độ phóng đại khác nhau gồm (a) 5 μ m và (b) 1 μ m, chitin (c) 5 μ m và chitosan (d) 5 μ m được sản xuất từ vỏ (b). Hình ảnh biểu hiện trạng thái bề mặt của lớp vỏ tôm lột xác gồm các lớp chitin-protein và các hạt khoáng vô định hình bám quanh lớp polyme. Điều này phù hợp với nghiên cứu của các nghiên cứu trước [73, 88, 120, 162]. Sau khi vỏ thô được khử khoáng và protein, các sợi chitin lộ rõ ra và không còn thấy sự hiện diện của các thành phần khác. Hình 3.12c cho thấy rõ các sợi chitin mạch dài và Hình 3.12d biểu hiện có sự cắt mạch chitin và cấu trúc chitin hầu như bị phá hủy tạo thành chitosan. Hình thái bề mặt chitosan thể hiện rõ trở nên vô định hình. Điều này cũng đã được các nhà khoa học minh chứng quá trình deacetyl hóa hình thành chitosan từ chitin khi ngâm trong dung dịch kiềm đặc [21].



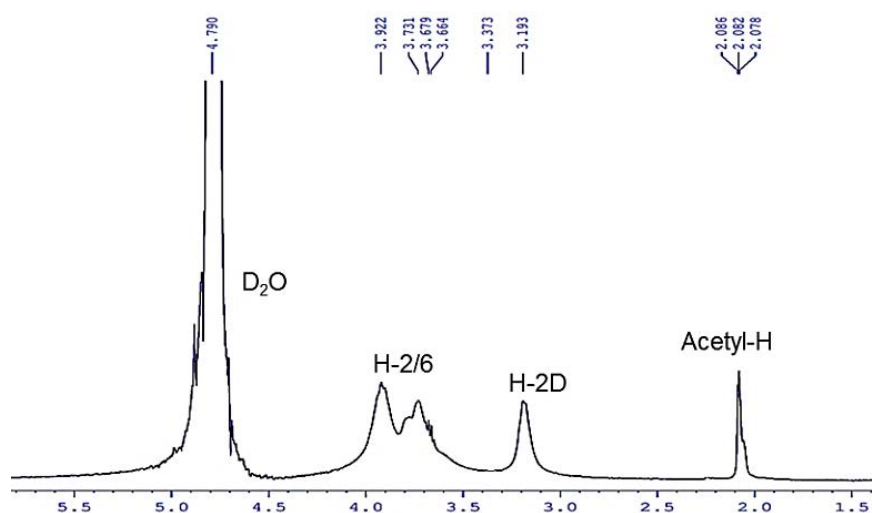
Hình 3.12. Hình ảnh SEM của vỏ lột xác (a,b) ở độ phóng đại khác nhau, chitin (c) và chitosan (d) được tách chiết từ vỏ lột xác.

Hình 3.13 và Hình 3.14 thể hiện cấu trúc hóa học của chitin, chitosan từ vỏ tôm lột xác và so sánh với chitosan từ vỏ tôm thu từ quá trình chế biến (được tách chiết cùng một quy trình Hình 3.10). Hình 3.13a biểu diễn phổ FTIR của chitin chứa một số đỉnh nổi bật ở vị trí 3447 cm^{-1} (O-H), 2991 cm^{-1} (C-H), 1640 cm^{-1} (NH_2 của amin I), 1554 cm^{-1} (NH_2 của amin II), 1378 cm^{-1} (C-H) và 950 – 1105 cm^{-1} (C-O-C và C-O). Sự hiện

diện của các đỉnh của nhóm chức phù hợp với những nghiên cứu trước đây [31, 185]. Hình 3.13b thể hiện phổ FTIR của chitosan chứa các đỉnh nổi bật ở 3433 cm^{-1} (O-H), 2891 cm^{-1} (C-H), 1646 cm^{-1} (NH_2 của amin I), 1378 cm^{-1} (C-H) và $960 - 1150\text{ cm}^{-1}$ (C-O-C và C-O). Vị trí của các đỉnh xuất hiện ở phổ FTIR của mẫu chitosan từ vỏ lột xác (Hình 3.13b) không khác biệt của mẫu chitosan từ vỏ tôm trong quá trình chế biến thải ra (Hình 3.13c). Điều này thể hiện cấu trúc hóa học của các loại chitosan giống nhau, quá trình deacetyl mẫu chitin có thể diễn ra như nhau [71, 185]. Hình 3.14 biểu diễn phổ ^1H NMR của chitosan trong dung dịch D_2O , các đỉnh đặc trưng được nhận diện ở 2,08 (NHCOCH_3), 3,19 (H-2), 3,66 – 3,92 (H-3 đến H-6) và 4,79 (H-1) ppm. Hình dạng của đỉnh proton H-1 bị ảnh hưởng bởi ở gần đỉnh của nước (4,87 ppm).



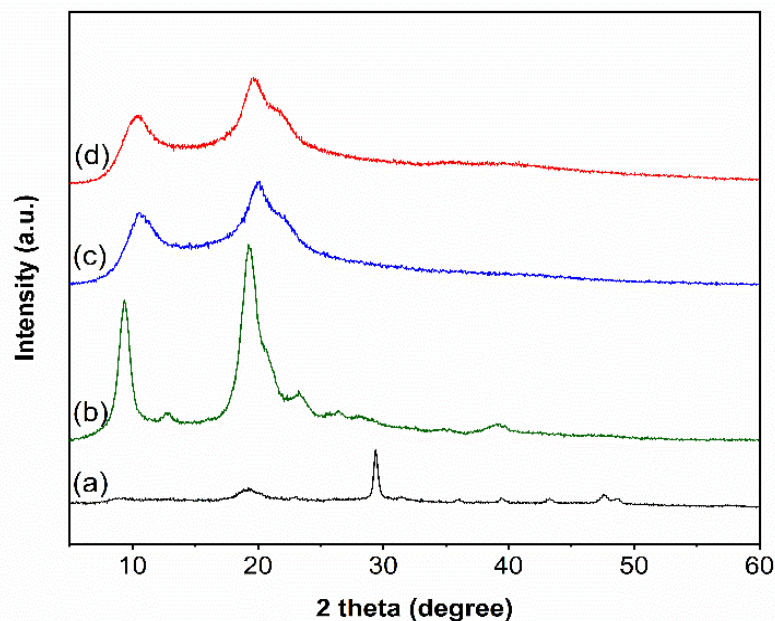
Hình 3.13. Phổ FTIR của chitin (a), chitosan (b) tách chiết từ vỏ lột xác của tôm và chitosan (c) tách chiết từ vỏ tôm chế biến.



Hình 3.14. Phổ ^1H NMR của chitosan tách chiết từ vỏ lột xác.

Hình 3.15a,b,c biểu diễn phổ XRD thứ tự của vỏ lột xác của tôm, chitin và chitosan và Hình 3.15d là phổ của chitosan tách chiết từ vỏ tôm thu trong quá trình chế biến thủy sản. Nhìn chung tất cả các mẫu được phân tích đều xuất hiện 2 đỉnh cụ thể trên phổ XRD tại 2θ trong khoảng $10^\circ - 20^\circ$. Điều này cho thấy các mẫu vỏ lột xác và chitin có độ kết tinh cao (68,25% và 67,22% tương ứng) so với mẫu chitosan (65,72%).

Đối với mẫu vỏ lột xác (Hình 3.15a) phổ nhận diện nhiều đỉnh tại 2θ trong khoảng $30^\circ - 50^\circ$, thể hiện một lượng lớn CaCO_3 nằm trong vỏ lột xác [168]. Chitin được tinh sạch khoáng chất và protein cho thấy phổ có các đỉnh sắc nét hơn, cường độ đỉnh cao hơn ở 10° so với chitosan. Độ kết tinh của chitin cao hơn chitosan vì cấu trúc tinh thể bị giảm do quá trình oxy hóa khử. Ngoài ra, cấu trúc tinh thể của hai loại chitosan được tách chiết từ vỏ tôm lột xác (Hình 3.15c) không khác biệt so với chitosan từ nguồn vỏ thải ra trong công nghệ chế biến (Hình 3.15d).



Hình 3.15. Phổ XRD của vỏ lột xác (a), chitin (b), chitosan (c) tách chiết từ vỏ lột xác và chitosan (d) tách chiết từ vỏ tôm chế biến.

3.4. Nghiên cứu điều kiện điều chế chitosan lactate và đề xuất quy trình

3.4.1. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol (% , v/v) của hỗn hợp dung môi ethanol/nước đến độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate

Độ trương nở, trạng thái của chitosan sau khi trương nở, độ tan và hiệu suất thu hồi của chitosan lactate được trình bày ở Bảng 3.11 và Hình 3.16. Kết quả cho thấy độ trương nở của chitosan giảm khi tăng nồng độ ethanol trong hỗn hợp dung môi ethanol/nước. Cụ thể, khi nồng độ ethanol là 10% thì độ trương nở của chitosan là 504%, trong khi ở nồng độ 90% thì độ trương nở là 402%. Tuy nhiên, kết quả cho thấy ở các nồng độ ethanol từ 10 đến 50% thì chitosan có độ trương nở không đồng đều và không

có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Bảng 3.11). Hơn nữa, các muối chitosan lactate thu được tạo dạng gel và có màu vàng khi chitosan được trương nở trong dung môi có nồng độ ethanol trong khoảng 0 – 40% trước khi tạo muối (Hình 3.16). Ngoài ra, sau phản ứng với lactic acid, muối chitosan lactate cũng bị tan nhiều nên hiệu suất thu hồi rất thấp. Khi tỷ lệ EtOH trong hỗn hợp dung môi trong khoảng 60 – 90%, chitosan trương nở đồng đều, sản phẩm chitosan lactate thu được dễ dàng, có độ tan tốt và hiệu suất thu hồi cao. Trong đó, tỷ lệ EtOH chiếm 70 và 80% làm trương nở chitosan tốt nhất và khi tạo muối thì thu được hiệu suất thu hồi cao hơn các hỗn hợp dung môi khác.

Khả năng trương nở của chitosan trong môi trường nước có thể được giải thích do trong cấu trúc phân tử chitosan có chứa các nhóm chức ưa nước gồm nhóm hydroxyl (-OH), nhóm amino (-NH₂), nhóm carbonyl (C=O) và nhóm aryl (C-O-C). Các nhóm này có khả năng tạo thành các liên kết hydrogen nội phân tử và lực liên kết Van der Waals giữa các phân tử chitosan với nhau. Các lực tương tác này bị tác động bởi môi trường dung môi phân tán, do vậy sự trương nở của chitosan phụ thuộc rất nhiều vào dung môi sử dụng [160]. Theo nghiên cứu của Fan và cộng sự (2013) [84], các liên kết nội phân tử trong cấu trúc chitosan bị phá vỡ khi ngâm trong môi trường chứa OH⁻, dẫn đến sự tách rời các mạch phân tử chitosan và gây ra sự trương nở. Caridade và cộng sự (2009) [53] chứng minh rằng độ trương nở tỷ lệ thuận với độ phân cực của hệ dung môi. Khi tỷ lệ nước trong hỗn hợp dung môi càng cao thì độ phân cực càng lớn, do đó độ trương nở càng cao. Cụ thể, khi ngâm chitosan trong hỗn hợp dung môi EtOH/H₂O với tỷ lệ EtOH 0 – 75% thì cấu trúc chitosan chuyển từ trạng thái rắn sang trạng thái mềm dẻo. Trong đó, tỷ lệ EtOH 60% thì độ rắn của chitosan giảm nhiều khoảng 80 lần. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Tuckerman và cộng sự (2002) [186] trong mạch chitosan có sự cân bằng về các nhóm ưa nước và nhóm kỵ nước, khi ngâm chitosan trong nước sẽ thúc đẩy sự hình thành các liên kết hydrogen giữa các nhóm ưa nước của phân tử chitosan với các phân tử nước, làm cho chitosan bị trương nở.

Đối với quá trình tạo muối chitosan lactate trong cùng điều kiện phản ứng, các mẫu được trương nở (tỷ lệ EtOH/H₂O 60 – 90%) cho hiệu suất thu hồi chitosan lactate và độ tan của muối cao hơn so với mẫu đối chứng (Bảng 3.11). Điều này có thể được giải thích vì quá trình trương nở sẽ giúp chitosan mở rộng cấu trúc, giãn mạch tạo không gian để các phân tử nước tồn tại bên trong cấu trúc hạt chitosan ban đầu, đồng thời làm giảm độ cứng của chitosan. Khi cho chitosan đã trương nở phản ứng với lactic acid, cấu trúc chitosan mở rộng và có chứa các phân tử nước giúp cho quá trình khuếch tán của acid vào trong thể tích hạt chitosan dễ dàng hơn [53].

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của tỷ lệ EtOH (% v/v) trong dung môi ethanol/nước đến độ trương nở của chitosan, trạng thái, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate

Tỷ lệ EtOH/H ₂ O (%)	Độ trương nở (%)*	Trạng thái chitosan sau khi ngâm	Trạng thái chitosan lactate	Độ tan (%)*	HSTH (%)*
ĐC	-	Chitosan ban đầu dạng hạt	Hạt rời	83,7 ± 2,1 ^a	138,3 ± 3,3 ^b
0	506,0 ± 28,3 ^d	Trương nở, không đều	Tạo gel	-	-
10	504,0 ± 27,9 ^d	Trương nở, không đều	Tạo gel	-	-
20	501,2 ± 27,8 ^d	Trương nở, không đều	Tạo gel	-	-
30	493,7 ± 26,9 ^{cd}	Trương nở, không đều	Tạo gel	-	-
40	474,4 ± 23,3 ^{cd}	Trương nở, không đều	Tạo gel	-	-
50	466,8 ± 14,4 ^{bcd}	Trương nở, không đều	Vón cục	98,2 ± 0,9 ^b	132,1 ± 1,2 ^a
60	452,3 ± 4,7 ^{bc}	Trương nở, đồng đều	Vón cục	98,3 ± 1,4 ^b	143,6 ± 2,7 ^{bc}
70	450,6 ± 6,5 ^{bc}	Trương nở, đồng đều	Hạt rời	98,1 ± 0,3 ^b	151,0 ± 1,5 ^d
80	428,8 ± 2,0 ^{ab}	Trương nở, đồng đều	Hạt rời	98,0 ± 0,8 ^b	151,6 ± 0,5 ^d
90	402,3 ± 3,4 ^a	Trương nở, đồng đều	Hạt rời	96,3 ± 0,3 ^b	146,3 ± 5,0 ^{cd}

* Tính trên hàm lượng chất khô tuyệt đối. Các giá trị trong bảng có ký tự khác nhau thì thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Do các mẫu sản phẩm chitosan lactate tạo gel và bị hòa tan trong dung môi sau phản ứng khi chitosan được trương nở trong các dung môi có tỷ lệ EtOH/H₂O trong khoảng 10 – 40 %, nên không thể tính được độ tan và hiệu suất thu hồi.



Hình 3.16. Chitosan ngâm trương nở trong EtOH/H₂O ở các tỷ lệ dung môi khác nhau (a), chitosan sau trương nở phản ứng với lactic acid 1M trong 6h (b) và chitosan lactate (c) thu được.

Từ kết quả và phân tích trên, tỷ lệ 70% EtOH (v/v) được chọn để ngâm chitosan trước khi cho phản ứng với acid tạo muối là phù hợp nhất do sản phẩm chitosan lactate thu được có độ tan cao (>98%), hiệu quả thu cao (151%) và tiết kiệm được lượng ethanol sử dụng so với kết quả tương đương khi ngâm chitosan trong dung môi có chứa 80% EtOH.

3.4.2. Ảnh hưởng của thời gian ngâm chitosan đến độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate

Bảng 3.12 trình bày độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate khi ngâm chitosan trong hỗn hợp dung môi EtOH/H₂O với tỷ lệ EtOH (70%) trong khoảng thời gian từ 0,25 – 12 giờ. Kết quả nghiên cứu cho thấy thời gian ngâm trong dung môi không ảnh hưởng lớn đến độ trương của chitosan. Cụ thể, sau 15 phút ngâm chitosan trong dung môi EtOH/H₂O (70% EtOH, v/v) thì độ trương nở của

chitosan đạt 425% và tăng không đáng kể trong khoảng 445 – 451% (không khác biệt có ý nghĩa thống kê) khi tăng thời gian ngâm trong khoảng 0,5 – 12 giờ. Tuy nhiên, thời gian ngâm có ảnh hưởng rõ đến hiệu quả tạo muối chitosan lactate thể hiện qua hiệu suất thu hồi và độ tan của sản phẩm thu được. Số liệu từ Bảng 3.12 cho thấy thời gian ngâm chitosan càng lớn thì hiệu suất thu hồi và độ tan của muối chitosan lactate càng cao. Ví dụ, khi ngâm trong thời gian 15 phút thì hiệu suất thu hồi và độ tan của chitosan lactate lần lượt là 140% và 90%. Còn khi ngâm trong 30 phút thì hiệu suất thu hồi và độ tan tăng lên 143% và 93%. Giá trị hiệu suất thu hồi (151%) và độ tan (98,5%) đạt cao nhất khi ngâm chitosan trong 4 giờ và sau đó gần như giữ nguyên khi tăng thời gian tương nở lên 12 giờ. Ngoài ra, các giá trị này cao hơn nhiều so với mẫu chitosan không tương nở trước khi tạo muối (Bảng 3.11) trong cùng điều kiện phản ứng.

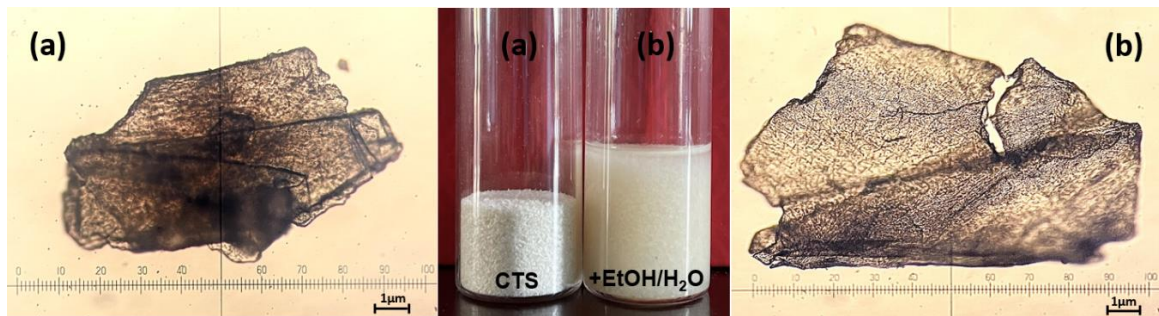
Bảng 3.12. Ảnh hưởng của thời gian ngâm chitosan đến độ tương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate

Thời gian ngâm (giờ)	Độ tương nở (%) [*]	Độ tan (%) [*]	HSTH (%) [*]
0,25	425,2 ± 3,2 ^a	90,7 ± 1,8 ^a	140,4 ± 3,4 ^a
0,5	445,6 ± 3,3 ^b	93,8 ± 1,7 ^{ab}	143,9 ± 2,5 ^{ab}
1	446,3 ± 2,7 ^b	94,4 ± 1,5 ^{abc}	144,6 ± 4,2 ^{ab}
2	447,8 ± 2,8 ^b	94,9 ± 1,1 ^{bcd}	146,2 ± 2,9 ^{ab}
3	448,3 ± 1,5 ^b	95,0 ± 1,1 ^{bcd}	147,7 ± 3,1 ^{ab}
4	451,2 ± 3,2 ^b	98,5 ± 0,3 ^d	151,1 ± 2,2 ^b
6	450,9 ± 6,4 ^b	98,1 ± 0,4 ^{cd}	151,0 ± 1,6 ^{ab}
8	445,7 ± 3,8 ^b	98,1 ± 0,3 ^{cd}	148,7 ± 2,7 ^{ab}
10	445,4 ± 2,2 ^b	97,8 ± 0,8 ^{cd}	148,2 ± 4,0 ^{ab}
12	445,8 ± 3,1 ^b	96,1 ± 0,4 ^{bcd}	147,5 ± 2,8 ^{ab}

^{*} Tính trên hàm lượng chất khô tuyệt đối. Các giá trị trong bảng (theo cột) có ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Như vậy, thời gian tương nở có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả tạo muối và độ tan của sản phẩm chitosan lactate. Điều này có thể giải thích do vị trí tồn tại của các phân tử nước trong cấu trúc hạt chitosan khác nhau khi thay đổi thời gian ngâm. Thực tế, chitosan tồn tại ở trạng thái rắn khi ngâm trong hỗn hợp dung môi EtOH/H₂O (70% EtOH). Nếu tiến hành ngâm trong thời gian ngắn thì hầu hết các phân tử nước mới chỉ hấp phụ trên bề mặt của các hạt chitosan. Do đó, khi cho phản ứng với lactic acid thì một phần chuỗi polyme nằm trong phần thể tích hạt chitosan có thể không phản ứng dẫn đến hiệu suất thu hồi và độ tan của sản phẩm thấp. Với thời gian ngâm đủ lớn, các hạt

chitosan trương nở hoàn toàn, các phân tử nước tồn tại trong toàn bộ cấu trúc hạt này. Vì vậy, khi tiến hành phản ứng tạo muối thì các phân tử acid có thể khuếch tán dễ dàng trong thể tích hạt chitosan, do đó sản phẩm thu được có độ đồng đều hơn, độ tan tốt hơn. Tuy nhiên, thời gian ngâm kéo dài (8 -12 giờ) thì độ trương nở của chitosan bị giảm một chút và do đó hiệu suất thu hồi cũng như độ tan của muối cũng giảm nhẹ. Việc giảm độ trương nở có thể do sự thay đổi tỷ lệ dung môi EtOH dễ bay hơi khi tiến hành ngâm trong thời gian dài. Mặt khác, việc ngâm chitosan trong thời gian dài dẫn đến tăng thời gian sản xuất. Ngoài ra, Hình 3.17 cho thấy chitosan trương nở có thể tích lớn hơn gần 2 lần so với chitosan ban đầu sau 4 giờ ngâm trong dung môi chứa 70% EtOH. Khi quan sát trên kính hiển vi cho thấy cấu trúc của hạt chitosan trương nở (Hình 3.17b) có độ sáng hơn so với chitosan ban đầu (Hình 3.17a). Cấu trúc sáng hơn là do các chitosan được giãn nở khi hấp phụ nhiều phân tử nước hơn so với chitosan ban đầu.



Hình 3.17. Chitosan ban đầu và trương nở trong dung môi EtOH/H₂O 70% trong 4 giờ, chitosan ban đầu (a) và chitosan ngâm dung môi (b) dưới kính hiển vi (10x).

Từ kết quả thí nghiệm và các phân tích trên chúng tôi lựa chọn thời gian trương nở chitosan là 4 giờ cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.4.3. Ảnh hưởng của nồng độ acid phản ứng đến độ hòa tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate

Chitosan sau khi ngâm 4 giờ trong dung môi EtOH/H₂O (70% EtOH) được cho phản ứng với lactic acid ở các nồng độ khác nhau (0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9, 1,0 và 1,5M). Độ tan và hiệu suất thu hồi của chitosan lactate được trình bày ở Bảng 3.13. Kết quả cho thấy khi nồng độ lactic acid tăng thì hiệu suất thu hồi và độ tan của chitosan lactate đều tăng. Ví dụ, khi nồng độ lactic acid sử dụng là 0,5 M thì hiệu suất thu hồi muối chỉ đạt 114% và độ tan của sản phẩm rất thấp (khoảng 56%). Tuy nhiên, khi nồng độ lactic acid là 0,8 M thì hiệu suất thu hồi và độ tan của chitosan lactate đạt trên 141% và trên 92%. Độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate đạt cao và gần như không thay đổi khi sử dụng

dụng lactic acid ở nồng độ 1,0 M và 1,5 M. Điều này có thể giải thích do hầu hết các nhóm amin ($-NH_2$) đã phản ứng với gốc acid ở nồng độ 1,0 M. Hiện tượng này cũng được thấy trong kết quả nghiên cứu tạo muối chitosan acetate của Li và cộng sự (2007) [119].

Vì vậy, nồng độ lactic acid 1,0 M được chọn để điều chế muối chitosan lactate.

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của nồng độ acid phản ứng đến độ hòa tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate

Nồng độ lactic acid (M)	Độ tan (%) [*]	HSTH (%) [*]
0,5	56,2 ± 2,6 ^a	114,4 ± 6,5 ^a
0,6	72,8 ± 2,7 ^b	132,0 ± 4,4 ^b
0,7	83,2 ± 2,7 ^c	140,5 ± 1,1 ^c
0,8	92,6 ± 1,6 ^d	141,7 ± 1,2 ^c
0,9	95,4 ± 0,8 ^{de}	144,0 ± 1,6 ^c
1,0	98,5 ± 0,2 ^e	151,8 ± 1,8 ^d
1,5	98,8 ± 0,1 ^e	151,5 ± 1,9 ^d

^{*} Tính trên hàm lượng chất khô tuyệt đối. Các giá trị trong bảng (theo cột) có ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.4.4. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến độ hòa tan và hiệu suất thu hồi của chitosan lactate

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến độ hòa tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate

Thời gian phản ứng (giờ)	Độ tan (%) [*]	HSTH (%) [*]
0,5	97,7 ± 0,5 ^a	150,8 ± 0,4 ^a
1,0	98,2 ± 0,5 ^{ab}	151,1 ± 2,0 ^a
1,5	98,5 ± 0,2 ^{ab}	151,8 ± 1,8 ^a
2,0	99,4 ± 0,3 ^b	151,7 ± 2,8 ^a
2,5	99,5 ± 0,3 ^b	152,0 ± 1,4 ^a
3,0	99,5 ± 0,3 ^b	151,8 ± 0,2 ^a

^{*} Tính trên hàm lượng chất khô tuyệt đối. Các giá trị trong bảng (theo cột) có ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

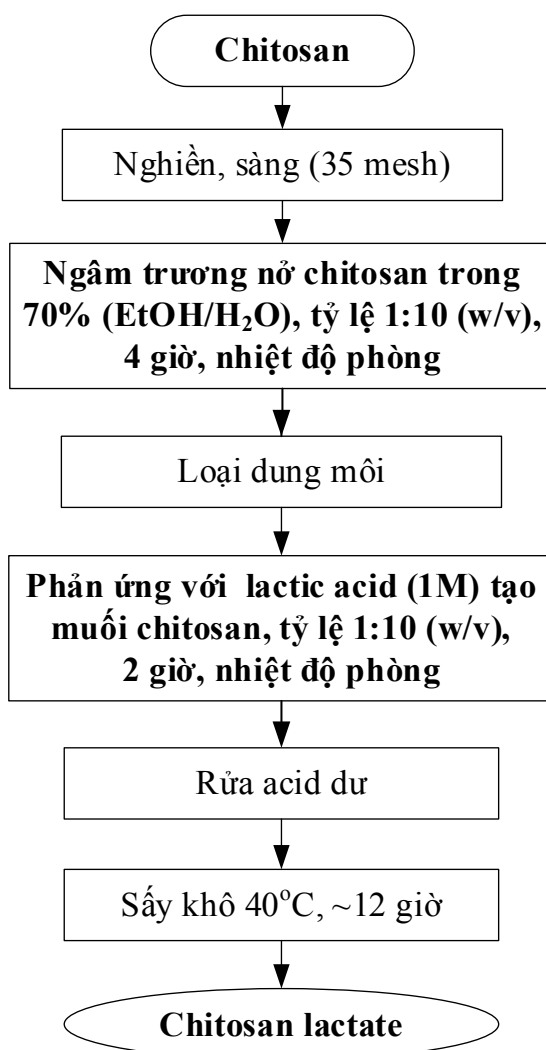
Bảng 3.14 trình bày ảnh hưởng của thời gian phản ứng giữa chitosan và lactic acid đến độ tan và hiệu suất thu hồi của chitosan lactate. Kết quả khảo sát cho thấy khi tăng thời gian phản ứng thì độ tan và hiệu suất thu hồi sản phẩm tăng trong khoảng 2 giờ đầu và gần như không đổi sau thời gian này. Cụ thể, với thời gian phản ứng là 0,5 giờ, 2,0 giờ và 3,0 giờ thì độ tan và hiệu suất thu hồi của chitosan lactate lần lượt là 97,7 và 150,8%; 99,4 và

151,7%; 99,5 và 151,9%. Sự ảnh hưởng của thời gian đối với hiệu quả tạo muối có thể giải thích do phản ứng tạo muối ở đây là phản ứng dị thể (rắn-lỏng). Do đó, các phần tử acid cần có thời gian đủ dài để khuếch tán vào sâu bên trong thể tích của hạt chitosan.

Từ kết quả thu được và nhằm rút ngắn thời gian sản xuất, chúng tôi lựa chọn thời gian phản ứng là 2 giờ để tạo ra sản phẩm muối chitosan lactate.

3.4.5. Đề xuất quy trình điều chế và tính chất hóa lý của chitosan lactate

Từ các kết quả nghiên cứu thu được ở các phần trên, chúng tôi lựa chọn các thông số phù hợp nhất và đề xuất quy trình tạo muối chitosan lactate từ chitosan trong vỏ lột xác tôm (Hình 3.18). Các sản phẩm được phân tích, đánh giá các tính chất hóa lý bao gồm thành phần hóa học, cấu trúc hóa học và độ rắn. Đồng thời, sản phẩm cũng được so sánh với sản phẩm chitosan lactate đang có trên thị trường và muối chitosan lactate được làm theo cùng quy trình nhưng sử dụng chitosan từ nguồn vỏ tôm của nhà máy chế biến thủy sản.



Hình 3.18. Quy trình điều chế chitosan lactate từ chitosan của vỏ lột xác tôm.

❖ Tính chất các nguyên liệu chitosan

Chitosan từ vỏ tôm lột xác (hàm lượng khoáng và protein < 1%, hàm lượng kim loại nặng nằm trong mức cho phép đạt tiêu chuẩn thương mại Standard SC/T403-2004 [206], độ deacetyl khoảng 90%, độ tan khoảng 99%, kích thước 35 mesh) được thu nhận theo quy trình của luận án (Hình 3.10). Chitosan từ vỏ tôm trong nhà máy chế biến (hàm lượng khoáng và protein < 1%, hàm lượng kim loại nặng nằm trong mức cho phép đạt tiêu chuẩn thương mại Standard SC/T403-2004 [206], độ deacetyl khoảng 90%, kích thước 35 mesh, được cung cấp bởi công ty Viet Nam Food).

Tính chất hóa lý của các loại chitosan được so sánh và trình bày ở Bảng 3.15. Mặc dù thu nhận từ hai nguồn khác nhau nhưng chitosan từ vỏ lột xác và vỏ tôm chế biến được chọn nghiên cứu có tính khá tương đồng bao gồm kích thước hạt, độ deacetyl, độ nhớt, độ tinh sạch và độ ẩm. Tuy nhiên, chitosan từ vỏ tôm lột xác có độ tan và thế zeta lớn hơn. Sự khác biệt này cũng sẽ ảnh hưởng một phần đến hiệu quả tạo muối và tính chất của sản phẩm muối thu được. Việc lựa chọn được một loại chitosan từ vỏ tôm chế biến có đầy đủ các tính chất giống với chitosan thu được từ vỏ lột xác là không thể vì hai nguồn nguyên liệu ban đầu khác nhau.

Bảng 3.15. Tính chất cơ bản của chitosan từ các nguồn khác nhau

Chitosan		Nguồn từ VLX	Nguồn từ VNF
Chỉ tiêu			
Tính chất vật lý	Độ deacetyl (%)	90 ± 0,3	90 ± 0,5
	Độ nhớt (cPs)	459 ± 22	476 ± 20
	Độ tan 1% chitosan hòa tan trong acetic acid 1%	99,2 ± 0,3	95 ± 0,6
	Điện thế zeta (mV)	84,3 ± 1,8	56,5 ± 1,2
	Kích thước hạt (mesh)	35	35
	Màu sắc	Trắng	Trắng
Tính chất hóa học	Độ ẩm (%)	9,6 ± 0,5	9,4 ± 0,6
	Khoáng (%)*	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,3
	Protein (%)*	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2
	pH của dung dịch 1% chitosan hòa tan trong acetic acid 1%	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0,1

*Kết quả được tính trên trọng lượng khô tuyệt đối.

❖ Tiến hành điều chế chitosan lactate

Quá trình tạo muối chitosan lactate từ chitosan được mô tả vắn tắt trong sơ đồ Hình 3.18. Cụ thể các bước tiến hành như sau:

Ngâm 25,0 g chitosan trong hỗn hợp EtOH/H₂O (70% EtOH) với tỷ lệ 1:10 (chitosan/dung môi, w/v), khuấy đảo đều trong 4 giờ. Sau đó, loại bỏ toàn bộ dung môi thu được chitosan trương nở.

Cho chitosan trương nở phản ứng với dung dịch lactic acid 1,0 M trong dung môi EtOH với tỷ lệ là 1:10 (chitosan/dung môi, w/v), khuấy đảo đều trong 2 giờ. Sau đó, lọc để loại bỏ dung dịch và phần rắn được rửa 2 lần bằng ethanol 85% (10 phút/lần) và ngâm 30 phút trong ethanol 99,5%.

Sản phẩm được làm khô bằng máy sấy không khí nóng ở 40°C đến khi đạt độ ẩm từ 9-10% (khoảng 12 giờ), lưu giữ sản phẩm trong bao bì kín và tránh ánh sáng trực tiếp.

❖ Tính chất sản phẩm chitosan lactate

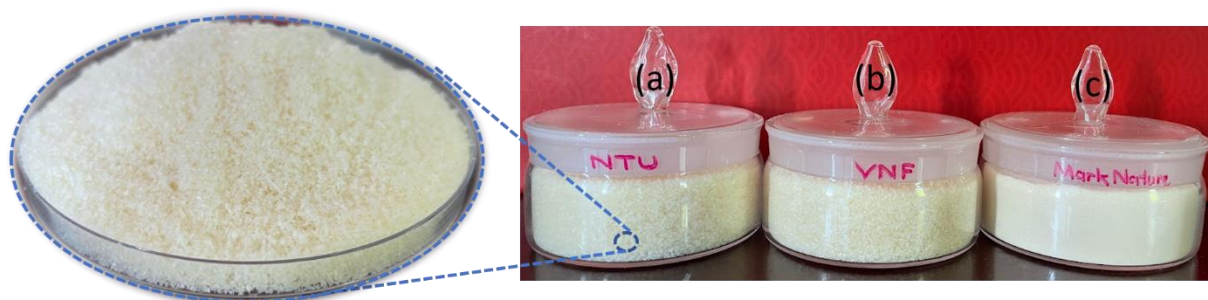
Bảng 3.16. Tính chất cơ bản của chitosan lactate từ các nguồn khác nhau

Chỉ tiêu	Chitosan lactate	Nguồn từ VLX	Nguồn từ VNF	Nguồn từ MarkNature
Độ nhớt (cPs)		105 ± 2 ^b	172 ± 18 ^c	36,3 ± 5,2 ^a
Độ tan 1% chitosan lactate trong nước (%)		99,4 ± 0,3 ^b	96,0 ± 0,9 ^a	99,6 ± 0,2 ^b
Điện thế zeta (mV)		99,3 ± 1,6 ^b	91,7 ± 2,9 ^a	99,1 ± 1,9 ^b
HSTH chitosan lactate (%)		151,7 ± 2,8	143,6 ± 1,1	-
Trạng thái, màu sắc hạt		Hạt rời, vàng nhạt	Hạt rời, vàng nhạt	Bột mịn, vàng nhạt
Màu sắc 1% chitosan lactate hòa tan trong nước		Trắng, trong	Trắng, trong	Vàng nhạt, trong
Độ ẩm (%)		9,5 ± 0,6 ^a	9,2 ± 0,7 ^a	8,8 ± 0,2 ^a
pH của 1% chitosan lactate hòa tan trong nước		4,7 ± 0,2 ^a	4,7 ± 0,3 ^a	4,7 ± 0,2 ^a

*Kết quả được tính trên trọng lượng khô tuyệt đối; (-) Không phân tích; Các giá trị trong bảng (theo hàng) có ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Tính chất lý hóa của các muối chitosan lactate khác nhau được trình bày trong Bảng 3.16 và Hình 3.19. Các số liệu và hình ảnh cho thấy chitosan lactate thu nhận từ nguồn vỏ tôm lột có các tính chất (độ deacetyl, màu sắc, độ ẩm, hàm lượng khoáng và protein, pH của 1% muối hòa tan trong nước) tương đương với các sản phẩm muối được sản xuất cùng quy trình từ nguồn vỏ tôm chế biến và muối chitosan lactate thương mại. Tuy nhiên, giữa

các loại muối này có một số tính chất khác nhau. Ví dụ, độ tan của muối chitosan từ nguồn vỏ lột xác và sản phẩm thương mại ($\geq 99\%$) cao hơn so với muối chitosan điều chế từ vỏ tôm chế biến (96%). Ngoài ra, hiệu suất thu hồi muối chitosan lactate điều chế từ chitosan có nguồn gốc từ vỏ lột xác cao hơn một chút so với chitosan có nguồn gốc từ vỏ tôm chế biến.



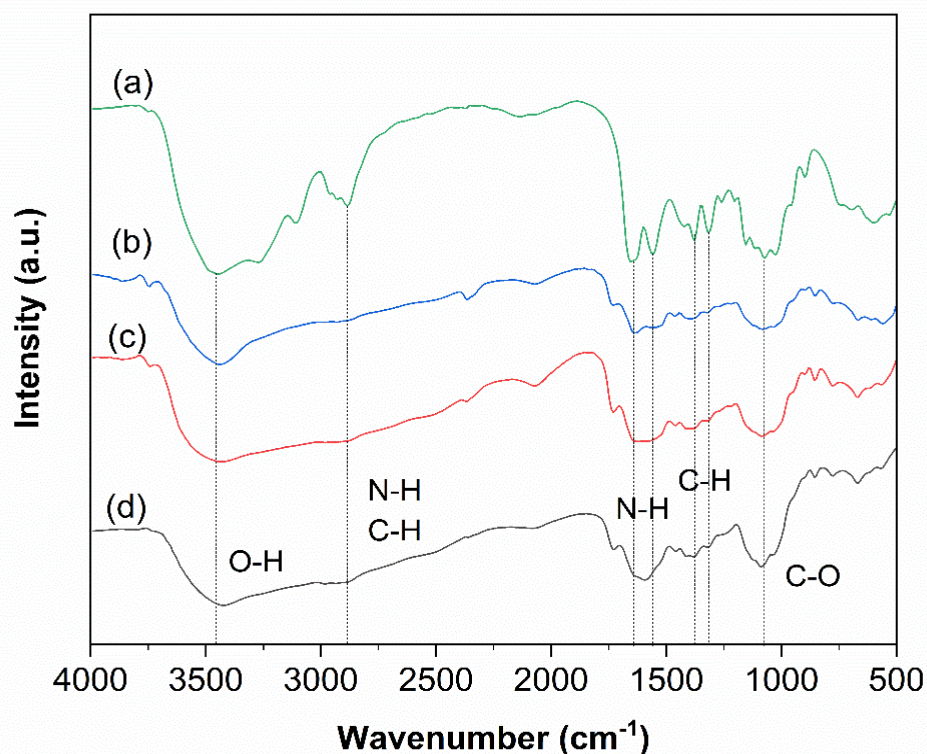
Hình 3.19. Sản phẩm chitosan lactate từ vỏ lột xác (a), từ chitosan VNF (b) và chitosan lactate của MarkNature (c).

Quan sát hạt muối hình thành và sàng qua rây có kích thước lỗ rây ban đầu (35 mesh) thì cả hai loại muối chitosan lactate có nguồn từ chitosan của vỏ lột xác và chitosan từ công ty Việt Nam Food đều không lọt sàng. Điều này cho thấy sau khi gốc lactic được liên kết với gốc amin của chitosan tạo phức, làm cho kích thước phức chitosan-lactate (> 35 mesh) tăng lên so với kích thước chitosan ban đầu. Trong khi chitosan lactate thương mại của công ty MarkNature có kích thước ≤ 140 mesh (bột mịn).

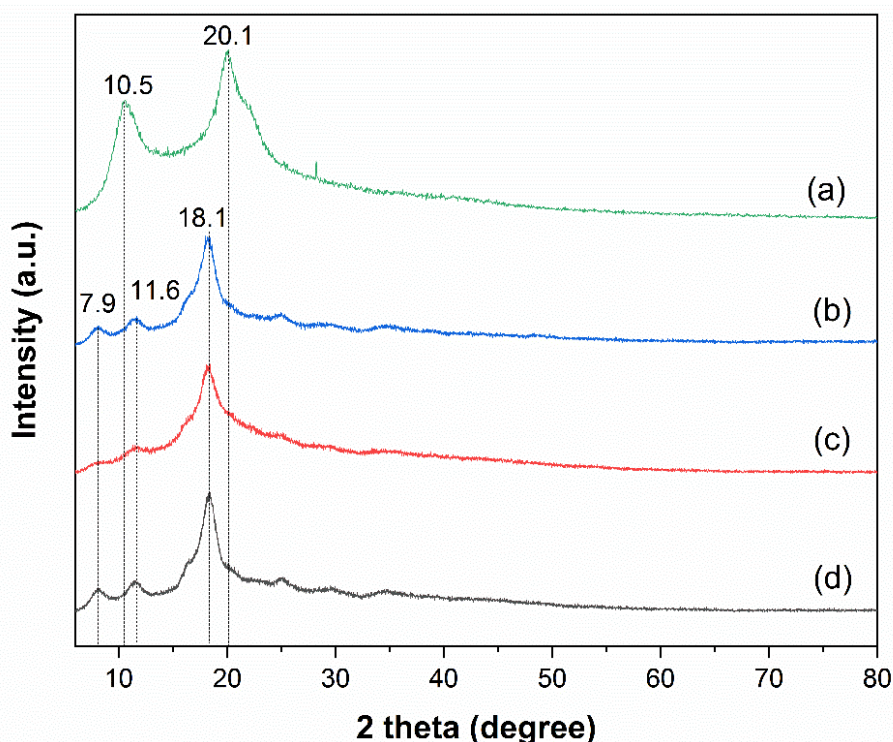
Tóm lại, các tính chất hóa lý cơ bản của sản phẩm chitosan lactate thu được từ nguồn vỏ tôm lột có tính chất tương đương với sản phẩm thương mại cùng loại và ưu việt hơn một chút so với muối chitosan lactate sản xuất từ nguồn vỏ tôm chế biến. Ngoài ra, để có thêm cơ sở so sánh cấu trúc hóa học, độ rắn và độ tinh khiết của các sản phẩm muối kể trên, chúng tôi tiến hành phân tích phổ hồng ngoại (FTIR), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và phổ nhiễu xạ tia X (XRD).

Phổ hồng ngoại (FTIR) được sử dụng để xác định dao động của các nguyên tử, nhóm chức, liên kết trong cấu trúc vật liệu khi vật liệu đó hấp thụ và phát năng lượng thuộc vùng ánh sáng hồng ngoại [138]. Dựa vào vị trí và cường độ của các đỉnh (peak) ghi nhận có thể xác định sự có mặt của các liên kết, nhóm chức đặc trưng. Từ đó, xác định được một phần cấu trúc của vật liệu đó. Hình 3.20 thể hiện phổ FTIR của chitosan và chitosan lactate từ vỏ tôm lột và được so sánh với các sản phẩm chitosan lactate thương mại từ công ty MarkNature (Hoa Kỳ) và chitosan lactate điều chế từ chitosan của Công ty Vietnam Food (Việt Nam). Kết quả phân tích cho thấy phổ FTIR của tất cả các mẫu đều có các đỉnh dao động đặc trưng tại số sóng 3446 cm^{-1} (OH), 2886 cm^{-1} (C-

H), 1315 và 1372 cm^{-1} ($-\text{CH}_2$) và 962–1151 cm^{-1} (C-O-C và C-O) [147, 169]. Tuy nhiên, sau khi phản ứng với lactic acid để tạo muối (Hình 3.20b, 3.20c, 3.20d), các đỉnh đặc trưng cho nhóm amin bậc I ($-\text{NH}_2$) vị trí 3446 cm^{-1} bị giãn rộng và gần như biến mất hoàn toàn do nhóm amin bậc I bị proton hóa thành ($-\text{NH}_3^+$). Hơn nữa, các đỉnh đặc trưng cho nhóm amin ($-\text{NH}_2$) trong phổ của chitosan tại 1567 cm^{-1} và 1650 cm^{-1} cũng không xuất hiện trong phổ của muối chitosan lactate. Điều này chứng tỏ tương tác của nhóm amin bị proton hóa với lactic acid tạo thành gốc ($-\text{NH}_3^+\text{COO}(\text{OH})\text{CHCH}_3$) và tạo thành muối chitosan lactate [147, 156, 169]. Khi so sánh phổ FTIR của muối chitosan lactate điều chế từ vỏ lột xác với các muối chitosan lactate thương mại, không thấy sự khác biệt đáng kể nào về số lượng, vị trí và cường độ các đỉnh. Như vậy, kết quả phân tích FTIR xác nhận rằng đã có sự tạo thành của muối chitosan lactate khi sử dụng chitosan từ vỏ tôm lột để điều chế. Đồng thời sản phẩm muối thu được cũng có cấu trúc hóa học tương tự các sản phẩm thương mại được điều chế từ vỏ tôm của nhà máy chế biến đang có mặt trên thị trường.



Hình 3.20. Phổ FTIR của (a) chitosan và (b) chitosan lactate từ vỏ tôm lột và (c) vỏ tôm chế biến công ty Vietnam Food, (d) chitosan lactate thương mại từ công ty MarkNature.

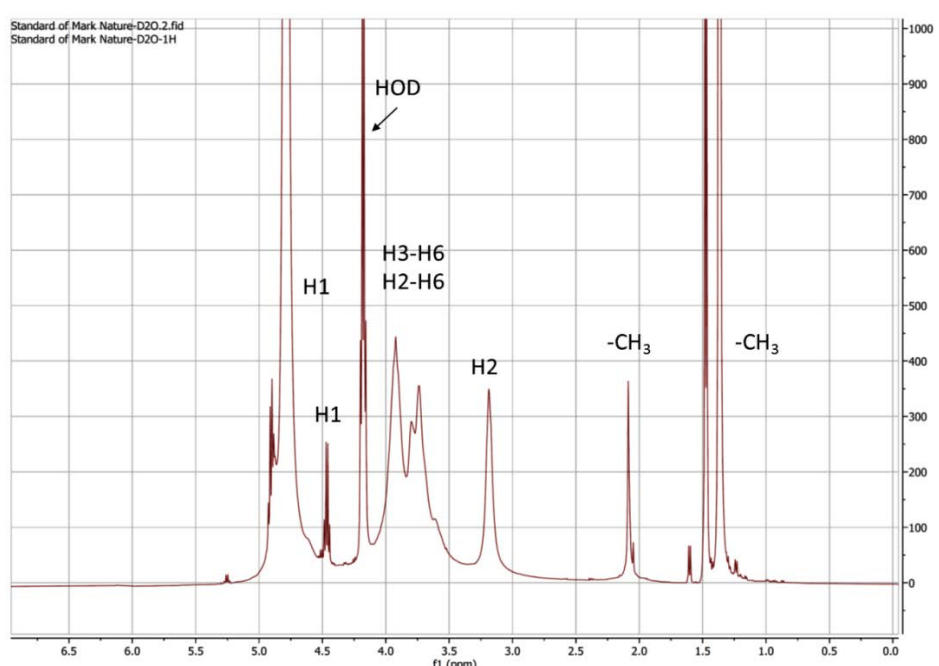


Hình 3.21. Phổ XRD của (a) chitosan và (b) chitosan lactate từ vỏ tôm lột và (c) vỏ tôm chế biến công ty Vietnam Food, (d) chitosan lactate thương mại từ công ty MarkNature.

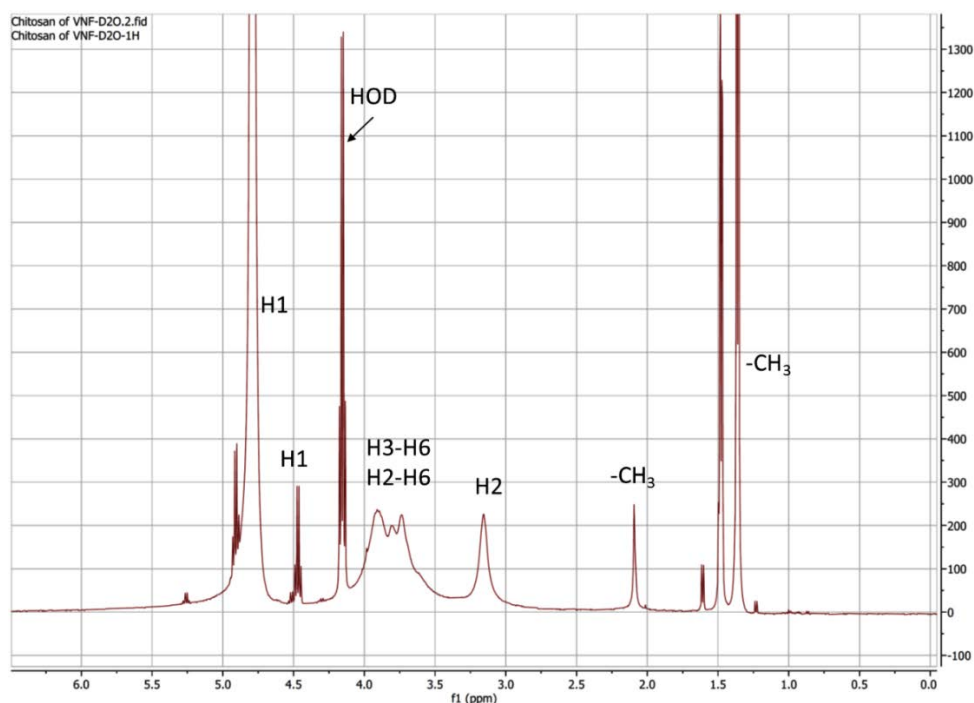
Độ rắn hay cấu trúc kết tinh/vô định hình của vật liệu có ảnh hưởng rất lớn đến tính chất và khả năng ứng dụng của vật liệu đó [139]. Công cụ phổ biến nhất để xác định độ rắn của vật liệu đó là phổ XRD. Hình 3.21 trình bày các phổ XRD của chitosan và chitosan lactate từ vỏ tôm lột, vỏ tôm chế biến và chitosan lactate thương mại. Đối với chitosan thu nhận từ vỏ tôm lột, có sự xuất hiện hai đỉnh đặc trưng của chitosan tại góc quét 2θ $10,5^\circ$ và $20,1^\circ$ tương ứng với các nhiễu xạ 020 và 110 [139]. Trong đó, đỉnh xuất hiện trong khoảng 10° đặc trưng cho tính chất vô định hình của chitosan, còn đỉnh tại khoảng góc quét 20° độ đặc trưng cho tính chất kết tinh (Hình 3.21a) [139, 170]. Tuy nhiên, quan sát kết quả phân tích XRD ở Hình 2.21b-d có thể nhận thấy tất cả các mẫu chitosan lactate thu được trong nghiên cứu này và sản phẩm thương mại khác nhau đáng kể so với nhiễu xạ tia X của mẫu chitosan (Hình 3.21a). Cụ thể, đỉnh tại góc quét 2θ $10,5^\circ$ gần như biến mất, trong khi đỉnh ở $20,1^\circ$ dịch chuyển sang vị trí góc quét 2θ $18,1^\circ$. Điều này chứng tỏ độ kết tinh của muối chitosan lactate cao hơn độ kết tinh của chitosan. Kết quả này tương đồng với các báo cáo trước liên quan đến điều chế muối chitosan khác [111, 130]. Sự thay đổi này được giải thích do có sự biến dạng của các liên kết hydro mạnh giữa các phân tử chitosan [111, 130]. Đáng chú ý, có sự xuất hiện của 2 đỉnh nhỏ tại góc quét 2θ bằng $7,9^\circ$ và $11,6^\circ$ trong các phổ XRD của mẫu chitosan lactate

từ vỏ tôm lột và sản phẩm thương mại (Hình 3.21b và d). Điều này có thể giải thích do tương tác giữa các nhóm lactate trong mẫu muối từ vỏ lột xác và muối thương mại mạnh hơn so với mẫu muối từ vỏ tôm chế biến. Kết quả này cũng phù hợp với tính chất hòa tan trong nước của các muối được thể hiện ở Bảng 3.16. Như vậy, có thể khẳng định tính chất kết tinh hay độ rắn của chitosan lactate điều chế từ nguồn vỏ tôm lột tương tự như sản phẩm chitosan lactate thương mại.

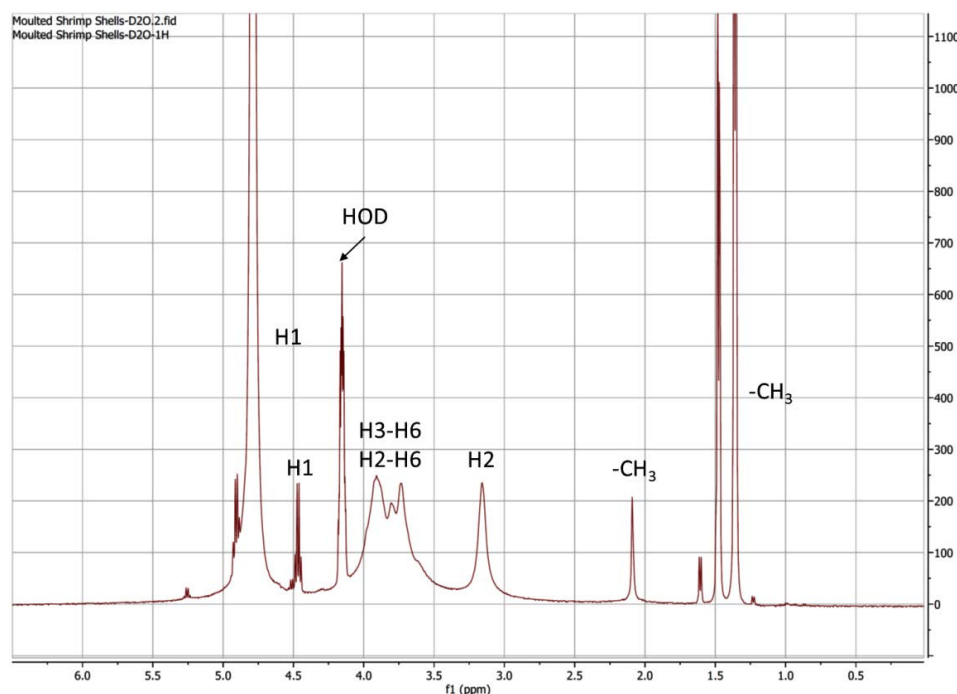
Cấu trúc hóa học và độ tinh khiết của sản phẩm chitosan lactate thu nhận từ nguồn vỏ tôm lột được xác định và so sánh với các sản phẩm chitosan lactate thương mại dựa trên kết quả phân tích phổ ^1H -NMR trong Hình 3.22, Hình 3.23 và Hình 3.24. Kết quả cho thấy phổ ^1H -NMR của cả 3 mẫu đều có sự hiện diện của các đỉnh đặc trưng tại độ dịch chuyển hóa học là 2,1 ppm (NHCOCH_3), 3,2 ppm (H_2), 3,6~3,9 ppm ($\text{H}_3\sim\text{H}_6$, $\text{H}_2\sim\text{H}_6$) và 4,4~4,7 ppm (H_1). Tuy nhiên, cường độ các đỉnh proton $\text{H}_2\sim\text{H}_6$ và $\text{H}_3\sim\text{H}_6$ hơi khác nhau giữa các phổ, có thể do độ ẩm khác nhau của mẫu thể hiện ở đỉnh hấp thụ nước tại 4,2 ppm. Đáng chú ý, so với phổ của chitosan, trong phổ của các muối có sự xuất hiện của các đỉnh tại 1,9 ppm (NHAc) và 4,3 ppm ($-\text{CH}$ của nhóm hydroxylate lactyl), khẳng định sự tạo thành liên kết hóa học giữa chitosan và acid lactic. Không có sự xuất hiện các đỉnh trong khoảng 0~1,2 ppm chứng tỏ các sản phẩm có độ tinh sạch cao. Như vậy, kết quả phân tích NMR cho thấy chitosan lactate điều chế từ nguồn vỏ tôm lột ban đầu có cấu trúc hóa học và độ tinh khiết tương đương với sản phẩm chitosan lactate thương mại, đồng thời có sự tạo thành muối chitosan lactate khi cho chitosan phản ứng với lactic acid.



Hình 3.22. Phổ ^1H -NMR của chitosan lactate thương mại từ công ty MarkNature.



Hình 3.23. Phổ ^1H -NMR của chitosan lactate sử dụng chitosan của công ty Vietnam Food thu được từ vỏ tôm chế biến.



Hình 3.24. Phổ ^1H -NMR của chitosan lactate được điều chế từ chitosan thu nhận từ vỏ tôm lột.

3.5. Nghiên cứu ứng dụng thu hồi vi tảo *Nannochloropsis* sp. bằng chitosan lactate

3.5.1. Tính chất và thành phần hóa học cơ bản của vi tảo *Nannochloropsis* sp.

Vi tảo *Nannochloropsis* sp. được nhân giống từ vi tảo gốc lưu trữ tại Trung tâm nghiên cứu Giống và Dịch bệnh thủy sản, Trường Đại học Nha Trang. Điều kiện nuôi cấy tại phòng thí nghiệm: nhiệt độ phòng duy trì ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$, các dụng cụ thiết bị và nước biển đã được xử lý sạch và thanh trùng ($121^\circ\text{C}/15$ phút), các bình nuôi được sục khí và chiếu sáng (1000 – 3000 lux) liên tục, độ mặn nước biển giữ trong khoảng 25 – 35‰ và pH môi trường trong khoảng 7,5 – 8,5. Để ổn định pH môi trường của mẫu thí nghiệm, tiến hành lấy mẫu lúc 15 giờ mỗi lần lấy. Để ổn định lượng tế bào trong dịch mẫu thí nghiệm thì lấy mẫu tại thời điểm sinh khối vi tảo đạt mật độ cao nhất (giai đoạn đầu của pha cân bằng). Mẫu dịch vi tảo có màu xanh lục đặc trưng (Hình 2.3). Tính chất và thành phần cơ bản của mẫu dịch và vi tảo được trình bày trong Bảng 3.17.

Bảng 3.17. Tính chất và thành phần dinh dưỡng của vi tảo *Nannochloropsis* sp.

Chỉ tiêu		Kết quả
Tính chất cơ bản của dịch vi tảo	Kích thước vi tảo (μm)	2 – 4
	Mật độ tế bào (tb/mL)	$37,3 \times 10^6 \pm 2,6$
	Điện thế Zeta (mV)	$-6,1 \pm 1,5$
Thành phần dinh dưỡng*	Protein (%)	$26,9 \pm 1,1$
	Carbohydrate (%)	$32,3 \pm 1,8$
	Khoáng (%)	$8,2 \pm 0,8$
	Lipid (%)	$16,2 \pm 0,7$
	Carotenoid ($\mu\text{g/g}$)	7368 ± 129
	Chlorophyll-a ($\mu\text{g/g}$)	10369 ± 174

*Kết quả được tính trên trọng lượng khô tuyệt đối.

Kích thước của loài vi tảo *Nannochloropsis* sp. trong nghiên cứu này (2 -4 μm) tương đương với loài tảo thuộc chi *Nannochloropsis* được phân lập và nuôi cấy ở các nước khác, đã được ứng dụng phổ biến làm thức ăn nuôi trồng thủy sản do có thành phần dinh dưỡng khá cao, chứa một nguồn sắc tố quan trọng có giá trị thương mại lớn [86, 118, 174]. Mẫu dịch tảo đo được có thế zeta là $-6,1 \pm 1,5$ (mV) thể hiện tế bào vi tảo *Nannochloropsis* sp. có điện tích bề mặt âm. Điện thế zeta là một thông số quan trọng khi khảo sát các yếu tố ảnh hưởng và cơ chế xảy ra quá trình keo tụ thu vi tảo. Ngoài ra, mật độ vi tảo đạt $37,4 \times 10^6$ tb/mL thu được ở pha cân bằng ổn định, tương đương với mật độ vi tảo *N. oculata* được sử dụng trong nghiên cứu của Baharuddin và cộng sự (2016) [33] khi đạt mật độ 22×10^6 tb/mL và hầu hết các nghiên cứu khác khi sinh khối vi tảo đạt mật độ ở pha cân bằng lớn hơn 10^7 tb/mL [91].

Sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. được loại nước bằng cách ly tâm với tốc độ 8000 rpm trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C. Dịch vi tảo đậm đặc được sấy ở 45°C trong 24 giờ trước khi tiến hành phân tích thành phần dinh dưỡng cơ bản. Kết quả phân tích cho thấy vi tảo *Nannochloropsis* sp. chứa hàm lượng carbohydrates với tỷ lệ cao nhất (khoảng 32,3 %), hàm lượng protein, lipids và khoáng chất lần lượt có giá trị khoảng 26,9%, 16,2% và 8,2%. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Molino và cộng sự (2018) [133] khi phân tích thành phần hóa học của vi tảo *Nannochloropsis* sp. gồm 32,05% carbohydrate, 26,67% protein, 15,3% lipid và 8,31% khoáng chất và có sự khác biệt với hàm lượng các chất dinh dưỡng ở trong các loài vi tảo như *Arthrospira platensis*, *Scenedesmus almeriensis*, *Haematococcus pluvialis* (Green Phase), *Haematococcus pluvialis* (Red Phase), *Chlorellavulgaris*, *Dunaliella salina* [133]. Tuy nhiên, một nghiên cứu khác cho thấy loài vi tảo *Nannochloropsis* sp. chứa các chất dinh dưỡng gồm khoáng (11,32%), carbohydrates (9,62%), lipids (21,78%) và protein (30,29%) [110]. Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.17 cho thấy hàm carbohydrate cao hơn gấp 3 lần, trong khi hàm lượng lipids thấp hơn 1,3 lần so với kết quả trong nghiên cứu của Kent và cộng sự (2015) [110]. Thành phần dinh dưỡng của từng loài *N. gaditana* và *N. oculata* được Matos và cộng sự (2016) [126] nghiên cứu cho thấy không có sự chênh lệch lớn về thành phần dinh dưỡng của 2 loài vi tảo này gồm khoáng (8,5 – 12,3%), protein (41,6 – 42,1%), lipid (8,1 – 15,6%) và carbohydrate (16,7 – 18,6%), nhưng có sự khác biệt so với nghiên cứu của đề tài này về hàm lượng protein (cao hơn gấp 1,5 lần) và carbohydrate (thấp hơn khoảng 1,8 lần). Điều này cho thấy, loài vi tảo sống ở môi trường khác nhau có hàm lượng dinh dưỡng khác nhau.

Một nghiên cứu khác, phân tích thành phần dinh dưỡng của vi tảo *Nannochloropsis oculata* sau khi bổ sung enzyme lipase nhằm phân giải lipids thành các acid béo tự do. Kết quả cho thấy hàm lượng carbohydrate (37%) và acid béo tổng số (11%) không chênh lệch lớn với nghiên cứu này (32,3% carbohydrate, 16,2% lipid), hàm lượng protein chỉ đạt 19% trong khi hàm lượng khoáng chất (34%) lại cao hơn gấp 4 lần so với nghiên cứu này [55]. Điều này có thể giải thích thành phần khoáng trong sinh khối quá cao liên quan đến sự hiện diện của các muối khoáng bám trên bề mặt tế bào vi tảo. Nhiều nghiên cứu khác cũng xác định hàm lượng khoáng ở một số sinh khối vi tảo không rửa trước khi phân tích có giá trị trong khoảng 33 – 41%. Ngoài ra, một số loài vi tảo như *Phaeodactylum tricornemon* có hàm lượng chất vô cơ cao là do thành tế bào của nó được bao phủ bởi silica. Do vậy, trong chi *Nannochloropsis* cũng có thể khác nhau về hàm lượng khoáng chất ở từng loài, như *N. gaditana* chứa khoảng 12,3% trong khi *N. oculata* chứa khoảng 8,5% [126].

Ngoài ra, *Nannochloropsis* sp. được minh chứng là nguồn giàu chất diệp lục, carotenoid (astaxanthin là chủ yếu) có khả năng chống oxy hóa rất cao [110]. Kết quả Bảng 3.17 cho thấy hàm lượng chlorophyll-a (10.369 ± 174 , $\mu\text{g/g}$) và carotenoid (7.368 ± 129 , $\mu\text{g/g}$) trong vi tảo *Nannochloropsis* sp. cao đáng kể. Nghiên cứu của Kent và cộng sự (2015) [110] phân tích hàm lượng carotenoid (0,7%) trong vi tảo *Nannochloropsis* sp. lớn hơn đáng kể so với hai sản phẩm thương mại (*Spirulina* và *Chlorella*), trong đó hàm lượng astaxanthin được xác định chiếm tỷ lệ cao hơn các chất màu carotenoids khác [110]. Tuy nhiên, nghiên cứu của [133] không phát hiện hàm lượng carotenoid chiết trong dung môi DMSO và xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp với 3 chất chuẩn gồm astaxanthin, beta-carotene và lutein đối với vi tảo *Nannochloropsis* sp., khác với nghiên cứu trên là vi tảo được chiết bằng dung môi metanol.

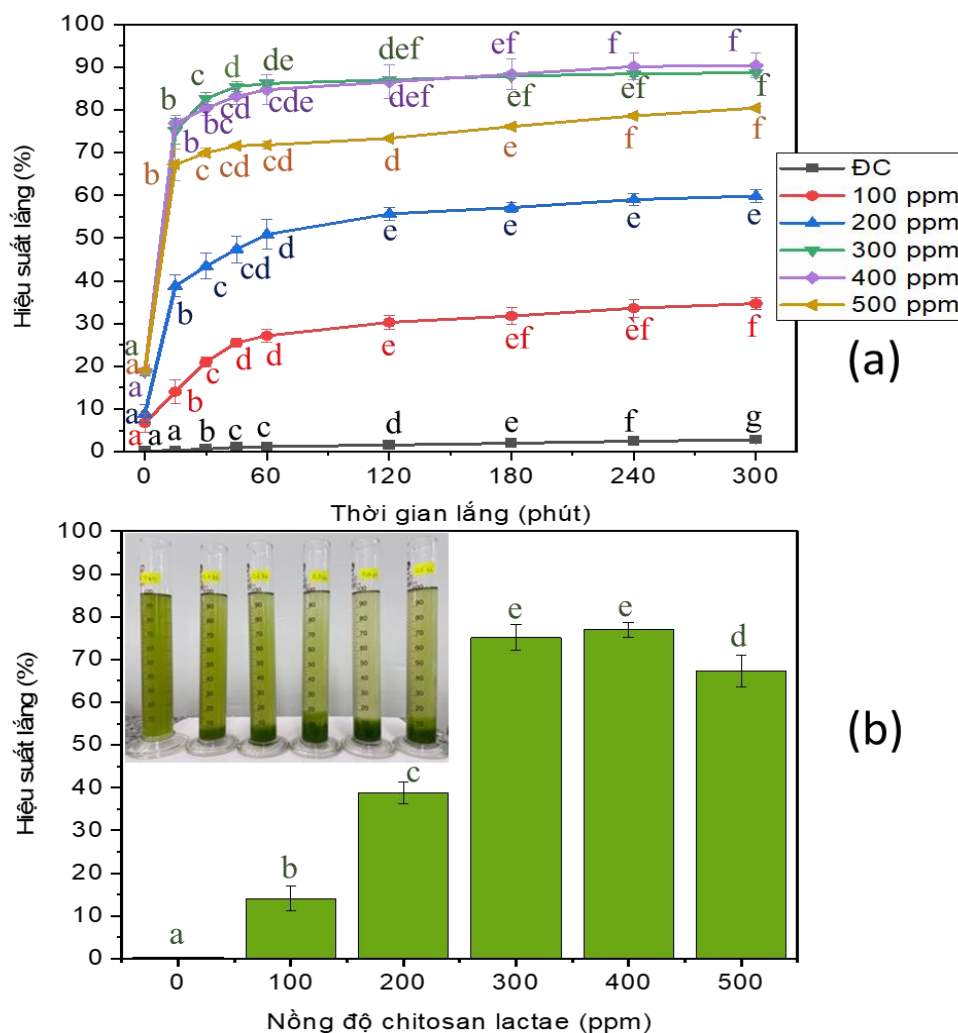
Như vậy, vi tảo *Nannochloropsis* sp. trong nghiên cứu này có kích thước nhỏ, bề mặt tế bào trong môi trường nuôi mang điện tích âm, chứa hàm lượng protein và lipid khá cao và đặc biệt chứa chất màu có khả năng chống oxy hóa (chlorophyll-a và carotenoids) với hàm lượng đáng kể. Do đó, chúng tôi đề xuất sử dụng chitosan lactate có thể zeta dương ($99,3 \pm 1,6$ eV) làm chất trợ lắng nhằm thu vi tảo với hiệu quả cao và vẫn giữ được đặc tính dinh dưỡng của vi tảo khi được sử dụng làm thức ăn trong nuôi trồng thủy sản [24, 25, 55, 100].

3.5.2. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate sử dụng đến hiệu suất lắng

Hình 3.25 cho thấy hiệu suất lắng sinh khối vi tảo phụ thuộc rất nhiều đến nồng độ chitosan lactate (CTSs) sử dụng và có một giới hạn nhất định, nếu tiếp tục tăng nồng độ thì hiệu suất lắng có xu hướng giảm xuống. Mẫu đối chứng (ĐC) không có tác nhân keo tụ và để lắng một cách tự nhiên không có sự thay đổi trong 15 phút đầu, sau đó có thay đổi nhưng không đáng kể, hiệu suất lắng chỉ đạt khoảng 2,8% sau 300 phút lắng. Khi bổ sung CTSs với nồng độ 100 ppm, hiện tượng kết bông xảy ra và lắng sau 15 phút đạt hiệu suất lắng khoảng 6,8% và cao đến gần 35% sau 300 phút lắng. Khi tăng nồng độ CTSs lên 200 ppm thì hiệu suất lắng đạt khoảng 38,8% (ở 15 phút) và khoảng 59,8% (ở 300 phút). Hiệu quả kết bông và lắng tăng cao khi tiếp tục tăng nồng độ CTSs sử dụng và kéo dài thời gian để lắng.

Tại Hình 3.25a, đồ thị biểu diễn cho thấy ở nồng độ của CTSs là 300 ppm và 400 ppm có kết quả không khác biệt thống kê ($p > 0,05$) và hiệu suất lắng cao nhất, đạt khoảng 75 – 77% (15 phút lắng) và xấp xỉ 90% (300 phút lắng). Hiện tượng kết lắng có thể quan sát rõ hơn ở Hình 3.25b khi để lắng vi tảo sau 15 phút. Nồng độ chitosan lactate sử dụng hiệu quả trong nghiên cứu này cao hơn so với nhiều nghiên cứu sử dụng chitosan (30 – 200 ppm) để lắng vi tảo biển thuộc chi *Nannochloropsis* [174]. Tuy nhiên, kết quả

nghiên cứu của Chua và cộng sự (2019) [65] cho thấy sử dụng chitosan mà không kết hợp điều chỉnh pH để kết lắng vi tảo *Nannochloropsis* BR2 đạt hiệu quả lắng rất thấp, chỉ đạt dưới 20%. Tương tự, nhiều kết quả nghiên cứu ứng dụng chitosan để thu hoạch vi tảo biển *Nannochloropsis* được đánh giá cao nhưng phải có sự kết hợp magie hydroxid [85, 91], hoặc kết hợp dùng chitosan là chất trợ lắng để làm giảm chất keo tụ chlorua sắt (gây ô nhiễm sinh khối) mang lại hiệu quả cao đối với các loài vi tảo biển [178].



Hình 3.25. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate (ppm) đến hiệu suất lắng theo thời gian thu hoạch (a), tại thời điểm 15 phút lắng (b).

Các giá trị trên đồ thị có ký tự (theo ký hiệu màu) khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào sử dụng muối chitosan có thể hòa tan trong nước để ứng dụng làm chất trợ lắng thu hoạch vi tảo. Nhưng đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng muối chitosan trong công nghệ keo tụ làm trong nước quả, rượu vang, nước trà... Do muối chitosan được xem là an toàn và có tính năng đặc biệt rằng có thể hòa tan trực tiếp trong nước (chitosan hòa tan trong acid loãng). Từ cơ sở đó, muối chitosan lactate có thể sử

dùng làm chất keo tụ vi tảo, nhằm cải thiện một số nhược điểm của chitosan khi ứng dụng thu hoạch vi tảo. Hơn nữa, chitosan lactate được chọn sử dụng trong nghiên cứu này vì nó cũng được xác định có ưu điểm hơn so với chitosan acetate [89, 90]. Ưu điểm của chitosan đã được các nhà nghiên cứu đề cao về các tính năng của nó và đề xuất đây là chất keo tụ sinh học tiềm năng ứng dụng trong công nghệ thu hoạch vi tảo. Do bởi, chitosan được xem như là một phụ gia an toàn, không ảnh hưởng đến sức khỏe con người và muối chitosan là dẫn xuất của chitosan được xác định là vẫn giữ được tính chất đặc trưng của chitosan [21, 43, 60, 65, 93, 117, 119, 183, 191]. Vậy, phương pháp sử dụng chitosan làm chất trợ lắng sẽ giúp cho công nghệ thu hoạch vi tảo giảm được chi phí năng lượng, liều lượng thấp, thời gian ngắn và hiệu quả cao [35, 79, 113, 118, 152].

Hiện nay, vẫn có sự tranh cãi giữa việc giải thích về cơ chế keo tụ vi tảo biển. Hiệu quả thu hồi sinh khối bằng chitosan (chất tạo màng sinh học) dựa trên cơ chế trung hòa điện tích và tạo cầu nối. Tuy nhiên, trong môi trường nước biển hầu hết các điện tích dương của các phân tử chitosan bị che chắn do cường độ ion cao. Do đó, sự hấp phụ giữa các tế bào vi tảo và các phân tử chitosan bị giảm, cơ chế keo tụ của các chất tạo màng sinh học còn được giải thích do có sự hình thành ở dạng mạng lưới và keo tụ vi tảo theo cơ chế quét [43, 65, 144]. Vì vậy, có thể giải thích rằng chitosan lactate mang điện tích dương do chứa các nhóm amino nên có xu hướng thu hút các tế bào vi tảo mang điện tích âm bằng liên kết tĩnh điện. Từ đó, trạng thái của thành tế bào thay đổi làm giảm lực đẩy giữa các tế bào vi tảo đến mức tối thiểu (giảm điện thế zeta) và tạo thành các khối bông. Sau đó, các khối bông lại được liên kết lại với nhau thành cụm bông lớn hơn thông qua liên kết bắc cầu, rồi lắng xuống [149, 152, 153]. Tuy nhiên, quan sát thấy cụm bông vi tảo của sản phẩm không quá lớn và lắng chậm sau 15 phút để yên. Điều này có thể giải thích do các điện tích dương của chitosan bị che chắn bởi cường độ ion cao trong môi trường nước biển, dẫn đến việc cuộn polyme và ngăn cản quá trình keo tụ thông qua cầu nối và có xu hướng co cuộn lại và bao bọc các tế bào vi tảo [43].

Ngoài ra, hiệu quả keo tụ còn phụ thuộc vào tính chất của chitosan lactate sử dụng có độ nhớt thấp (105 cPs, Bảng 3.16) và được điều chế từ chitosan có khối lượng phân tử trung bình (khoảng 500 kDa, Bảng 3.8). Bản chất của chitosan lactate có mạch ngắn phù hợp với cơ chế keo tụ vá, các phân tử chitosan nhỏ điện tích dương hấp phụ ở bề mặt của một tế bào tích điện âm và tạo ra sự phân bố điện tích không đều trên bề mặt của nó. Từ các vùng dương trên bề mặt phân tử chitosan không được phủ có thể tương tác với các vùng âm trên bề mặt của tế bào vi tảo khác và kết nối chúng với nhau [77, 78]. Như vậy, cơ chế keo tụ của chitosan và dẫn xuất của nó (chitosan lactate) bao gồm quá trình hấp phụ và trung

hòa điện tích [24]. Nhờ đó mà tế bào vi tảo sau thu có thể giữ được hình thái nguyên vẹn nên chitosan phù hợp để thu hoạch tế bào vi tảo sống [24, 25].

Khi tiếp tục tăng nồng độ CTSs lên 500 ppm thì hiệu suất lắng lại thấp xuống còn lại khoảng 67% (15 phút lắng) và khoảng 80% (300 phút lắng) (Hình 3.25a). Kết quả này được quan sát rõ hơn ở Hình 3.25b tại thời điểm 15 phút lắng khi so sánh các nồng độ CTSs sử dụng khác nhau. Hiệu suất lắng của sinh khối vi tảo khi thu bằng chitosan lactate ở nồng độ 300 và 400 ppm không có sự khác biệt thống kê ($p > 0,05$). Điều này đã được nhiều nghiên cứu minh chứng cho thấy, các khối bông được hình thành khi xảy ra hiện tượng trung hòa điện tích, lúc đó điện thế zeta của các tế bào vi tảo tích điện âm giảm và tiến về 0 ở một nồng độ chitosan nhất định [35, 201]. Do đó, khi tăng nồng độ chitosan quá cao dẫn đến quá trình thu hoạch có khả năng bị giảm hiệu quả, nhận định này cũng tương tự với nghiên cứu của Ahmad và cộng sự (2011) [24] khi ứng dụng chitosan để thu hoạch vi tảo *Chlorella* sp. Tuy nhiên, nghiên cứu của Şirin và cộng sự (2013) [174] có kết quả thu hồi sinh khối vi tảo *N. gaditana* đạt hiệu quả cao khi dùng 30 ppm và không giảm khi tăng nồng độ chitosan lên trên 90 ppm, thậm chí ở nồng độ 200 ppm. Tác giả cho rằng nồng độ chitosan vượt quá liều lượng tối ưu sẽ giữ cho điện tích ổn định nhưng không làm chúng quá tải vì nồng độ vi tảo *N. gaditana* ban đầu cao hơn. Như vậy, hiệu quả thu hoạch sinh khối vi tảo phụ thuộc loài, ảnh hưởng quan trọng đến hiệu suất lắng [174]. Ngoài ra, ở nồng độ này (500 ppm CTSs) gây ra sự dư thừa làm cho các mạch chitosan không gắn kết được với tế bào vi tảo và gây tự kết tủa. Khi đó, khả năng lắng của tế bào giảm do số lượng nhóm amin gia tăng (bề mặt của các hạt vi tảo riêng lẻ được bao bọc hoàn toàn bởi chitosan). Các hạt này sẽ không thể tiếp tục liên kết bắc cầu với các hạt vi tảo khác để tạo bông lớn hơn, tạo nên lực đẩy giữa các nhóm và gây mất ổn định các khối bông kết lắng [35, 152]. Beach và cộng sự (2012) [35] còn giải thích thêm về hiện tượng hấp phụ quá mức của chitosan gây ra các tương tác đẩy do vượt qua các tương tác hấp dẫn khi nồng độ chitosan trong dung dịch vi tảo quá cao.

Kết quả nghiên cứu của đề tài phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đối với nhiều loài vi tảo khác nhau và các vi tảo thuộc chi *Nannochloropsis*. Đối với các loài vi tảo nước ngọt như *Chlorella* sp., *Chlorella vulgaris*, *S. Costatum*, hiệu quả lắng đạt trên 90% khi sử dụng chitosan trong khoảng nồng độ rất thấp từ 2 – 120 ppm trong thời gian rất ngắn [24, 151, 152, 157]. Sự khác nhau về nồng độ của chitosan tối ưu để sử dụng làm chất keo tụ sinh học đạt hiệu quả cao thì phụ thuộc vào loài vi tảo, môi trường nuôi sinh khối như chế độ dinh dưỡng, độ mặn, mật độ tế bào, độ tuổi và độ pH [100, 144] và kể cả dung môi pha chitosan [152]. Do vậy, khi tiến hành thu vi tảo biển *Nannochloropsis* sp., nồng độ chitosan lactate sử dụng cao hơn so với các nghiên cứu

sử dụng chitosan để thu hồi vi tảo nước ngọt. Điều này là do ảnh hưởng của cường độ ion cao trong môi trường nước biển, điện tích dương của phân tử chitosan bị cản trở tiếp xúc và tạo cầu nối liên kết với các tế bào vi tảo [95].

Kết quả được biểu diễn ở Hình 3.25 cho thấy với nồng độ chitosan lactate là 300 ppm, có thể thu hoạch sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. đạt khoảng $88,7 \pm 0,7\%$ sau 5 giờ lắng. Trong khi, kết quả nghiên cứu của Pérez và cộng sự (2016) [144] chỉ đạt cao nhất khoảng $27,5 \pm 3,2\%$ khi sử dụng chitosan ở nồng độ 500 ppm trong 8,5 giờ đối với vi tảo biển *Chaetoceros gracilis*. Với nồng độ thấp hơn (100 – 400 ppm) thì hiệu suất thu vi tảo này chỉ đạt từ 22 đến 24% và hiệu suất tăng dần khi tăng thời gian lắng [144]. Khi so sánh kết quả tại 15 phút và 300 phút lắng thì hiệu suất lắng vi tảo của nghiên cứu này cao gấp 7,5 lần và gấp 4,5 lần theo thứ tự, so với kết quả thu vi tảo *Chaetoceros gracilis* ở nồng độ là 300 ppm chitosan hoặc chitosan lactate. Sự khác biệt này là do có sự khác nhau về đối tượng vi tảo biển, cấu trúc hóa học và tính chất của polyme sử dụng. Polyme sinh học được sử dụng trong nghiên cứu là chitosan được gắn thêm gốc lactate khi được cho phản ứng với lactic acid, có khả năng tan trong nước và đây là ưu điểm của chitosan lactate [119]. Khi so sánh với chất keo tụ hữu cơ calci lactate sử dụng để thu sinh khối vi tảo biển *Chaetoceros gracilis* cũng chỉ đạt thấp hơn 5% sau khoảng 5 giờ lắng và chitosan cũng được xác định là có hiệu suất thu cao hơn hẳn so với loại muối này [144]. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu còn cho thấy hiệu quả thu sinh khối không thấp hơn khi so sánh với hiệu quả thu sinh khối vi tảo nước ngọt *Chlorella vulgaris* bởi các dung dịch chitosan pha trong môi trường acid khác nhau, như $5,1 \pm 5\%$ (citric acid), $54,5 \pm 5,65\%$ (nitric acid), $69,3 \pm 2,47\%$ (phosphoric acid) và $84,5 \pm 3,53\%$ (hydrochloric acid) [151, 152].

Như vậy, việc sử dụng muối chitosan lactate cũng có thể được xem là dẫn xuất phù hợp dùng để thu hoạch vi tảo *Nannochloropsis* sp., mang lại hiệu quả thu hoạch cao, đặc biệt đối với loài vi tảo biển.

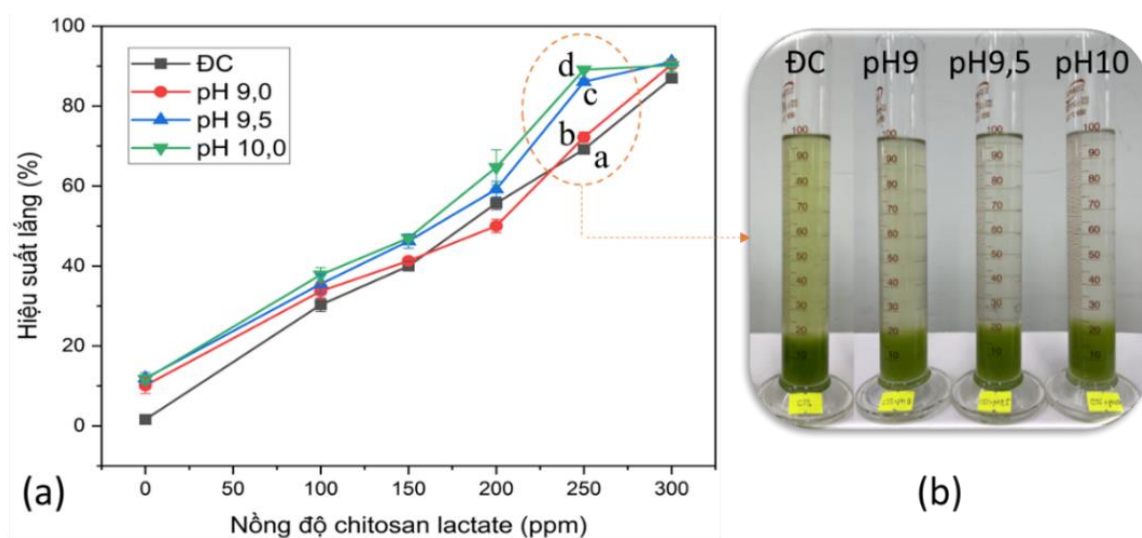
3.5.3. Ảnh hưởng của kết hợp sử dụng chitosan lactate và điều chỉnh pH đến hiệu suất lắng

Một số nghiên cứu cho thấy phương pháp sử dụng chất keo tụ và điều chỉnh pH hỗ trợ tạo khối bông lớn, dễ dàng loại tách nước [95]. Hơn nữa, điện tích bề mặt của vi tảo và phân tử chitosan thay đổi theo độ pH môi trường. Đồng thời, hiệu quả keo tụ sẽ phụ thuộc vào sự thay đổi điện tích bề mặt của các hạt và ảnh hưởng đến sự tương tác giữa các hạt phân tử [43, 151, 152].

Trên thực tế, ở độ pH thấp, các phân tử chitosan và tế bào vi tảo được proton hóa cao, gây ra lực đẩy làm giảm tương tác các hạt, quá trình keo tụ bị suy giảm. Ngược lại ở

pH cao, các hạt vi tảo mang điện tích âm cao, điều này cũng gây ra lực đẩy và giảm hiệu quả thu hoạch [151, 152]. Blockx và cộng sự (2018) [43] thì cho rằng tảo nuôi trong môi trường nước ngọt có pH < 7,5 thì chitosan cần thiết tạo proton các nhóm amin để hoạt hóa, dẫn đến hiện tượng keo tụ theo hướng trung hòa điện tích và tạo cầu nối. Nhưng tảo nuôi trong môi trường nước biển có pH > 7,5 thì chitosan sẽ kết tủa, dẫn đến sự hình thành mạng lưới để bẫy các tế bào vi tảo và có xu hướng cuộn lại tạo thành khối bông lớn (còn gọi là hiện tượng keo tụ theo cơ chế quét). Khi pH môi trường dịch vi tảo được tăng giá trị kiềm cao hơn môi trường cấy và sau khi có tác động của chitosan, các tế bào sẽ kết bông. Nghiên cứu của [174] cho thấy hiệu quả thu loài vi tảo *N. gaditana* tăng lên đáng kể khi kết hợp dùng chitosan và điều chỉnh pH 9,9.

Do vậy, nghiên cứu này đã tiến hành thử nghiệm kết hợp sử dụng chitosan lactate ở các nồng độ thấp (CTSs ≤ 300 ppm) nhằm tìm ra nồng độ phù hợp khi được kết hợp thay đổi pH, đồng thời có thể giảm được lượng muối chitosan cần dùng. Khoảng pH được chọn để kết hợp điều chỉnh môi trường là pH 9,0, pH 9,5 và pH 10 và lắng ở các thời điểm khác nhau từ 15 phút đến 300 phút. Việc chọn pH này nhằm ngăn khả năng xảy ra tác dụng phụ khi giá trị pH quá cao và tránh khả năng các tế bào bị phá vỡ giải phóng các chất dinh dưỡng bên trong [95, 127]. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate và pH môi trường đến hiệu suất lắng được trình bày trong Hình 3.26 và Hình 3.27.



Hình 3.26. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate và pH môi trường đến hiệu suất lắng (a) và hình ảnh vi tảo *Nannochloropsis* sp. thu bằng CTSs 250 ppm kết hợp điều chỉnh độ pH khác nhau (b), tại thời điểm sau 120 phút lắng.

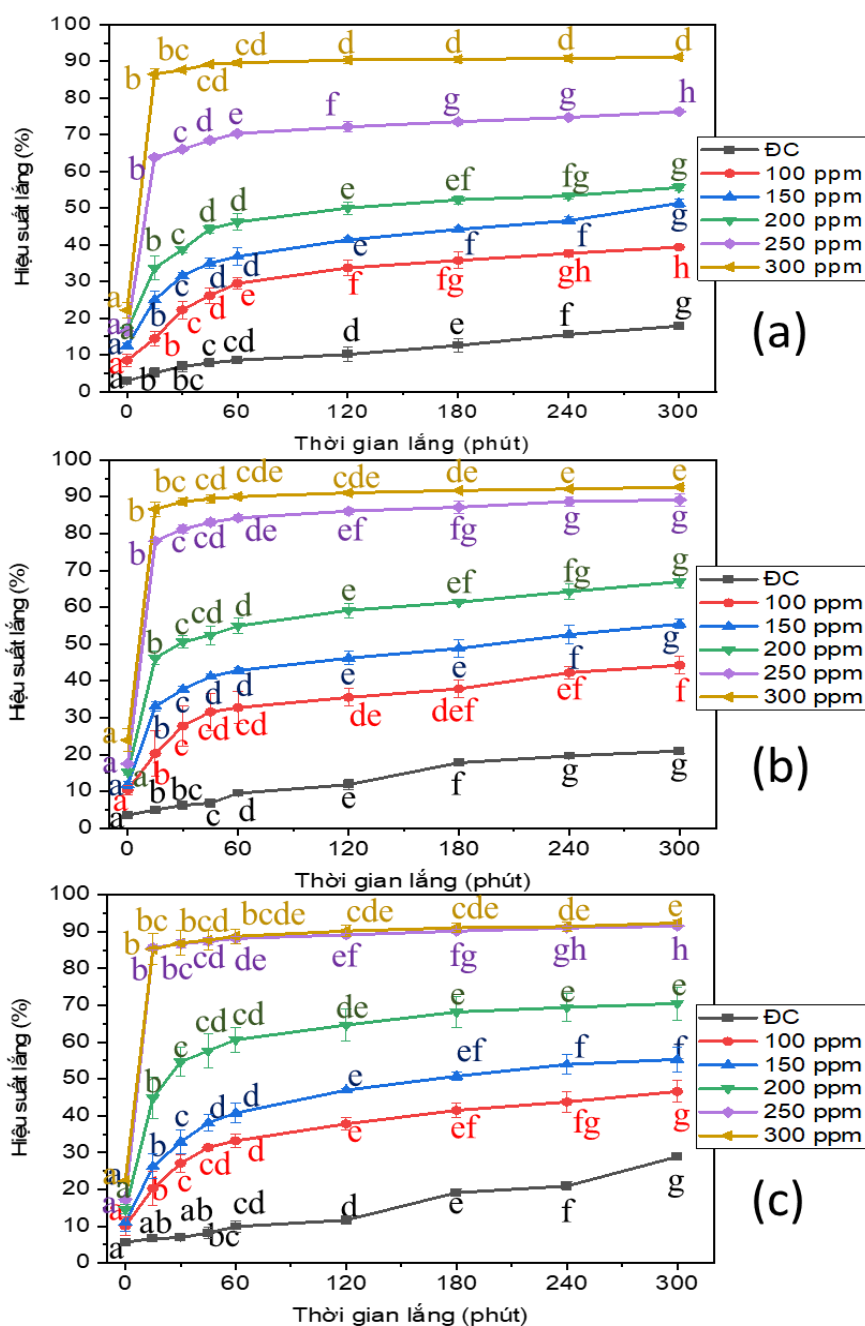
Các giá trị trên đồ thị có ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Theo kết quả khảo sát ở Hình 3.25a, khi chỉ sử dụng chitosan lactate với nồng độ 300 ppm thì hiệu quả lắng gần như đạt cực đại sau 120 phút. Do đó trong phần này, chỉ khảo sát CTSs ở các nồng độ khác nhau (≤ 300 ppm) và điều chỉnh pH (9,0; 9,5; 10,0)

tại thời điểm 120 phút lắng. Hình 3.26 cho thấy sự biến động kết quả lắng của mẫu kết hợp điều chỉnh pH 10,0 khác biệt hơn so với hai mẫu thí nghiệm còn lại và mẫu đối chứng (môi trường tự nhiên, pH khoảng 8,0). Cụ thể, hiệu quả lắng vi tảo khi kết hợp điều chỉnh môi trường pH 9,0 và pH 9,5 tăng khi tăng nồng độ CTSs sử dụng từ 0 đến 200 ppm. Sau đó, hiệu quả lắng tăng cao từ nồng độ CTSs sử dụng là 200 lên 250 ppm (khoảng từ (50 – 59%) đến (72 – 86 %)) và đạt cao nhất ở nồng độ 300 ppm (90 – 91%). Với pH 10,0 thì hiệu suất lắng các mẫu ở nồng độ CTSs tăng dần từ khoảng 11,7% (CTSs 0 ppm) đến mức cao nhất khoảng 90,2% (CTSs 250 ppm) và không khác biệt thống kê ($p>0,05$) khi tăng nồng độ CTSs lên 300 ppm (khoảng 89%). Kết quả cho thấy, hiệu quả lắng tăng cao nếu kết hợp dùng chitosan lactate và điều chỉnh pH 10,0 so với hiệu suất lắng khi chỉ sử dụng CTSs 300 ppm tại thời điểm lắng 120 phút chỉ đạt khoảng 87% (ĐC). Ngoài ra, kết quả còn có ý nghĩa trong việc giảm lượng chitosan lactate cần dùng, tiết kiệm được chi phí thu hoạch vi tảo.

Hình 3.27 cho thấy hiệu quả keo tụ chịu ảnh hưởng của các nồng độ chitosan và độ pH khác nhau. Trong đó, hiệu suất lắng phụ thuộc rất lớn đến sự thay đổi nồng độ của chitosan lactate sử dụng. Nồng độ CTSs dùng càng cao thì hiệu suất lắng vi tảo càng cao, đạt cao nhất là trên 90% sau 5 giờ lắng. Tuy nhiên, không có sự thay đổi đáng kể về hiệu suất lắng khi thu hoạch ở nồng độ CTSs 300 ppm và các độ pH điều chỉnh khác nhau trong khoảng pH 9,0 – 10,0. Với các nồng độ CTSs thấp hơn (< 300 ppm), hiệu suất lắng càng tăng lên khi tăng độ pH kết hợp. Trong đó, thấy rõ nhất hiệu quả thu hoạch khi dùng CTSs với nồng độ là 250 ppm, có sự thay đổi lớn về hiệu suất lắng khi tăng độ pH từ 9,0 (Hình 3.27a) lên 9,5 (Hình 3.27b) và 10,0 (Hình 3.27c).

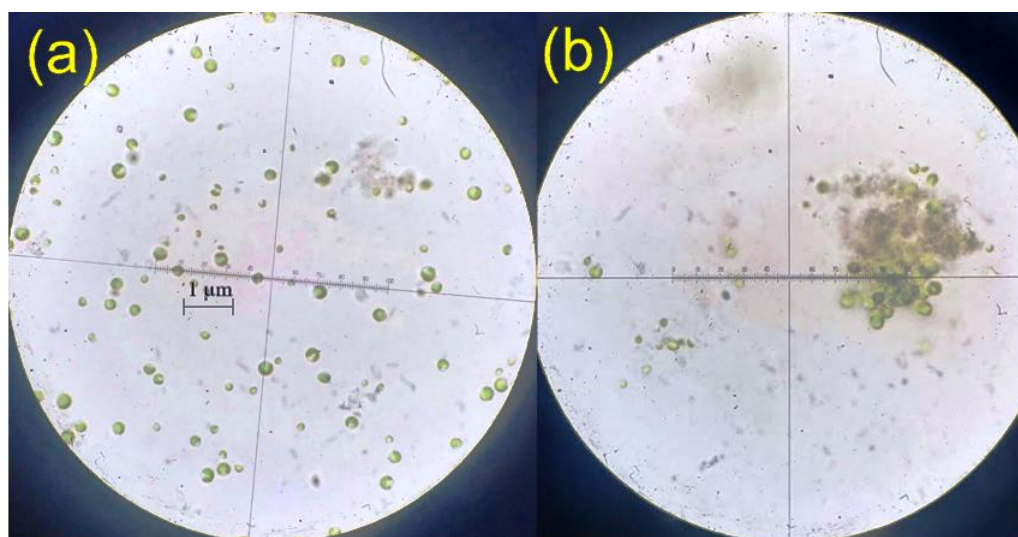
Hình 3.27c cho thấy kết quả hiệu suất lắng khi kết hợp sử dụng CTSs ở nồng độ 250 ppm hoặc 300 ppm và kết hợp điều chỉnh pH 10 thì không khác biệt thống kê ở các thời điểm lắng từ 15 phút đến 300 phút. Điều này có thể giả thích do môi trường có đủ cation để hấp phụ với *Nannochloropsis* sp. mang tích điện âm [151, 152]. Vì vậy, nồng độ 250 ppm chitosan lactate phù hợp để chọn để tiến hành kết lắng vi tảo khi kết hợp với việc điều chỉnh pH môi trường ở giá trị 10,0. Giá trị pH 10,0 được kết hợp điều chỉnh độ kiềm của môi trường vi tảo biển sau khi cho chitosan lactate (250 ppm) đạt hiệu quả thu cao tương tự kết quả của Şirin và cộng sự (2013) [174], hiệu quả lắng đạt khoảng từ 85,7% (15 phút lắng) đến 91,5% (5 giờ lắng). Trong khi, hiệu suất lắng khi thu bằng CTSs 300 ppm (pH tự nhiên) đạt khoảng từ 75,1% (15 phút lắng) đến 88,7% (5 giờ lắng). So với kết quả nghiên cứu của Blockx và cộng sự (2018) [43], trong khoảng pH 9,0 – 10,0 thì chitosan sử dụng ở nồng độ 200 ppm (có bổ sung ion (Mg^{2+}) = 50 mM) đạt hiệu suất lắng vi tảo *Nannochloropsis oculata* trên 90% sau 30 phút để lắng.



Hình 3.27. Ảnh hưởng của phương pháp kết hợp chitosan lactate và điều chỉnh pH (a, pH 9,0), (b, pH 9,5), (c, pH 10,0) đến hiệu suất sấy theo thời gian thu hoạch.

Các giá trị trên đồ thị có ký tự (theo ký hiệu màu) khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Hình 3.28 cho thấy các tế bào vi tảo sau khi rửa bông có sự kết dính vào nhau nhưng hình dạng tương tự so với hình ảnh tế bào trước khi thu hoạch. Điều này chứng tỏ không có sự vỡ tế bào trong quá trình thu sử dụng CTSs và điều chỉnh pH. Do đó, vi tảo thu được có thể giữ được các chất dinh dưỡng và có thể phục hồi sinh trưởng.



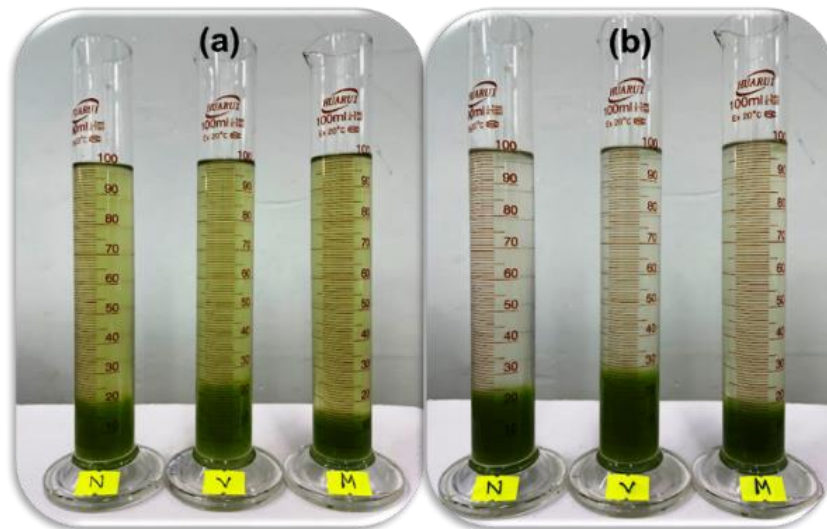
Hình 3.28. Hình thái tế bào vi tảo *Nannochloropsis* sp. dưới kính hiển vi quang học (vật kính 100x) trước khi keo tụ (a) và sau khi keo tụ bằng chitosan lactate (250 ppm) kết hợp điều chỉnh pH 10,0 (b).

Tiến hành so sánh hiệu quả lắng vi tảo *Nannochloropsis* sp. khi sử dụng các loại muối chitosan lactate (CTSs) khác nhau gồm: CTSs từ nguồn vỏ lột xác (ký hiệu là N), CTSs từ nguồn vỏ tôm chế biến cung cấp bởi công ty VNF và được điều chế cùng quy trình với mẫu N (ký hiệu là V), và CTSs thương mại của công ty MarkNature (ký hiệu là M). Bảng 3.18 và Hình 3.29 trình bày kết quả hiệu suất lắng khi sử dụng các loại muối CTSs và so sánh hai phương pháp kết tủa bằng CTSs và phương pháp kết hợp dùng CTSs có điều chỉnh pH 10,0.

Bảng 3.18. So sánh hiệu quả thu hồi sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. bằng các loại chitosan lactate (250 ppm) khác nhau kết hợp điều chỉnh pH 10,0 sau 15 phút lắng

Phương pháp thu	Hiệu suất lắng (%)		
	CTSs từ VLX (N)	CTSs từ VNF (V)	CTSs từ MarkNature (M)
CTSs	58,8 ^b ± 1,9	58,2 ^b ± 2,4	52,5 ^a ± 1,7
CTSs + pH	85,9 ^b ± 0,5	87,5 ^c ± 0,5	65,8 ^a ± 0,7

Các giá trị trong bảng (theo hàng) có ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



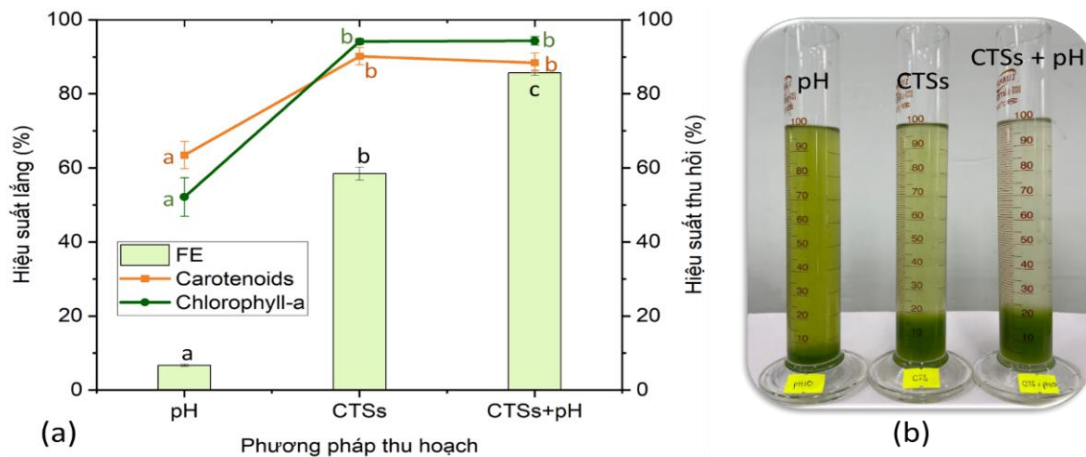
Hình 3.29. Hình ảnh sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. thu bằng các loại chitosan lactate khác nhau (a) và có kết hợp điều chỉnh pH 10,0 (b), tại thời điểm sau 15 phút lắng.

Hiệu suất lắng vi tảo *Nannochloropsis* sp. khi dùng CTSs từ nguồn chitosan thương mại và được điều chế muối cùng quy trình với CTSs từ nguồn vỏ lột xác không khác biệt đáng kể ($p > 0,05$) và hiệu quả cao hơn so với việc sử dụng muối CTSs thương mại (MarkNature). Quan sát quá trình lắng của các mẫu trong 15 phút đầu (Hình 3.29a) cho thấy ống đong N phân lớp rõ phần cặn, còn hai ống đong V, M vẫn còn bông vi tảo lơ lửng ở phần nước sau tách lớp. Điều này chỉ ra rằng loại muối CTS có tính chất khác nhau ảnh hưởng đến hiệu suất thu khác nhau. Kết quả này thấy rõ hơn khi kết bông vi tảo bằng cách kết hợp dùng muối CTS và điều chỉnh pH môi trường kiềm (Hình 3.29b). Hiệu quả lắng của phương pháp kết hợp của các loại muối CTS khác nhau có sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) và cao hơn hẳn so với phương pháp không kết hợp điều chỉnh pH 10.

3.5.4. Ảnh hưởng của phương pháp thu nhận đến hiệu suất thu hồi chlorophyll-a và carotenoids và khả năng sinh trưởng của sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp.

Hiện nay, sinh khối vi tảo được sử dụng khá phổ biến làm thức ăn cho thủy sản. Tuy nhiên, chất lượng sản phẩm sinh khối vi tảo sau thu hoạch tùy thuộc vào phương pháp thu hoạch và bảo quản sản phẩm [43, 54, 55, 100]. Do vậy, các nghiên cứu gần đây đã tập trung vào việc lựa chọn phương pháp thu hoạch không ảnh hưởng lớn đến thành phần dinh dưỡng cũng như để lại các chất gây hại cho vật nuôi và môi trường trong sản phẩm [24, 25, 54, 55]. Mặc dù vậy, hầu hết các nghiên cứu tập trung phân tích thành phần dinh dưỡng cao trong vi tảo *Nannochloropsis* sp. như lipids (các acid béo không bão hòa), protein (các amino acid) [54, 55, 150, 174], rất ít nghiên cứu đánh giá

thành phần chất màu như chlorophyll-a và carotenoids. Đây là những hợp chất có khả năng chống oxy hóa và rất cần thiết cho sự phát triển và tạo màu cho ấu trùng thủy sản [110]. Với mục đích thu hoạch sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. định hướng đáp ứng nhu cầu thực phẩm cho thủy sản nuôi, đặc biệt các đối tượng ấu trùng thủy sản, đề tài đã đánh giá ảnh hưởng của phương pháp thu đến khả năng thu hồi chất màu có trong tế bào vi tảo, đồng thời đánh giá khả năng tăng sinh khối khi được nuôi lại trong môi trường dinh dưỡng F2 và nước biển (điều kiện nuôi cấy ở phòng thí nghiệm). Kết quả nghiên cứu được trình bày trong Hình 3.30 và Hình 3.31.



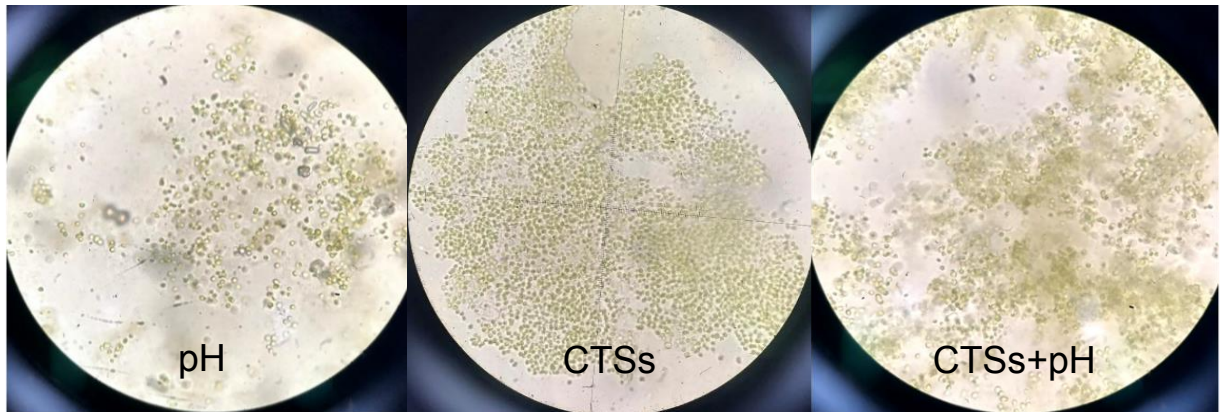
Hình 3.30. Ảnh hưởng của phương pháp thu hoạch vi tảo đến hiệu suất lắng (FE), hiệu suất thu hồi của chất màu (chlorophyll-a và carotenoids) (a) và sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. (b).

Các giá trị trên đồ thị có ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Hình 3.30 cũng cho thấy hiệu quả lắng khi sử dụng các phương pháp thu khác nhau có sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$), thấp nhất là phương pháp chỉ điều chỉnh pH môi trường dịch vi tảo để thu hoạch ($< 10\%$) và cao nhất là có sự kết hợp giữa việc sử dụng CTSs và điều chỉnh pH môi trường ở giá trị 10,0 ($\sim 90\%$). Hình 3.30a cho thấy hàm lượng chlorophyll-a và carotenoids trong tế bào vi tảo bị ảnh hưởng lớn bởi các phương pháp thu mặc dù không có sự thay đổi màu sắc tế bào (sắc tố lục lạp) đáng kể khi quan sát bằng mắt thường (Hình 3.30b) hoặc bằng kính hiển vi (Hình 3.31).

Về hàm lượng chất màu trong sinh khối vi tảo thu được, phương pháp điều chỉnh độ pH của môi trường ảnh hưởng rất lớn với hiệu suất thu hồi $< 65\%$. Trong khi, phương pháp thu bằng CTSs hoặc kết hợp sử dụng CTSs với điều chỉnh pH của môi trường thì không bị ảnh hưởng lớn đến hiệu suất thu hồi các chất màu (khoảng 88 – 95%). Trong đó, hiệu suất thu hồi chlorophyll-a và carotenoids không khác biệt đáng kể ($p > 0,05$) giữa hai phương pháp thu theo thứ tự là $94,1 \pm 0,8\%$ và $90,2 \pm 2,3\%$ (CTSs 250 ppm), $94,3 \pm 1,1\%$ và $88,4 \pm 2,6\%$ (CTSs 250 ppm + pH 10,0). Nhưng hiệu quả thu sinh khối của phương pháp kết

hợp sử dụng CTSs và pH cao hơn khoảng 1,5 lần so với phương pháp chỉ sử dụng CTSs cùng nồng độ.



Hình 3.31. Ảnh hưởng của phương pháp thu hoạch đến hình thái của sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp.

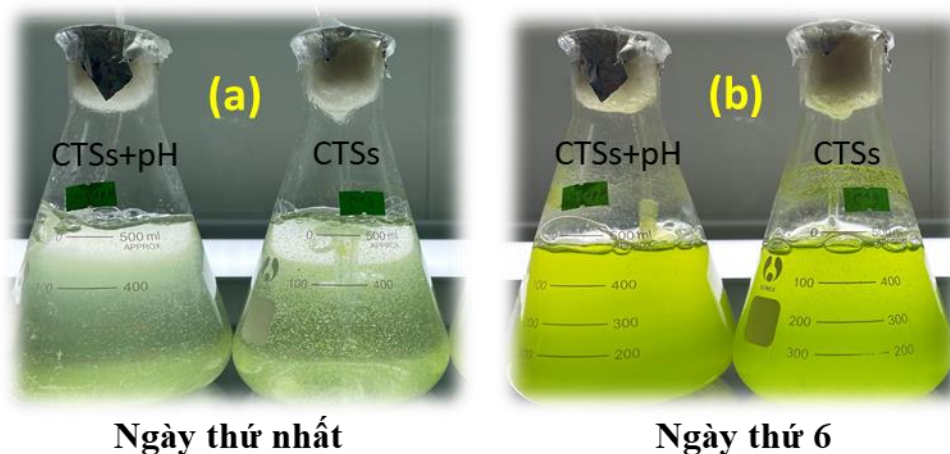
Kết quả này có thể quan sát rõ trong quá trình kết tủa, lắng vi tảo và hình ảnh chụp hình thái sinh khối thu được trên kính hiển vi huỳnh quang (Hình 3.31). Các tế bào khi thu bằng phương pháp chỉ điều chỉnh pH môi trường bị phồng to và nhạt màu, trong khi các tế bào được thu bằng CTSs giữ được hình thái và màu xanh lục ban đầu [1, 35].

Như vậy, phương pháp thu hoạch vi tảo *Nannochloropsis* sp. bằng cách kết hợp sử dụng CTSs và pH 10,0 đạt hiệu suất lắng cao đáng kể trong 15 phút và vẫn có thể giữ được hàm lượng chất màu chlorophyll-a và carotenoid cao. Mặc dù có một số tế bào bị tác động đến thành tế bào gây phồng hoặc nhạt màu nhưng không đáng kể.

Ngoài ra, để đánh giá tác động của CTSs và điều chỉnh pH môi trường khi thu tảo đến chất lượng của tảo, các mẫu vi tảo sau khi thu hoạch được thử nghiệm nuôi tăng sinh khối trong thời gian 6 ngày. Kết quả trình bày ở Bảng 3.19 và Hình 3.32. Sau một ngày nuôi, hai bình mẫu sinh khối thu hoạch bằng các phương pháp khác nhau có hình thái các tế bào rời rạc trong môi trường nước biển tương đương khi được vortex nhẹ 1 phút và sục khí liên tục 1 ngày. Hiện tượng này phù hợp với kết quả xác định mật độ tế bào bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer improved của phương pháp thu có kết hợp điều chỉnh pH môi trường đạt số lượng ($1,08 \times 10^6$) thấp hơn so với phương pháp chỉ sử dụng chitosan lactate ($1,29 \times 10^6$) (Bảng 3.19).

Bảng 3.19. Khả năng sinh trưởng của sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. sau thu hoạch

Phương pháp thu và ngày nuôi	Mật độ tế bào (tb/ml)	
	CTSs + pH 10	CTSs
1 ngày	$1,08 \times 10^6 \pm 0,04$	$1,29 \times 10^6 \pm 0,06$
6 ngày	$40,23 \times 10^6 \pm 1,8$	$41,63 \times 10^6 \pm 1,6$



Hình 3.32. Hình ảnh khả năng sinh trưởng của vi tảo sau thu hoạch bằng các phương pháp khác nhau sau 1 ngày (a) và 6 ngày (b) nuôi.

Khi nuôi đến ngày thứ 6 (tại thời điểm đầu của pha ổn định) thì mật độ tế bào của các bình sinh khối đạt trong khoảng $(40 - 42) \times 10^6$ (Bảng 3.19; Hình 3.32b), không khác biệt lớn. Tuy nhiên, bình sinh khối thu bằng phương pháp kết hợp thì có pha ổn định đến ngày thứ 10 và bình sinh khối được thu chỉ bằng chitosan lactate thì có thể kéo dài đến khoảng 12 ngày nuôi mới thấy màu sắc chuyển sang màu vàng (pha lụi tàn của vi tảo). Ảnh hưởng của pH môi trường đã được các nhà khoa học khẳng định trước đây, pH môi trường quá cao hoặc quá thấp có thể ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng và gây chết tế bào [1]. Biên độ pH môi trường sống của hầu hết các loài vi tảo nuôi trong khoảng pH 7 – 9 [70]. Kết quả nghiên cứu này, chúng ta có thể quan sát thấy phương pháp thu hồi vi tảo đậm đặc có ảnh hưởng đến hình thái tế bào vi tảo và khả năng sinh trưởng của tế bào vi tảo *Nannochloropsis* sp.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Từ kết quả nghiên cứu của luận án cho phép rút ra một số kết luận chính như sau:

- 1) Vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng (> 60 ngày nuôi) từ quá trình nuôi thâm canh có thể sử dụng để sản xuất chitin, chitosan tinh sạch đạt chất lượng thương mại (Standard SC/T3403-2004) theo quy trình gồm 3 công đoạn chính: (1) Khử khoáng bằng HCl 4% (tỷ lệ 1:5, w/v) ở 30°C trong 3 giờ, (2) Khử protein bằng NaOH 3% (tỷ lệ 1:5, w/v) ở 50°C trong 6 giờ, deacetyl bằng NaOH 50% (tỷ lệ 1:5, w/v) ở 90°C trong 24 giờ. Quy trình có tính ổn định cao, hiệu suất sản xuất chitin đạt khoảng 32% và sản xuất chitosan đạt khoảng 23%.
- 2) Chitosan được sản xuất từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có thể dùng để điều chế chitosan lactate tinh sạch bằng phương pháp phản ứng rắn – lỏng với dung dịch lactic acid loãng (1M) theo quy trình gồm 2 công đoạn chính: (1) Ngâm trương nở chitosan (35 mesh) trong hỗn hợp dung môi ethanol/nước (70%) trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng, (2) Cho chitosan trương nở (ở trạng thái rắn) phản ứng với dung dịch lactic acid 1M (pha trong ethanol tuyệt đối) trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Hiệu suất điều chế đạt khoảng 152% và sản phẩm chitosan lactate thu được có độ hòa tan trong nước trên 99%, độ nhớt khoảng 105 cPs.
- 3) Chitosan lactate được sản xuất từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng có thể sử dụng làm chất keo tụ để thu vi tảo *Nannochloropsis* sp. Nồng độ chitosan lactate phù hợp để thu vi tảo là 250 ppm, môi trường pH 10,0. Hiệu suất lắng vi tảo *Nannochloropsis* sp. sau 120 phút ở điều kiện này đạt khoảng 90%. Sản phẩm vi tảo thu được không bị vỡ tế bào, có khả năng nuôi tăng sinh khối và hiệu suất thu hồi các chất có hoạt tính sinh học trong vi tảo cao: chlorophyll-a đạt khoảng 94% và carotenoids đạt khoảng 88 – 90%.

Kiến nghị

Qua quá trình thực hiện đề tài luận án và dựa trên những kết quả đạt được cho phép đề xuất như sau:

- Tiếp tục nghiên cứu sản xuất chitin, chitosan và chitosan lactate từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng ở quy mô pilot.
- Triển khai thử nghiệm ứng dụng chitosan lactate để thu hoạch vi tảo ở ao nuôi sinh khối.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu Tiếng Việt

1. Cái Ngọc Bảo Anh, Reinertsen H. và Nguyễn Hữu Dũng (2010), *Ảnh hưởng của dinh dưỡng đến sinh trưởng quần thể, chất lượng của ba loài vi tảo (Nannochloropsis oculata, Isochrysis galbana và Tetraselmis chui) và luân trùng (Brachionus plicatilis)*. Luận án tiến sĩ, Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Nha Trang, Trường Đại học Nha Trang. 196.
2. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2018), "Quyết định Phê duyệt Đề án tổng thể phát triển ngành công nghiệp tôm nước lợ Việt Nam đến năm 2030", số 3475/QĐ-BNN-TCTS.
3. Trần Vĩ Hích, Nguyễn Công Minh, Nguyễn Thị Kim Cúc, Phạm Thị Đan Phượng và Trang Sĩ Trung (2020), "Tác động của việc bổ sung chitin vào thức ăn lên khả năng kháng lại *Vibrio parahaemolyticus* của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeid vannamei*)", *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, 4, pp. 45-50.
4. Hội nghề cá Việt Nam (2018), "Thấp sáng niềm tin", *Tạp chí Thủy sản Việt Nam*, 1, pp. 272.
5. Hội Nghề cá Việt Nam (2021), "Đặc san Con Tôm", *Vietnam shrimp news*, số 111 – 112.
6. Hội nghề cá Việt Nam (2021), "Khát vọng hùng cường", *Tạp chí Thủy sản Việt Nam*, số 3+4, pp. 346 + 347.
7. Phạm Thị Tuyết Ngân và Trương Quốc Phú (2010), "Biến động các yếu tố môi trường trong ao nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*) thâm canh tại Sóc Trăng", *Tạp chí Khoa học*, 15a, pp. 179 – 188.
8. Trần Sương Ngọc và Phạm Thị Tuyết Ngân (2014), "Khả năng nuôi sinh khối tảo *Nannochloropsis oculata* trong các hệ thống khác nhau", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Chuyên đề: Thủy sản, 2, pp. 63 – 69.
9. Phạm Thị Đan Phượng và Trang Sĩ Trung (2012), "Tính chất của chitin và chitosan từ vỏ tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) khử protein bằng phương pháp hóa học và sinh học", *Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản*, 3, pp. 48 – 52.
10. Võ Thị Kiều Thanh, Nguyễn Duy Tân, Vũ Thị Lan Anh và Phùng Huy Huân (2012), "Ứng dụng tảo *Chlorella* sp. và *Daphnia* sp. Lọc chất thải hữu cơ trong nước thải từ quá trình chăn nuôi lợn sau xử lý bằng UASB", *Tạp chí Sinh học*, 34 (3SE), pp. 145 – 153.

11. Thủ tướng Chính phủ (2018), "Quyết định về Việc ban hành Kế hoạch hành động quốc gia phát triển ngành tôm Việt Nam đến năm 2025", *số 79/QĐ-TTg*.
12. Tổng cục Thủy sản (2017), "Quyết định về Việc công nhận tiến bộ kỹ thuật", *số 643/QĐ-TCTS-KHCN&HTQT*.
13. Tổng cục Thủy sản (2018), "Bạc Liêu: Bảo vệ môi trường nuôi trồng thủy sản", *Truy cập tại địa chỉ: <https://tongcucthuysan.gov.vn/nuoi-trong-thuy-san/-phong-chong-dich-benh/doc-tin/012060/2019-01-03/bac-lieu-bao-ve-moi-truong-nuoi-trong-thuy-san>*, Trang Thông tin điện tử, truy cập ngày 24-12-2018.
14. Tổng cục Thủy sản (2018), "Đồng bằng sông Cửu Long: Giải pháp bảo vệ môi trường nuôi trồng thủy sản", *Truy cập tại địa chỉ: <https://tongcucthuysan.gov.vn/Aquaculture/Environmental-monitoring/doc-tin/011985/2018-12-24/dong-bang-song-cuu-long-dbscl-giai-phap-bao-ve-moi-truong-nuoi-trong-thuy-san>*, Trang Thông tin điện tử, truy cập ngày 24/12/2018.
15. Tổng cục thủy sản (2021), "Tổng sản lượng thủy sản năm 2021 ước đạt 8,73 triệu tấn", *Bản tin Thông tin Thủy sản*, số 12, pp. 16 – 17.
16. Tổng cục thủy sản (2022), "Năm 2022 ngành Thủy sản phấn đấu sản lượng nuôi trồng ước đạt 4,95 triệu tấn", *Bản tin Thông tin Thủy sản*, số 1, pp. 16 – 17.
17. Tổng cục thủy sản (2022), "Tổng sản lượng thủy sản tháng 2/2022 ước đạt 578 nghìn tấn", *Bản tin Thông tin Thủy sản*, số 2, pp. 14 – 15.
18. Bùi Bá Trung, Hoàng Thị Bích Mai, Nguyễn Hữu Dũng và Cái Ngọc Bảo Anh (2009), "Ảnh hưởng của mật độ ban đầu và tỷ lệ thu hoạch lên sinh trưởng vi tảo *Nannochloropsis oculata* nuôi trong hệ thống ống dẫn trong suốt nước chảy liên tục", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Thủy sản*, số 1, pp. 37 – 44.
19. Trang Sĩ Trung và Phạm Thị Đan Phượng (2005), "Nghiên cứu ứng dụng chitosan trong việc làm giảm độ phân rã thức ăn tôm", *Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản*, 4, pp. 18 – 22.
20. Trang Sĩ Trung, Phan Thanh Lộc, Nguyễn Công Minh, Phạm Thị Đan Phượng và Nguyễn Văn Hòa (2019), "Nghiên cứu sản xuất chitosan khối lượng phân tử thấp từ xác tôm mìn trong quá trình sản xuất dịch đậm thủy phân", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Thủy sản*, 3, pp. 146-154.
21. Trang Sĩ Trung, Trần Thị Luyến, Nguyễn Anh Tuấn, Nguyễn Văn Hòa và Nguyễn Thị Hằng Phương (2018), *Chitin – Chitosan từ phế liệu thủy sản và ứng dụng*, Thành phố Hồ Chí Minh, Nhà xuất bản Nông nghiệp.

22. Ủy ban Nhân dân tỉnh Khánh Hòa (2018), "Quyết định về Việc ban hành Kế hoạch phát triển ngành tôm tỉnh Khánh Hòa đến năm 2025", số 1022/QĐ-UBND.

Tài liệu tiếng Anh

23. Abdou E.S., Nagy K.S. và Elsabee M.Z. (2008), "Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources", *Bioresource Technology*, 99(5), pp. 1359-1367.
24. Ahmad A., Yasin N.M., Derek C. và Lim J. (2011), "Optimization of microalgae coagulation process using chitosan", *Chemical Engineering Journal*, 173(3), pp. 879-882.
25. Ahmad A.L., Yasin N.M., Derek C. và Lim J. (2011), "Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(1), pp. 584-593.
26. Åkerlöf G. (1932), "Dielectric constants of some organic solvent-water mixtures at various temperatures", *Journal of the American Chemical Society*, 54(11), pp. 4125-4139.
27. Anna W.P. (2008), "Chitosan dicarboxylic acid salts", *Prog. Chem. Appl. Chitin. Deriv.*, XIII, pp. 25-34.
28. Antia N., Bisalputra T., Cheng J. và Kalley J. (1975), "Pigment and cytological evidence for reclassification of *Nannochloris oculata* and *Monaliantus salina* in the eustigmatophyceae 1", *Journal of Phycology*, 11(3), pp. 339-343.
29. AOAC (1990), "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", Vol. II, 15th ed. Sec.985.29. The Association: Arlington, VA.
30. Austin P. và Sennett S. (1986), Dry chitosan salts and complexes of aliphatic carboxylic acids, in: *Chitin in Nature and Technology* Springer. pp. 279-286.
31. Aye K.N. và Stevens W.F. (2004), "Improved chitin production by pretreatment of shrimp shells", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 79(4), pp. 421-425.
32. Aziz M. và Ng W. (1992), "Feasibility of wastewater treatment using the activated-algae process", *Bioresource Technology*, 40(3), pp. 205-208.

33. Baharuddin N., Aziz N.S., Sohif H.N., Karim W.A.A., Al-Obaidi J.R. và Basiran M. (2016), "Marine microalgae flocculation using plant: the case of *Nannochloropsis oculata* and *Moringa oleifera*", *Pak J Bot*, 48(2), pp. 831-840.
34. Barrut B., Blancheton J.-P., Muller-Feuga A., René F., Narváez C., Champagne J.-Y. và Grasmick A. (2013), "Separation efficiency of a vacuum gas lift for microalgae harvesting", *Bioresource Technology*, 128, pp. 235-240.
35. Beach E.S., Eckelman M.J., Cui Z., Brentner L. và Zimmerman J.B. (2012), "Preferential technological and life cycle environmental performance of chitosan flocculation for harvesting of the green algae *Neochloris oleoabundans*", *Bioresource Technology*, 121, pp. 445-449.
36. Ben-Amotz A. (1987), "Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta)", *Journal of Plant Physiology*, 131(5), pp. 479-487.
37. Bhattarai N., Ramay H.R., Chou S.-H. và Zhang M. (2006), "Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery", *International Journal of Nanomedicine*, 1(2), pp. 181-187.
38. Bilanovic D., Shelef G. và Sukenik A. (1988), "Flocculation of microalgae with cationic polymers—effects of medium salinity", *Biomass*, 17(1), pp. 65-76.
39. Black M. và Schwartz H.M. (1950), "The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products", *Analyst*, 75(889), pp. 185-189.
40. Blanchemain A. và Grizeau D. (1999), "Increased production of eicosapentaenoic acid by *Skeletonema costatum* cells after decantation at low temperature", *Biotechnology Techniques*, 13(7), pp. 497-501.
41. Bleeke F., Milas M., Winckelmann D. và Klöck G. (2015), "Optimization of freshwater microalgal biomass harvest using polymeric flocculants", *International Aquatic Research*, 7(3), pp. 235-244.
42. Bligh E.G. và Dyer W.J. (1959), "A rapid method of total lipid extraction and purification", *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), pp. 911-917.
43. Blockx J., Verfaillie A., Thielemans W. và Muylaert K. (2018), "Unravelling the mechanism of chitosan-driven flocculation of microalgae in seawater as a function of pH", *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(9), pp. 11273-11279.

44. Borowitzka M.A. (1997), "Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints", *Journal of Applied Phycology*, 9(5), pp. 393-401.
45. Bratby J. (2016), *Coagulation and flocculation in water and wastewater treatment*, IWA publishing, London, Seattle, <https://www.iwapublishing.com/news/coagulation-and-flocculation-water-and-wastewater-treatment>.
46. Brine C.J. (1982), Chitin-protein interactions, in: *Chitin and Chitosan*, Hirano S., Tokura, S., Editor, The Japanese Society of Chitin and Chitosan, Tottori, Japan. pp. 105-110.
47. Britto D.D. và Assis O.B.G. (2012), "Chemical, biochemical, and microbiological aspects of chitosan quaternary salt as active coating on sliced apples", *Food Science and Technology*, 32, pp. 599-605.
48. Brown M., Garland C., Jeffrey S., Jameson I. và Leroi J. (1993), "The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp.(clone T. ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*", *Journal of Applied Phycology*, 5(3), pp. 285-296.
49. Brown M.R. (1991), "The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 145(1), pp. 79-99.
50. Brown M.R., McCausland M.A. và Kowalski K. (1998), "The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat", *Aquaculture*, 165(3-4), pp. 281-293.
51. Buelna G., Bhattarai K., De la Noue J. và Taiganides E. (1990), "Evaluation of various flocculants for the recovery of algal biomass grown on pig-waste", *Biological Wastes*, 31(3), pp. 211-222.
52. Buike P. (2018), "Microalgae production technologies for hatcheries", *Global Aquaculture*, <https://www.globalseafood.org/advocate/microalgae-production-technologies-for-hatcheries/>.
53. Caridade S.G., da Silva R.M., Reis R.L. và Mano J.F. (2009), "Effect of solvent-dependent viscoelastic properties of chitosan membranes on the permeation of 2-phenylethanol", *Carbohydrate Polymers*, 75(4), pp. 651-659.
54. Cavonius L.R. (2016), *Fractionation of lipids and protein from the microalga *Nannochloropsis oculata**, Chalmers Tekniska Hogskola (Sweden), 4-17.

55. Cavonius L.R., Albers E. và Undeland I. (2016), "In vitro bioaccessibility of proteins and lipids of pH-shift processed *Nannochloropsis oculata* microalga", *Food & Function*, 7(4), pp. 2016-2024.
56. Cervera M.F., Heinämäki J., de la Paz N., López O., Maunu S.L., Virtanen T., Hatanpää T., Antikainen O., Nogueira A. và Fundora J. (2011), "Effects of spray drying on physicochemical properties of chitosan acid salts", *Aaps Pharmscitech*, 12(2), pp. 637-649.
57. Chang E.S. (1992), Endocrinology, in: *Marine shrimp culture: principles and practices. Developments in aquaculture and fisheries science*, L.J. F.A.W.a.L., Editor, Elsevier Science Publisher B.V., The Netherlands. pp. 53-93.
58. Chang K.L.B. và Tsai G. (1997), "Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melanthero*) shell waste", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), pp. 1900-1904.
59. Chang S.-H., Lin H.-T.V., Wu G.-J. và Tsai G.J. (2015), "pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan", *Carbohydrate Polymers*, 134, pp. 74-81.
60. Chen G., Zhao L., Qi Y. và Cui Y.-L. (2014), "Chitosan and its derivatives applied in harvesting microalgae for biodiesel production: An outlook", *Journal of Nanomaterials*, 217537, pp. 1-9.
61. Chen L., Wang C., Wang W. và Wei J. (2013), "Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. cultivated in an open-pond system", *Bioresource Technology*, 133, pp. 9-15.
62. Cheng Y.-S., Zheng Y., Labavitch J.M. và VanderGheynst J.S. (2011), "The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*", *Process Biochemistry*, 46(10), pp. 1927-1933.
63. Chisti Y. (1999), Shear sensitivity, in: *Mass transfer/MC Flickinger, SW Drew (eds). Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation.*, John Wiley: New York: Wiley. pp. 2379 – 2406.
64. Choi S., Lee J., Kwon D. và Cho K. (2006), "Settling characteristics of problem algae in the water treatment process", *Water Science and Technology*, 53(7), pp. 113-119.
65. Chua E.T., Eltanahy E., Jung H., Uy M., Thomas-Hall S.R. và Schenk P.M. (2019), "Efficient harvesting of *Nannochloropsis* microalgae via optimized chitosan-mediated flocculation", *Global Challenges*, 3(1), 1800038, pp. 1-7.

66. Chua E.T., Shekh A.Y., Eltanahy E., Thomas-Hall S.R. và Schenk P.M. (2020), "Effective harvesting of *Nannochloropsis* microalgae using mushroom chitosan: a pilot-scale study", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 771, pp. 1-8.
67. Coleman C.K., Mai E., Miller M., Sharma S., Williamson C., Oza H., Holmes E., Lamer M., Ly C. và Stewart J. (2021), "Chitosan Coagulation Pretreatment to Enhance Ceramic Water Filtration for Household Water Treatment", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9736, pp. 1-17.
68. Corsi K., Chellat F. và Fernandes J.C. (2003), "Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles", *Biomaterials*, 24(7), pp. 1255-1264.
69. Corteel M., Dantas-Lima J., Wille M., Alday-Sanz V., Pensaert M., Sorgeloos P. và Nauwynck H. (2012), "Moult cycle of laboratory-raised *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* and *P. monodon*", *Aquaculture International*, 20(1), pp. 13-18.
70. Coutteau P. (1996), "Micro-algae", *Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper*, 361, pp. 7-48.
71. Cuong H.N., Tung H.T., Minh N.C., Van Hoa N., Phuong P.T.D. và Trung T.S. (2017), "Antibacterial Activity of Chitosan from Squid Pens (*Loligo chinensis*) against *Erwinia Carotovora* from Soft Rot Postharvest Tomato Fruit", *Journal of Polymer Materials*, 34(1), pp. 103-114.
72. Dang Q.F., Yan J.Q., Li Y., Cheng X.J., Liu C.S. và Chen X.G. (2010), "Chitosan acetate as an active coating material and its effects on the storing of *Prunus avium* L", *Journal of Food Science*, 75(2), pp. S125-S131.
73. Dang T.T., Gringer N., Jessen F., Olsen K., Bøknæs N., Nielsen P.L. và Orlén V. (2018), "Emerging and potential technologies for facilitating shrimp peeling: A review", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45, pp. 228-240.
74. Danquah M.K., Ang L., Uduman N., Moheimani N. và Forde G.M. (2009), "Dewatering of microalgal culture for biodiesel production: exploring polymer flocculation and tangential flow filtration", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 84(7), pp. 1078-1083.

75. Dauda A.B., Ajadi A., Tola-Fabunmi A.S. và Akinwole A.O. (2019), "Waste production in aquaculture: Sources, components and managements in different culture systems", *Aquaculture and Fisheries*, 4(3), pp. 81-88.
76. Demarger-Andre S. và Domard A. (1994), "Chitosan carboxylic acid salts in solution and in the solid state", *Carbohydrate Polymers*, 23(3), pp. 211-219.
77. Demir I., Besson A., Guiraud P. và Formosa-Dague C. (2020), "Towards a better understanding of microalgae natural flocculation mechanisms to enhance flotation harvesting efficiency", *Water Science and Technology*, 82(6), pp. 1009-1024.
78. Demir I., Blockx J., Dague E., Guiraud P., Thielemans W., Muylaert K. và Formosa-Dague C. (2020), "Nanoscale evidence unravels microalgae flocculation mechanism induced by chitosan", *ACS Applied Bio Materials*, 3(12), pp. 8446-8459.
79. Divakaran R. và Sivasankara Pillai V. (2002), "Flocculation of algae using chitosan", *Journal of Applied Phycology*, 14(5), pp. 419-422.
80. Dorsey T.E., McDonald P. và Roels O.A. (1978), "Measurements of phytoplankton-protein content with the heated biuret-fol1n assay1, 2", *Journal of Phycology*, 14(2), pp. 167-171.
81. Droop M. (1955), "Some new supra-littoral Protista", *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 34(2), pp. 233-245.
82. Elmaleh S., Coma J., Grasmick A. và Bourgade L. (1991), "Magnesium induced algal flocculation in a fluidized bed", *Water Science and Technology*, 23(7-9), pp. 1695-1702.
83. Enright C., Newkirk G., Craigie J. và Castell J. (1986), "Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96(1), pp. 1-13.
84. Fan X., Zhang L., Zhang G., Shu Z. và Shi J. (2013), "Chitosan derived nitrogen-doped microporous carbons for high performance CO2 capture", *Carbon*, 61, pp. 423-430.
85. Farid M.S., Shariati A., Badakhshan A. và Anvaripour B. (2013), "Using nano-chitosan for harvesting microalga *Nannochloropsis* sp", *Bioresource Technology*, 131, pp. 555-559.

86. Fawley K.P. và Fawley M.W. (2007), "Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa", *Protist*, 158(3), pp. 325-336.
87. Fawley M.W., Jameson I. và Fawley K.P. (2015), "The phylogeny of the genus *Nannochloropsis* (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), with descriptions of *N. australis* sp. nov. and *Microchloropsis* gen. nov", *Phycologia*, 54(5), pp. 545-552.
88. Gao Y., Wei J., Yuan J., Zhang X., Li F. và Xiang J. (2017), "Transcriptome analysis on the exoskeleton formation in early developmetal stages and reconstruction scenario in growth-moulting in *Litopenaeus vannamei*", *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1-15.
89. García M., Casariego A., Arnet Y., de la Paz N. và Fernández M. (2016), "Evaluation of Chitosan Acid Salts as Clarifying Agents of Orange Nectar", *J Exp Food Chem*, 2(106), 2, pp. 1-5.
90. García M., Montelongo I., Rivero A., de la Paz N., Fernández M. và Núñez de Villavicencio M. (2016), "Treatment of wastewater from fish processing industry using chitosan acid salts", *Int Water Wastewater Treat*, 2(2), pp. 1-6.
91. Garzon-Sanabria A.J., Davis R.T. và Nikolov Z.L. (2012), "Harvesting *Nannochloris oculata* by inorganic electrolyte flocculation: effect of initial cell density, ionic strength, coagulant dosage, and media pH", *Bioresource Technology*, 118, pp. 418-424.
92. Gorochovceva N. và Makuška R. (2004), "Synthesis and study of water-soluble chitosan-O-poly (ethylene glycol) graft copolymers", *European Polymer Journal*, 40(4), pp. 685-691.
93. Granados M., Acién F., Gómez C., Fernández-Sevilla J. và Grima E.M. (2012), "Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae", *Bioresource Technology*, 118, pp. 102-110.
94. Greenavvay P. (1985), "Calcium balance and moulting in the Crustacea", *Biol. Rev*, 6, pp. 425-454.
95. Grima E.M., Belarbi E.-H., Fernández F.A., Medina A.R. và Chisti Y. (2003), "Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics", *Biotechnology Advances*, 20(7-8), pp. 491-515.

96. Gudín C. và Thepenier C. (1986), "Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae", *Advances in Biotechnological Processes (USA)*, 6, pp. 73-110.
97. Guillard R.R. (1975), Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, in: *Culture of Marine Invertebrate Animals* Springer. pp. 29-60.
98. Hahn T., Tafi E., Paul A., Salvia R., Falabella P. và Zibek S. (2020), "Current state of chitin purification and chitosan production from insects", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(11), pp. 2775-2795.
99. Hamodrakas S.J., Willis J.H. và Iconomidou V.A. (2002), "A structural model of the chitin-binding domain of cuticle proteins", *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(11), pp. 1577-1583.
100. Hattab M., Ghaly A. và Hammouda A. (2015), "Microalgae harvesting methods for industrial production of biodiesel: critical review and comparative analysis", *J Fundam Renew Energy Appl*, 5(2), pp. 1000154.
101. Hibberd D. (1981), "Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae)", *Botanical Journal of the Linnean Society*, 82(2), pp. 93-119.
102. Higuera-Ciapara I., Felix-Valenzuela L. và Goycoolea F. (2006), "Astaxanthin: a review of its chemistry and applications", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), pp. 185-196.
103. Huang C., Chen S. và Pan J.R. (2000), "Optimal condition for modification of chitosan: a biopolymer for coagulation of colloidal particles", *Water Research*, 34(3), pp. 1057-1062.
104. Huang R., Du Y., Zheng L., Liu H. và Fan L. (2004), "A new approach to chemically modified chitosan sulfates and study of their influences on the inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growth", *Reactive and Functional Polymers*, 59(1), pp. 41-51.
105. Illum L., Jabbal-Gill I., Hinchcliffe M., Fisher A. và Davis S. (2001), "Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 51(1-3), pp. 81-96.
106. Ilyina A., Tikhonov V., Albulov A. và Varlamov V. (2000), "Enzymic preparation of acid-free-water-soluble chitosan", *Process Biochemistry*, 35(6), pp. 563-568.

107. Japar A.S., Takriff M.S. và Yasin N.H.M. (2017), "Harvesting microalgal biomass and lipid extraction for potential biofuel production: A review", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(1), pp. 555-563.
108. Jia Z. và Xu W. (2001), "Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan", *Carbohydrate Research*, 333(1), pp. 1-6.
109. Jiménez-Gómez C.P. và Cecilia J.A. (2020), "Chitosan: a natural biopolymer with a wide and varied range of applications", *Molecules*, 25(17), pp. 3981.
110. Kent M., Welladsen H.M., Mangott A. và Li Y. (2015), "Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements", *PloS One*, 10(2), pp. e0118985.
111. Khalil E.S., Saad B., Negim E.-S.M. và Saleh M.I. (2015), "Novel water-soluble chitosan derivative prepared by graft polymerization of dicyandiamide: synthesis, characterisation, and its antibacterial property", *Journal of Polymer Research*, 22(6), pp. 1-12.
112. Kim J., Yoo G., Lee H., Lim J., Kim K., Kim C.W., Park M.S. và Yang J.-W. (2013), "Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae", *Biotechnology Advances*, 31(6), pp. 862-876.
113. Knuckey R.M., Brown M.R., Robert R. và Frampton D.M. (2006), "Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds", *Aquacultural Engineering*, 35(3), pp. 300-313.
114. Kowalczyk D., Kordowska-Wiater M., Nowak J. và Baraniak B. (2015), "Characterization of films based on chitosan lactate and its blends with oxidized starch and gelatin", *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, pp. 350-359.
115. Laamanen C.A., Ross G.M. và Scott J.A. (2016), "Flotation harvesting of microalgae", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, pp. 75-86.
116. Lai C., Chen Y. và Zhang S. (2013), "Study on chitosan-lactate sponges with oriented pores as potential wound dressing", *Materials Sciences and Applications*, 4(08), pp. 458.
117. Lam G., Giraldo J., Vermuë M., Olivieri G., Eppink M. và Wijffels R. (2016), "Understanding the salinity effect on cationic polymers in inducing flocculation of the microalga *Neochloris oleoabundans*", *Journal of Biotechnology*, 225, pp. 10-17.

118. Lavens P. và Sorgeloos P. (1996), *Manual on the production and use of live food for aquaculture*, Food and Agriculture Organization (FAO), no. 361.
119. Li Y., Chen X.G., Liu N., Liu C.S., Liu C.G., Meng X.H. và Kenendy J.F. (2007), "Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates", *Carbohydrate Polymers*, 67(2), pp. 227-232.
120. Liang J., Zhang L., Xiang Z. và He N. (2010), "Expression profile of cuticular genes of silkworm, *Bombyx mori*", *BMC genomics*, 11(1), pp. 1-13.
121. Low C. và Toledo M.I. (2015), "Assessment of the shelf-life of *Nannochloropsis oculata* flocculates stored at different temperatures", *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(2), pp. 315-321.
122. Lubián L.M., Montero O., Moreno-Garrido I., Huertas I.E., Sobrino C., González-del Valle M. và Parés G. (2000), "Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments", *Journal of Applied Phycology*, 12(3), pp. 249-255.
123. Maruyama I. (1986), "Identification of the alga known as 'marine Chlorella' as a member of the Eustigmatophyceae", *Jpn. J. Phycol.*, 34, pp. 319-325.
124. Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S.-I. và Lee Y.C. (2005), "Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format", *Analytical Biochemistry*, 339(1), pp. 69-72.
125. Mata T.M., Martins A.A. và Caetano N.S. (2010), "Microalgae for biodiesel production and other applications: a review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), pp. 217-232.
126. Matos Â.P., Feller R., Moecke E.H.S., de Oliveira J.V., Junior A.F., Derner R.B. và Sant'Anna E.S. (2016), "Chemical characterization of six microalgae with potential utility for food application", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(7), pp. 963-972.
127. McCausland M.A., Brown M.R., Barrett S.M., Diemar J.A. và Heasman M.P. (1999), "Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*)", *Aquaculture*, 174(3-4), pp. 323-342.
128. Mikkelsen A., Engelsen S., Hansen H., Larsen O. và Skibsted L. (1997), "Calcium carbonate crystallization in the α -chitin matrix of the shell of pink shrimp, *Pandalus borealis*, during frozen storage", *Journal of Crystal Growth*, 177(1-2), pp. 125-134.

129. Minh N.C., Cuong H.N., Phuong P.T.D., Schwarz S., Stevens W.F., Van Hoa N. và Trung T.S. (2017), "Swelling-assisted reduction of chitosan molecular weight in the solid state using hydrogen peroxide", *Polymer Bulletin*, 74(8), pp. 3077-3087.
130. Minh N.C., Schwarz S., Stevens W.F. và Trung T.S. (2019), "Preparation of water soluble hydrochloric chitosan from low molecular weight chitosan in the solid state", *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, pp. 718-726.
131. Mirna F.C., Jyrki H., Nilia D.L.P., Orestes L., Sirkka L.M., Tommi V., Timo H., Osmo A., Antonio N., Jorge F. và Jouko Y. (2011), "Effects of spray drying on physicochemical properties of chitosan acid salts", *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 12, pp. 637-649.
132. Mohsen-Nia M., Amiri H. và Jazi B. (2010), "Dielectric constants of water, methanol, ethanol, butanol and acetone: measurement and computational study", *Journal of Solution Chemistry*, 39(5), pp. 701-708.
133. Molino A., Larocca V., Chianese S. và Musmarra D. (2018), "Biofuels production by biomass gasification: A review", *Energies*, 11(4), pp. 811.
134. Mu R., Zhao Y., Bu Q., Wang M. và Liu D. (2018), "The effects of three different flocculants on the harvest of microalgae *Chlorella vulgaris*", *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, IOP Publishing, 191(1), 012042.
135. Ndikubwimana T., Chang J., Xiao Z., Shao W., Zeng X., Ng I.S. và Lu Y. (2016), "Flotation: A promising microalgae harvesting and dewatering technology for biofuels production", *Biotechnology Journal*, 11(3), pp. 315-326.
136. Nemtsev S., Gamzazade A., Rogozhin S., Bykova V. và Bykov V. (2002), "Deacetylation of chitin under homogeneous conditions", *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(6), pp. 521-526.
137. Norsker N.-H., Barbosa M.J., Vermuë M.H. và Wijffels R.H. (2011), "Microalgal production: a close look at the economics", *Biotechnology Advances*, 29(1), pp. 24-27.
138. Ocloo F., Quayson E., Adu-Gyamfi A., Quarcoo E., Asare D., Serfor-Armah Y. và Woode B. (2011), "Physicochemical and functional characteristics of radiation-processed shrimp chitosan", *Radiation Physics and Chemistry*, 80(7), pp. 837-841.

139. Ogawa K. và Inukai S. (1987), "X-ray diffraction study of sulfuric, nitric, and halogen acid salts of chitosan", *Carbohydrate Research*, 160, pp. 425-433.
140. Osorio-Madrado A., David L., Trombottto S., Lucas J.-M., Peniche-Covas C. và Domard A. (2010), "Kinetics study of the solid-state acid hydrolysis of chitosan: Evolution of the crystallinity and macromolecular structure", *Biomacromolecules*, 11(5), pp. 1376-1386.
141. Papazi A., Makridis P. và Divanach P. (2010), "Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants", *Journal of Applied Phycology*, 22(3), pp. 349-355.
142. Percot A., Viton C. và Domard A. (2003), "Characterization of shrimp shell deproteinization", *Biomacromolecules*, 4(5), pp. 1380-1385.
143. Pérez-Legaspi I.A., Valadez-Rocha V., Ortega-Clemente L.A. và Jiménez-García M.I. (2020), "Microalgal pigment induction and transfer in aquaculture", *Reviews in Aquaculture*, 12(3), pp. 1323-1343.
144. Pérez L., Salgueiro J.L., Maceiras R., Cancela A. và Sánchez Á. (2016), "Influence of a combination of flocculants on harvesting of *Chaetoceros gracilis* marine microalgae", *Chemical Engineering & Technology*, 39(9), pp. 1685-1692.
145. Petrusevski B., Bolier G., Van Breemen A. và Alaerts G. (1995), "Tangential flow filtration: a method to concentrate freshwater algae", *Water Research*, 29(5), pp. 1419-1424.
146. Phuong P.T.D., Minh N.C., Cuong H.N., Van Minh N., Van Hoa N., Yen H.T.H. và Trung T.S. (2017), "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(7), pp. 1850-1856.
147. Pieklarz K., Galita G., Tylman M., Maniukiewicz W., Kucharska E., Majsterek I. và Modrzejewska Z. (2021), "Physico-chemical properties and biocompatibility of thermosensitive chitosan lactate and chitosan chloride hydrogels developed for tissue engineering application", *Journal of Functional Biomaterials*, 12(2), pp. 1-17.
148. Pongthanapanich T., Nguyen K.A.T. và Jolly C.M. (2019), "Risk management practices of small intensive shrimp farmers in the Mekong Delta of Viet Nam", *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, (C1194), pp. I-20.

149. Pugazhendhi A., Shobana S., Bakonyi P., Nemestóthy N., Xia A. và Kumar G. (2019), "A review on chemical mechanism of microalgae flocculation via polymers", *Biotechnology Reports*, 21, pp. e00302.
150. Raja R., Coelho A., Hemaiswarya S., Kumar P., Carvalho I.S. và Alagarsamy A. (2018), "Applications of microalgal paste and powder as food and feed: An update using text mining tool", *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(4), pp. 740-747.
151. Rashid N., Rehman M.S.U. và Han J.-I. (2013), "Recycling and reuse of spent microalgal biomass for sustainable biofuels", *Biochemical Engineering Journal*, 75, pp. 101-107.
152. Rashid N., Rehman M.S.U. và Han J.-I. (2013), "Use of chitosan acid solutions to improve separation efficiency for harvesting of the microalga *Chlorella vulgaris*", *Chemical Engineering Journal*, 226, pp. 238-242.
153. Rashid N., Rehman S.U. và Han J.-I. (2013), "Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan", *Process Biochemistry*, 48(7), pp. 1107-1110.
154. Ravindra R., Krovvidi K.R. và Khan A. (1998), "Solubility parameter of chitin and chitosan", *Carbohydrate Polymers*, 36(2-3), pp. 121-127.
155. Reboloso-Fuentes M.M., Navarro-Pérez A., García-Camacho F., Ramos-Miras J. và Guil-Guerrero J. (2001), "Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), pp. 2966-2972.
156. Ren J., Shi W., Li K. và Ma Z. (2012), "Ultrasensitive platinum nanocubes enhanced amperometric glucose biosensor based on chitosan and nafion film", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 163(1), pp. 115-120.
157. Renaud S.M., Parry D.L., Thinh L.-V., Kuo C., Padovan A. và Sammy N. (1991), "Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture", *Journal of Applied Phycology*, 3(1), pp. 43-53.
158. Renault F., Sancey B., Badot P.-M. và Crini G. (2009), "Chitosan for coagulation/flocculation processes—an eco-friendly approach", *European Polymer Journal*, 45(5), pp. 1337-1348.
159. Riaño B., Molinuevo B. và García-González M. (2012), "Optimization of chitosan flocculation for microalgal-bacterial biomass harvesting via response surface methodology", *Ecological Engineering*, 38(1), pp. 110-113.

160. Rinaudo M. (2006), "Chitin and chitosan: Properties and applications", *Progress in Polymer Science*, 31(7), pp. 603-632.
161. Roberts G.A. (1992), *Chitin chemistry*, Springer, pp. 1-53.
162. Roer R. và Dillaman R. (1984), "The structure and calcification of the crustacean cuticle", *American Zoologist*, 24(4), pp. 893-909.
163. Rossi S., Marciello M., Sandri G., Bonferoni M.C., Ferrari F. và Caramella C. (2008), "Chitosan ascorbate: a chitosan salt with improved penetration enhancement properties", *Pharmaceutical Development and Technology*, 13(6), pp. 513-521.
164. Rossignol N., Vandanjon L., Jaouen P. và Quemeneur F. (1999), "Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration", *Aquacultural Engineering*, 20(3), pp. 191-208.
165. Rouget C. (1859), "Des substances anylacees dans le tissue des animaux specialement les articules (Chitine)", *Comptes Rendus*, 48, pp. 792-795.
166. Ryckebosch E., Muylaert K., Eeckhout M., Ruysen T. và Foubert I. (2011), "Influence of drying and storage on lipid and carotenoid stability of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), pp. 11063-11069.
167. Sachindra N., Bhaskar N. và Mahendrakar N. (2006), "Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents", *Waste Management*, 26(10), pp. 1092-1098.
168. Sahebian S., Zebarjad S.M., Sajjadi S.A., Sherafat Z. và Lazzeri A. (2007), "Effect of both uncoated and coated calcium carbonate on fracture toughness of HDPE/CaCO₃ nanocomposites", *Journal of Applied Polymer Science*, 104(6), pp. 3688-3694.
169. Samar M.M., El-Kalyoubi M., Khalaf M. và Abd El-Razik M. (2013), "Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique", *Annals of Agricultural Sciences*, 58(1), pp. 33-41.
170. Shanmugapriya A., Ramya R., Venkatachalam M. và Sudha P.N. (2011), "Optimization of ceric ammonium nitrate initiated graft copolymerization of acrylonitrile onto chitosan", *J. Water Resour. Prot.*, 3, pp. 380-386.

171. Shilova S., Tret'yakova A.Y. và Barabanov V. (2014), "Complex formation of sodium alkyl sulfates with chitosan in aqueous-ethanol solutions", *Russian Journal of Applied Chemistry*, 87(12), pp. 1923-1929.
172. Shilova S., Tret'yakova A.Y. và Barabanov V. (2018), "Association of chitosan in aqueous-alcohol solutions", *Polymer Science, Series A*, 60(2), pp. 184-189.
173. Singh J. và Dutta P. (2009), "Spectroscopic and conformational study of chitosan acid salts", *Journal of Polymer Research*, 16(3), pp. 231-238.
174. Şirin S., Clavero E. và Salvadó J. (2013), "Potential pre-concentration methods for *Nannochloropsis gaditana* and a comparative study of pre-concentrated sample properties", *Bioresource Technology*, 132, pp. 293-304.
175. Şirin S., Trobajo R., Ibanez C. và Salvadó J. (2012), "Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation", *Journal of Applied Phycology*, 24(5), pp. 1067–1080.
176. Smayda T.J. và Boleyn B.J. (1965), "Experimental observations on the flotation of marine diatoms. I. *Thalassiosira cf. nana*, *Thalassiosira rotula* and *Nitzschia seriata*", *Limnology and Oceanography*, 10(4), pp. 499-509.
177. Suh J.-K.F. và Matthew H.W. (2000), "Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review", *Biomaterials*, 21(24), pp. 2589-2598.
178. Sukenik A., Bilanovic D. và Shelef G. (1988), "Flocculation of microalgae in brackish and sea waters", *Biomass*, 15(3), pp. 187-199.
179. Sumanta N., Haque C.I., Nishika J. và Suprakash R. (2014), "Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents", *Res J Chem Sci*, 4(9), pp. 63-69.
180. Tenney M.W., Echelberger Jr W.F., Schuessler R.G. và Pavoni J.L. (1969), "Algal flocculation with synthetic organic polyelectrolytes", *Applied Microbiology*, 18(6), pp. 965-971.
181. Tilton R., Murphy J. và Dixon J. (1972), "The flocculation of algae with synthetic polymeric flocculants", *Water Research*, 6(2), pp. 155-164.
182. Toan N.V., Ng C.H., Aye K.N., Trang T.S. và Stevens W.F. (2006), "Production of high-quality chitin and chitosan from preconditioned shrimp shells", *Journal*

of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 81(7), pp. 1113-1118.

183. Trung T., Huyen N., Minh N., Le Trang T. và Han N. (2016), "Optimization of harvesting of microalgal *Thalassiosira pseudonana* biomass using chitosan prepared from shrimp shell waste", *Asian J. Agric. Res*, 10(5), pp. 162-174.
184. Trung T.S. và Phuong P.T.D. (2012), "Bioactive compounds from by-products of shrimp processing industry in Vietnam", *Journal of Food and Drug Analysis*, 20(1), pp. 194-197.
185. Trung T.S., Van Tan N., Van Hoa N., Minh N.C., Loc P.T. và Stevens W.F. (2020), "Improved method for production of chitin and chitosan from shrimp shells", *Carbohydrate Research*, 489, pp. 107913.
186. Tuckerman M.E., Marx D. và Parrinello M. (2002), "The nature and transport mechanism of hydrated hydroxide ions in aqueous solution", *Nature*, 417(6892), pp. 925-929.
187. Tungtong S., Okonogi S., Chowwanapoonpohn S., Phutdhawong W. và Yotsawimonwat S. (2012), "Solubility, viscosity and rheological properties of water-soluble chitosan derivatives", *Maejo International Journal of Science and Technology*, 6(2), pp. 315-322.
188. Uduman N., Qi Y., Danquah M.K., Forde G.M. và Hoadley A. (2010), "Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels", *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2(1), pp. 012701.
189. Uduman N., Qi Y., Danquah M.K. và Hoadley A.F. (2010), "Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement", *Chemical Engineering Journal*, 162(3), pp. 935-940.
190. Van Haver L. và Nayar S. (2017), "Polyelectrolyte flocculants in harvesting microalgal biomass for food and feed applications", *Algal Research*, 24, pp. 167-180.
191. Vandamme D., Foubert I., Fraeye I., Meesschaert B. và Muylaert K. (2012), "Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications", *Bioresource Technology*, 105, pp. 114-119.
192. Venkataraman L. (1978), "New possibility for microalgae production and utilisation in India", *Arch Hydrobiol Beih*, 11, pp. 199-210.

193. Vinšová J. và Vavřková E. (2012), Antioxidant Polymers by Chitosan Modification, in: *Antioxidant polymers: Synthesis, properties, and applications*, Cirillo G. và Iemma F., Editors., John Wiley & Sons. pp. 115 – 131.
194. Volkman J., Jeffrey S., Nichols P., Rogers G. và Garland C. (1989), "Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 128(3), pp. 219-240.
195. Waite A., Fisher A., Thompson P.A. và Harrison P.J. (1997), "Sinking rate versus cell volume relationships illuminate sinking rate control mechanisms in marine diatoms", *Marine Ecology Progress Series*, 157, pp. 97-108.
196. Wan C., Alam M.A., Zhao X.-Q., Zhang X.-Y., Guo S.-L., Ho S.-H., Chang J.-S. và Bai F.-W. (2015), "Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies", *Bioresource Technology*, 184, pp. 251-257.
197. Weecharangsan W., Opanasopit P., Ngawhirunpat T., Rojanarata T. và Apirakaramwong A. (2006), "Chitosan lactate as a nonviral gene delivery vector in COS-1 cells", *AAPS PharmSciTech*, 7(3), pp. E74-E79.
198. Wojtasz-Pajak A. (2010), "Chitosan dichloro acetic acid salts", *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 15, pp. 55-62.
199. Wu T. và Zivanovic S. (2008), "Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method", *Carbohydrate Polymers*, 73(2), pp. 248-253.
200. Wu Z., Zhu Y., Huang W., Zhang C., Li T., Zhang Y. và Li A. (2012), "Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium", *Bioresource Technology*, 110, pp. 496-502.
201. Xia L., Li Y., Huang R. và Song S. (2017), "Effective harvesting of microalgae by coagulation–flotation", *Royal Society Open Science*, 4(11), pp. 170867.
202. Xing R., Xu C., Gao K., Yang H., Liu Y., Fan Z., Liu S., Qin Y., Yu H. và Li P. (2021), "Characterization of different salt forms of chitooligosaccharides and their effects on nitric oxide secretion by macrophages", *Molecules*, 26(9), pp. 2563.
203. Yang T.-C., Chou C.-C. và Li C.-F. (2002), "Preparation, water solubility and rheological property of the N-alkylated mono or disaccharide chitosan derivatives", *Food Research International*, 35(8), pp. 707-713.

204. Yu Y., Chen B. và You W. (2007), "Identification of the alga known as *Nannochloropsis* Z-1 isolated from a prawn farm in Hainan, China as *Chlorella*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(2), pp. 207-210.
205. Zhang H. và Neau S.H. (2001), "In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation", *Biomaterials*, 22(12), pp. 1653-1658.
206. Zhang W., Zhang J., Jiang Q. và Xia W. (2012), "Physicochemical and structural characteristics of chitosan nanopowders prepared by ultrafine milling", *Carbohydrate Polymers*, 87(1), pp. 309-313.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. PHỤ LỤC CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH

- Phụ lục 1.1.** Xác định hàm lượng khoáng, ẩm trong mẫu.
- Phụ lục 1.2.** Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Biuret và Micro-Biuret.
- Phụ lục 1.3.** Xác định hàm lượng chitin trong vỏ tôm lột xác.
- Phụ lục 1.4.** Xác định hàm lượng carotenoid trong vỏ tôm.
- Phụ lục 1.5.** Xác định hàm lượng lipid trong vỏ lột xác, sinh khối vi tảo.
- Phụ lục 1.6.** Xác định độ deacetyl (DD) của chitosan.
- Phụ lục 1.7.** Xác định khối lượng phân tử trung bình (M_w) của chitosan.
- Phụ lục 1.8.** Xác định độ hòa tan của chitosan, chitosan lactate.
- Phụ lục 1.9.** Xác định độ trương nở của chitosan
- Phụ lục 1.10.** Xác định hàm lượng carbohydrate trong sinh khối vi tảo.
- Phụ lục 1.11.** Xác định hàm lượng chlorophyll-a và carotenoids trong sinh khối vi tảo.
- Phụ lục 1.12.** Xác định mật độ tế bào vi tảo bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer Improved.
-

Phụ lục 1.1. Xác định hàm lượng khoáng, ẩm [AOAC, 1990]

Nguyên lý:

- Hàm lượng ẩm trong mẫu được xác định bằng phương pháp cân trọng lượng. Mẫu được sấy ở 105°C đến khi trọng lượng không đổi. Xác định số liệu chênh lệch giữa khối lượng trước và sau sấy để suy ra hàm lượng ẩm của mẫu.
- Hàm lượng khoáng trong mẫu được xác định bằng phương pháp nung ở 600°C. Mẫu sau khi sấy được nung ở 600°C trong 12h. Xác định số liệu chênh lệch giữa khối lượng trước và sau nung để suy ra hàm lượng khoáng của mẫu.

Tiến hành:

Xác định hàm lượng ẩm:

Cân 3 – 5g mẫu vào cốc sấy, sau đó sấy ở 105°C đến khi khối lượng cốc sấy và mẫu giữa 2 lần cân không thay đổi. Hàm lượng ẩm tính theo công thức:

$$W(\%) = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

Trong đó: W: Hàm lượng ẩm của mẫu; m_1 : Khối lượng cốc sấy; m_2 : Khối lượng cốc + mẫu trước khi sấy; m_3 : Khối lượng cốc + mẫu sau khi sấy.

Xác định hàm lượng khoáng:

Sau khi xác định hàm lượng ẩm, cốc mẫu tiếp tục được nung ở 600°C trong 12h, mẫu sau nung được làm nguội trong bình hút ẩm và cân để xác định khối lượng m_4 . Hàm lượng khoáng được xác định theo công thức sau:

$$M(\%) = \frac{m_4 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100$$

Trong đó, M: hàm lượng khoáng của mẫu (%), m_1 : khối lượng cốc sấy (g), m_2 : khối lượng cốc + mẫu trước khi sấy (g), m_4 : khối lượng cốc + mẫu sau khi nung (g).

Phụ lục 1.2. Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Biuret và Micro-Biuret

A. Phương pháp Biuret

Nguyên lý: Trong môi trường kiềm, liên kết peptide của phân tử protein phản ứng với thuốc thử biuret tạo ra phức chất màu tím hoặc xanh tím. Cường độ màu của dung dịch phản ánh số lượng liên kết peptide. Thông qua đường chuẩn protein ta có thể xác định được hàm lượng protein ở trong mẫu.

Hóa chất:

- Bovine Serum Albumin (BSA) chuẩn, dung dịch NaOH 4%.
- Thuốc thử Biuret: Hòa tan 1,5 g Copper Sulfate (CuSO_4) và 6,0 g sodium potassium tartrate ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) trong 500 mL nước cất, khuấy đều và cho thêm 300 mL NaOH 10%. Dung dịch trên được khuấy trộn đều rồi làm đầy đến 1000 mL bằng nước cất.

1.2.1. Xác định hàm lượng protein trong mẫu nguyên liệu, chitin, chitosan, chitosan lactate [Trung và cộng sự, 2020]

Tiến hành: Ngâm 5 g mẫu trong dung dịch NaOH 4% với tỷ lệ 1: 10 (w/v) sau đó ủ ở 95°C trong 6 h. Sau khi ủ, phần bã và phần dịch lỏng được tách riêng bằng lọc chân không, dùng nước cất rửa sạch phần bã. Thu toàn bộ phần dịch và phần nước rửa làm đầy đến 100 mL. Sau khi trộn đều, tiến hành lấy khoảng 10 mL dung dịch và lọc qua giấy lọc Whatman No1. Dung dịch sau lọc được xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Biuret với chất chuẩn là BSA, pha loãng sao cho nồng độ protein nằm trong khoảng 0,2 – 10 g/L. Hàm lượng protein trong mẫu ban đầu được xác định bằng công thức:

$$\text{Protein}(\%) = \frac{V \times C \times 100}{m \times \left(\frac{100 - W}{100} \right) \times 1000}$$

Trong đó: V: Tổng thể tích dịch lọc (mL). C: Nồng độ protein trong dịch lọc (mg/mL), được suy ra từ phương trình đường chuẩn có dạng $y = 18036x - 103,3$ ($R^2 = 0,9998$) với chất chuẩn BSA và kết quả đo mật độ quang của dịch lọc ở bước sóng 545 nm. m: Khối lượng mẫu ban đầu (g); W: Hàm ẩm của mẫu (g); 1000: hệ số chuyển đổi từ đơn vị (mg) sang (g).

1.2.2. Xác định hàm lượng protein trong mẫu sinh khối vi tảo [Dorsey và cộng sự, 1978]

Tiến hành: Ngâm 1g sinh khối vi tảo trong NaOH 4% với tỉ lệ 1:10 (w/v). Hỗn hợp được ủ trong bể ổn nhiệt ở 95°C trong 6 giờ. Sau khi ủ, lọc lấy dịch bằng máy lọc chân không qua giấy lọc thủy tinh, dùng nước cất rửa sạch phần bã. Thu toàn bộ phần dịch lọc định mức lên 25 ml. Phần dịch chiết sau thu được phân tích protein bằng phương pháp biuret đo độ hấp phụ ở bước sóng 570 nm.

Hàm lượng protein trong mẫu ban đầu được xác định bằng công thức:

$$\text{Protein}(\%) = \frac{V \times C \times 100}{m \times \left(\frac{100 - W}{100} \right) \times 1000}$$

Trong đó, V: tổng thể tích dịch lọc (mL). C: nồng độ protein trong dịch lọc (mg/mL), được suy ra từ phương trình đường chuẩn có dạng $y = 0,0535x + 0,0015$ ($R^2 = 0,9993$) với chất chuẩn BSA và kết quả đo mật độ quang của dịch lọc ở bước sóng 570nm; m: khối lượng mẫu ban đầu (g); w: hàm ẩm của mẫu (g); 1000: hệ số chuyển đổi từ đơn vị (mg) sang (g).

B. Phương pháp Micro-Biuret

Nguyên lý: Trong môi trường kiềm, liên kết peptide của phân tử protein phản ứng với thuốc thử biuret tạo ra phức chất màu tím hoặc xanh tím. Cường độ màu của dung dịch phản ánh hàm lượng protein có trong mẫu.

Hóa chất: Bovine serum albumin (BSA) chuẩn, dung dịch NaOH 3%.

Thuốc thử Micro-Biuret: Hòa tan 173g sodium citrate và 100g sodium carbonate trong nước ấm (nhiệt độ $<100^\circ\text{C}$) để được dung dịch A. Hòa tan 17,3g đồng sulphate trong 100mL nước để được dung dịch B. Trộn hai dung dịch lại với nhau và định mức đến thể tích 1000mL bằng nước cất.

Tiến hành: Trộn đều 1g chitin, chitosan với 10mL dung dịch NaOH 3%, sau đó gia nhiệt lên 80°C trong 12h, làm nguội hỗn hợp đến nhiệt độ phòng và tiến hành lọc để thu dịch lọc. Dịch lọc sau đó được ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 5000 rpm, gạn lấy phần dịch nổi và pha loãng sao cho nồng độ protein nằm trong khoảng 0,05 – 0,5 g/L. Lấy 4 mL trộn đều với 200 μL thuốc thử Micro-Biuret và đo mật độ quang ở bước sóng 330nm. Hàm lượng protein trong mẫu ban đầu xác định bằng công thức:

$$\text{Protein (\%)} = \frac{V \times C \times 100}{m \times \left(\frac{100-W}{100} \right) \times 1000}$$

Trong đó, V: tổng thể tích dịch lọc (mL); C: nồng độ protein trong dịch lọc (mg/mL), được suy ra từ phương trình đường chuẩn có dạng $y = 0,3174x - 0,027$ ($R^2 = 0,9983$) với chất chuẩn BSA và kết quả đo mật độ quang của dịch lọc ở bước sóng 330 nm; m: khối lượng mẫu ban đầu (g); W: hàm ẩm của mẫu (g); 1000: hệ số chuyển đổi từ đơn vị từ (mg) sang (g).

Phụ lục 1.3. Xác định hàm lượng chitin trong vỏ tôm lột xác [Black và Schwartz, 1950]

Nguyên lý: Tính khối lượng không đổi của chitin có trong mẫu sau khi được tách chiết loại khoáng bằng axit và loại protein bằng kiềm.

Tiến hành: Cân 5g xác vỏ tôm cho vào cốc 250 ml, bổ sung 50 ml HCl 1N và đun nóng trong bể ổn nhiệt (95°C) trong 1 giờ. Sau đó lọc bã qua mảnh vải lanh, rửa cốc chiết và bã lọc bằng nước sôi cho đến khi nước rửa không còn axit (pH~7). Phần bã trên

vải lọc sau khi rửa về trung tính, được vắt ráo và chuyển vào cốc khác, bổ sung 50 ml NaOH 5% (w/v) và đun nóng trong bể ổn nhiệt (95°C) trong 1 giờ. Tiếp tục lọc và rửa bã bằng nước sôi, cuối cùng rửa 2 lần với khoảng 15ml acetone.

Đưa bã sau khi vắt ráo vào cốc sứ và tiến hành sấy ở 110°C đến khi khối lượng không đổi. Làm nguội cốc và cân để xác định khối lượng của chitin thu được bằng công thức:

$$W(\%) = \frac{m_2 - m_1}{m \left(\frac{100 - W}{100} \right)} \times 100$$

Trong đó, m: khối lượng mẫu phân tích (g); m_1 : khối lượng cốc sấy không đổi (g); m_2 : khối lượng cốc + bã mẫu sau khi tách chiết với khối lượng không đổi (g); w: hàm lượng ẩm của mẫu (g).

Phụ lục 1.4. Xác định hàm carotenoid trong vỏ tôm [Sachindra và cộng sự, 2006]

Nguyên lý: Carotenoid trong mẫu (nghiền nhỏ) được tách chiết bằng hỗn hợp dung môi hexan và isopropanol và được định lượng bằng quang phổ ở bước sóng 468 nm.

Tiến hành: Cân chính xác 1g mẫu cho vào ống đồng thể hóa (hay cốc thủy tinh). Thêm 5mL dung môi chứa hexan và isopropanol với tỷ lệ 3:2. Đồng thể hóa trong 2 phút, để yên 30 phút, sau đó tiến hành lọc qua giấy lọc Whatman No.1. và tách chiết 3 lần. Dịch chiết được đựng trong bình chiết và bổ sung thêm nước muối sinh lý với tỷ lệ 1:2. Lắc nhẹ bình chiết và để yên trong 10 phút ở nhiệt độ phòng cho tách pha hoàn toàn. Tách bỏ pha dưới, lấy pha hexan bên trên. Sau đó, rửa pha hexan bằng nước muối sinh lý. Cô quay chân không ở 40°C để bay hơi hexan. Hòa tan mẫu với ete dầu mỏ và định mức lên 10mL. Sau đó, tiến hành pha loãng mẫu (nếu cần) và đo độ hấp thụ của dung dịch ở 468 nm (A_{468}), dùng ete dầu mỏ làm dung dịch so sánh. Hàm lượng carotenoid tính theo công thức của Saito và Regier (1971):

$$C \left(\frac{\mu g}{g} \right) = \frac{A * D * V}{0,2 * m}$$

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

Phụ lục 1.5. Xác định hàm lượng lipid trong vỏ lột xác, sinh khối vi tảo [Bligh và Dyer, 1959]

Nguyên tắc: Thủy phân các hợp chất bằng chloroform ($CHCl_3$) ở môi trường có cồn (CH_3OH), giải phóng lipid.

Tiến hành chiết lipid từ mẫu và tinh sạch:

Cân 2 – 5g mẫu, cho vào ống 20 ml (ống thủy tinh có nắp). Bổ sung 5 ml methanol và 2,5 ml chloroform. Hỗn hợp được đồng hóa kỹ bằng máy vortex trong 2 phút và ngâm 2 giờ. Tiếp tục thêm 2,5 ml chloroform vào dung dịch và vortex kỹ, thêm 2,5 ml nước cất và vortex.

Hỗn hợp được lọc qua bình chân không với giấy lọc Whatman số 1, rửa giấy lọc bằng 2,5 ml chloroform và thu vào dịch lọc. Dịch lọc được chuyển sang phễu chiết 50 ml, để yên khoảng 5 phút đến khi được phân thành 2 lớp. Chiết rút để thu hồi lớp dưới và loại bỏ lớp trên. Dịch chiết được định lượng (V_{dm}) bằng cách bổ sung chloroform trong bình định mức. Sau đó, lấy 1 ml dịch chiết cho vào tube (với trọng lượng không đổi) làm khô bằng cách thổi khí nitơ, sau đó sấy chân không ở 40°C đến khối lượng không đổi. Lipid tổng số được tính theo công thức:

$$\text{Lipid (\%)} = \frac{V_{dm} (m_1 - m_0)}{V_m \times M \times \left(\frac{100-w}{100}\right)} \times 100$$

Trong đó, m_1 : trọng lượng cân ống tube và mẫu sau sấy (g), m_0 : trọng lượng cân ống tube khối lượng không đổi (g), M : trọng lượng cân mẫu (g); V_{dm} : thể tích định mức sau xử lý (ml); V_m : thể tích mẫu sau xử lý lấy để sấy (ml); w : độ ẩm của mẫu phân tích (%).

Phụ lục 1.6. Xác định độ deacetyl của chitosan [Wu và Zivanovic, 2008]

Nguyên lý:

Thủy phân chitosan trong môi trường H_3PO_4 đậm đặc để thu được các đơn phân N-acetyl glucosamine và D-glucosamine. Xác định độ hấp thụ quang học của các gốc N-acetyl glucosamine trong dịch thủy phân ở 203 nm để tính ra hàm lượng N-acetyl glucosamine dựa vào đường chuẩn. Từ kết quả xác định hàm lượng N-acetyl glucosamine để tính độ deacetyl của chitosan.

Tiến hành:

Xây dựng đường chuẩn N-acetyl Glucosamine (GlcNAc) trong H_3PO_4 85% ở các dung dịch có nồng độ từ 0, 10, 20, 30, 40 và 50 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành đo UV ở bước sóng 203 nm để xác định đường chuẩn. Dựa vào OD chúng ta lập được đường chuẩn GlcNAc dạng $y = ax + b$. Sau khi lập được đường chuẩn, ta tính hàm lượng GluNAc trong mẫu rồi từ đó tính ra giá trị degree of acetyl (DA) của mẫu.

Chuẩn bị mẫu xác định hàm lượng N-Acetyl Glucosamine: Hòa tan 100 mg chitosan trong 20 mL H_3PO_4 (85%) ở 60°C trong 40 phút. Hỗn hợp trên được pha loãng với nước cất 100 lần và giữ ở 60°C trong 2 giờ. Sau khi hòa tan hoàn toàn, mẫu được

làm lạnh về nhiệt độ phòng và xác định độ hấp phụ ở bước sóng 203 nm trên máy đo quang phổ DR 6000. Độ acetyl (DA) và độ deacetyl (DD) được tính dựa vào lượng GLcNAc của đường chuẩn $y = 0,0334x + 0,0652$ ($R^2 = 0,9994$) và xác định theo công thức:

$$DA (\%) = \frac{\frac{m_1}{203,21} \times 100}{\frac{m_1}{203,21} + \frac{m_2}{161,17}}$$

$$DD (\%) = 100 - DA$$

Trong đó, m_1 : Khối lượng Acetyl-Glucosamine trong 1 ml dung dịch chitosan, được tính từ đường chuẩn tại bước sóng 203 nm, m_2 : khối lượng của Glucosamine trong 1ml dung dịch chitosan, được tính $m_2 = M - m_1$; M : Khối lượng chitosan trong 1 ml dung dịch, được tính $M = (M1 \times M3) / (M1 + M2)$, trong đó: $M1$ là khối lượng của mẫu chitosan rắn khô tuyệt đối lấy phân tích, $M2$ là khối lượng của 20 ml H_3PO_4 85% và $M3$ là khối lượng của 1 ml chitosan dung dịch trong H_3PO_4 đậm đặc. Các hệ số 203,21 và 161,17 là hệ số chuyển đổi từ đơn vị mol/mL sang đơn vị mg/mL và ngược lại của N-acetyl glucosamine và D-glucosamine.

Phụ lục 1.7. Xác định khối lượng phân tử trung bình của chitosan [Zhang và Neau, 2001]

Nguyên lý: Khối lượng phân tử chitosan và chitosan hòa tan trong nước (M_w) được xác định bằng phương pháp nội suy từ độ nhớt nội của dung dịch chitosan trên thiết bị nhớt kế mao quản Ubbelohde.

Tiến hành:

- Hóa chất: dung môi CH_3COOH 0,2M/ CH_3COONa 0,1M.
- Chuẩn bị mẫu: Hòa tan 100 mg mẫu chitosan trong 100 mL dung môi CH_3COOH 0,2M/ CH_3COONa 0,1M với nồng độ dung dịch chitosan là 1 mg/mL (dung dịch gốc). Sau đó pha loãng dung dịch chitosan thành các nồng độ như bảng sau:

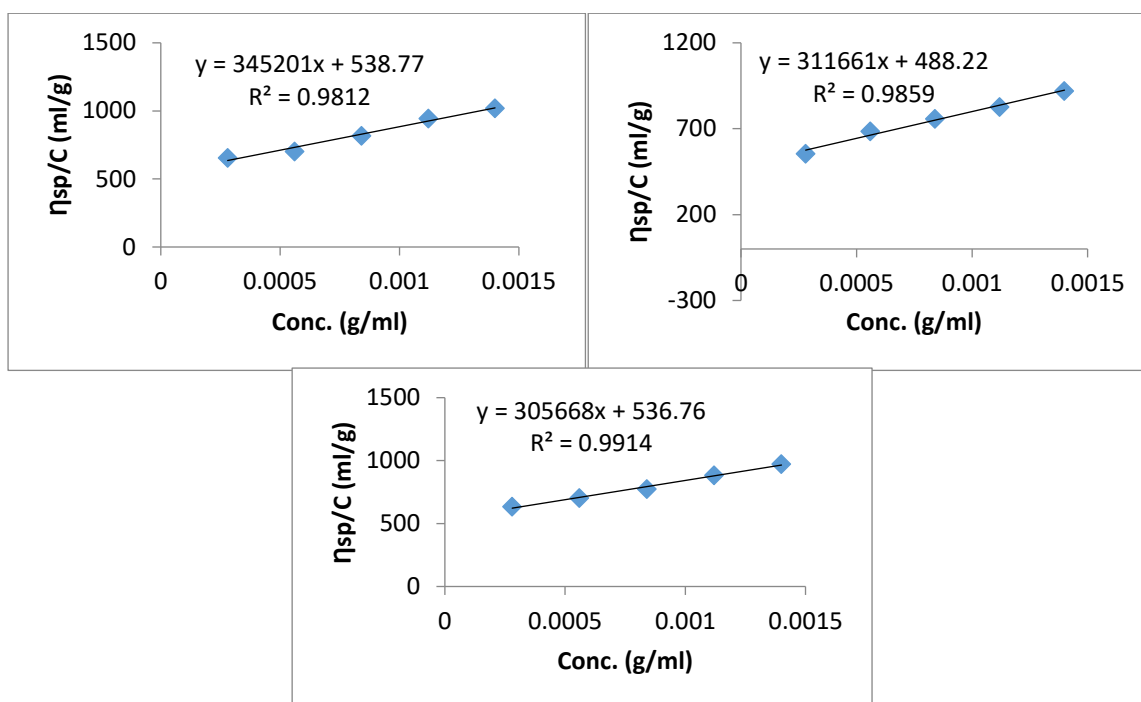
Ký hiệu	Nồng độ chitosan (mg/mL)
C0	0
C1	0,28
C2	0,56
C3	0,84
C4	1,12
C5	1,4

Xác định thời gian chảy và độ nhớt nội của dung dịch được xác định bằng nhớt kế Ubbelohde 513 Io/13 (đường kính 0,2 mm) ở $30 \pm 5^\circ\text{C}$. Từ giá trị đo được của các mẫu dung dịch chitosan, lập mối tương quan giữa độ nhớt nội, thời gian chảy và nồng độ chitosan và xác định phương trình tương quan hồi quy $y = ax + b$. Dựa vào phương trình tương quan để tính độ nhớt tương đối (η_{sp}) và suy ra được độ nhớt nội $[\eta]$ của dung dịch chitosan theo công thức:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_{\text{dung dịch}} - \eta_{\text{dung môi}}}{\eta_{\text{dung môi}}}$$

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right)$$

Sample	Symbol sample	Conc. (mg/ml)	Conc. (g/ml)	times (sec)	η_r	η_{sp}	η_{sp}/C (ml/g)
CTS 1	C0	0	0	30,393	1	0	0
	C1	0,28	0,00028	35,983	1,183924	0,18392393	656,871178
	C2	0,56	0,00056	42,373	1,39417	0,39416971	703,8744824
	C3	0,84	0,00084	51,277	1,687132	0,68713191	818,0141731
	C4	1,12	0,00112	62,583	2,059125	1,05912546	945,647729
	C5	1,4	0,0014	73,763	2,426973	1,42697332	1019,266654
CTS 2	C0	0	0	30,393	1	0	0
	C1	0,28	0,00028	35,125	1,155694	0,15569375	556,0490903
	C2	0,56	0,00056	42,073	1,384299	0,38429902	686,2482433
	C3	0,84	0,00084	49,75	1,63689	0,63689007	758,2024683
	C4	1,12	0,00112	58,583	1,927516	0,9275162	828,1394682
	C5	1,4	0,0014	69,6	2,290001	1,29000099	921,4292765
CTS 3	C0	0	0	30,393	1	0	0
	C1	0,28	0,00028	35,791	1,177607	0,17760669	634,309592
	C2	0,56	0,00056	42,373	1,39417	0,39416971	703,8744824
	C3	0,84	0,00084	50,142	1,649788	0,64978778	773,556881
	C4	1,12	0,00112	60,463	1,989373	0,98937255	883,3683508
	C5	1,4	0,0014	71,773	2,361498	1,36149771	972,4983666



Sample	η	DD	K	a	Log[η]	Log[K]	a*Log[M _w]	Log[M _w]	M _w (Dal)	M _w (Kdal)
CTS 1	538,77	90	0,0038	0,9020	2,7314	(2,4258)	5,1572	5,7175	521.768	521,77
CTS 2	488,22	91	0,0044	0,8918	2,6886	(2,3586)	5,0472	5,6596	456.621	456,62
CTS 3	536,76	87,2	0,0024	0,9306	2,7298	(2,6179)	5,3477	5,7468	558.162	558,16

Dựa vào giá trị độ nhớt nội $[\eta]$ để tính M_w theo công thức Mark–Houwink:

$$[\eta] = K \times M_w^a$$

Trong đó, $[\eta]$: Độ nhớt nội của chitosan; M_w : Khối lượng phân tử trung bình của chitosan; hệ số K và a được tính: $K = 1,64 \times 10^{-30} \times DD^{14}$ và $a = -1,02 \times 10^{-2} \times DD + 1,82$ (DD là độ deacetyl của chitosan).

Phụ lục 1.8. Xác định độ hòa tan của chitosan, chitosan lactate [Minh và cộng sự, 2019]

Độ hòa tan của chitosan được xác định theo phương pháp được Samar và cộng sự, có điều chỉnh. Cân chính xác 1g chitosan cho vào 100mL acid acetic 1%, hoặc 1g chitosan lactate hòa tan trong 100mL nước cất; khuấy đều trong 60 phút để chitosan tan hoàn toàn, sau đó tiến hành lọc qua giấy lọc Whatman No1, phần không tan trên giấy lọc được rửa nhiều lần bằng nước cất, để ráo, và sấy ở 105°C đến khối lượng không đổi. Độ hòa tan (X) của chitosan được xác định theo công thức:

$$X(\%) = 100 - \left(\frac{A - B}{m} \times 100 \right)$$

Trong đó: m: Khối lượng chitosan khô tuyệt đối (g); A: Khối lượng phần không tan cùng với giấy lọc sau sấy (g); B: Khối lượng giấy lọc trước khi lọc, đã sấy đến khối

Phụ lục 1.9. Xác định độ trương nở của chitosan [Minh và cộng sự, 2017]

Chitosan được trương nở trong dung môi thích hợp, khối lượng mẫu sau trương nở được xác định và tính toán để suy ra độ trương nở trong dung môi.

Tiến hành: Cân 5 gam chitosan và cho ngâm vào dung môi phù hợp với tỷ lệ 1/10 (w/v) trong thời gian nhất định.

Sau quá trình ngâm, hỗn hợp chitosan và dung môi được ly tâm với tốc độ 5000 rpm/15 phút để thu hồi và xác định khối lượng phần rắn sau ngâm, theo công thức:

$$SD(\%) = \left(\frac{m_2 \times 100}{m_1} \right)$$

Trong đó: SD: độ trương nở; m₁ (trọng lượng khô tuyệt đối) và m₂ là khối lượng chitosan trước và sau khi ngâm trương nở.

Phụ lục 1.10. Xác định hàm lượng carbohydrate trong sinh khối vi tảo [Nielsen, 2010]

Nguyên tắc: Axit sulfuric phá vỡ polysaccharides, oligosaccharides và disaccharides thành monosaccharide. Các monosaccharide này sau đó phản ứng với phenol để tạo thành một phức chất có màu vàng cam. Thông qua đường chuẩn carbohydrate, ta có thể xác định được hàm lượng carbohydrate.

Xây dựng đường chuẩn: Chuẩn bị 10 ml dung dịch đường glucose có nồng độ gốc là 10 mg/ml bằng cách cân 100 mg glucose, hòa tan và định mức đến 10 ml bằng nước cất. Sau đó pha loãng dung dịch gốc bằng nước cất để được các dung dịch trong khoảng nồng độ từ 0 – 0,5 mg/ml. Cho phản ứng 1 ml dịch glucose với 3 ml axit H₂SO₄ đậm đặc và 0,6 ml phenol 5%, lắc kỹ bằng vortex và ủ ở nhiệt độ 90°C trong 5 phút. Dung dịch được để nguội và đo mật độ quang học ở bước sóng 490 nm.

Tiến hành:

Ngâm 1 g sinh khối vi tảo trong 1 ml H₂SO₄ 72% ở 30°C trong 1 giờ. Sau đó bổ sung 28 ml nước cất, lắc đều và giữ trong 1 giờ ở 120°C. Mẫu được làm nguội và lọc qua bộ lọc hút chân không, dùng nước cất rửa sạch bã trên giấy lọc. Thu toàn bộ phần dịch lọc và định mức lên 50ml và tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 490 nm. Xác định hàm lượng carbohydrate bằng công thức:

$$\text{Carbohydrate (\%)} = \frac{V \times C \times 100}{m \times \left(\frac{100-w}{100} \right) \times 1000}$$

Trong đó, V: tổng thể tích dịch lọc thu được (ml); m: khối lượng mẫu phân tích (g); w: hàm lượng ẩm của mẫu (%); C: hàm lượng carbohydrate trong 1 ml dịch lọc (mg/ml) suy ra từ đường chuẩn được xây dựng ở dạng $y = 5,978x - 0,073$ ($R^2 = 9,9962$), độ hấp thụ quang học ở bước sóng 490 nm; 1000 là hệ số chuyển đổi từ đơn vị (mg) sang (g).

Phụ lục 1.11. Xác định hàm lượng chlorophyll-a và carotenoids trong sinh khối vi tảo [Sumanta và cộng sự, 2014]

Nguyên tắc: Chlorophyll-a, b,c và carotenoid là các sắc tố cần thiết cho quá trình quang hợp và hàm lượng chứa trong thực vật tùy thuộc vào từng loài. Sự biến đổi sắc tố là (diệp lục và carotenoid) và mối quan hệ của nó có thể do các yếu tố bên trong và điều kiện môi trường. Sử dụng metanol là dung môi để chiết xuất các sắc tố từ thực vật là tốt nhất (đặc biệt là vi tảo), tuy nhiên nó rất độc hại nên cẩn thận trong quá trình chiết. Riêng đối với mẫu sinh khối vi tảo *Nannochloopsis sp.* đã được nhiều tài liệu minh chứng cho thấy chứa chủ yếu hàm lượng chlorophyll-a và carotenoids. Chlorophylls có độ hấp thụ cực đại tại hai bước sóng 652, 665 nm và carotenoid tổng số có độ hấp thụ cực đại tại bước sóng 470 nm. Độ hấp thụ ở bước sóng này biểu thị cho cường độ của sắc tố tương ứng hay hàm lượng sắc tố đó có trong dung dịch chiết.

Tiến hành:

Cân 0,5g sinh khối vi tảo, bổ sung 10 ml dung môi methanol và đồng hóa mẫu trong 5 phút. Sau đó, dịch chiết được thu bằng cách thiết bị ly tâm lạnh (4°C) ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút. Gạn bỏ cặn để thu mẫu dịch chiết, đo độ hấp thụ của mẫu ở các bước sóng 470, 652, 665 nm bằng máy đo quang phổ tử ngoại khả kiến DR6000. Hàm lượng chlorophyll-a và carotenoids tổng số có trong dịch chiết được xác định bởi công thức:

$$Ca = 16,72A_{665} - 9,16A_{652}$$

$$Cb = 34,09A_{652} - 15,28A_{665}$$

$$Cx+c = (1000A_{470} - 1,63Ca - 104,96Cb)/221$$

Trong đó, A: độ hấp thụ quang ở các bước sóng 470, 652, 665 nm; Ca: hàm lượng chlorophyll-a có trong 1 ml dịch chiết (µg/ml); Cb: hàm lượng chlorophyll-b có trong 1 ml dịch chiết (µg/ml); Cx+c: hàm lượng carotenoid có trong 1ml dịch chiết (µg/ml). Hàm lượng tổng số của các chất (X) được tính toán trên lượng chất khô của mẫu phân tích, được tính theo công thức chung:

$$X (\mu\text{g/g}) = \frac{C \times V \times F}{m \times \left(\frac{100-w}{100}\right)}$$

Trong đó, X ($\mu\text{g/g}$): hàm lượng chlorophyll-a hoặc chlorophyll-b hoặc carotenoid được xác định tương ứng các hàm lượng ($\mu\text{g/ml}$) của Ca, Cb, Cx+c; V: tổng thể tích dịch chiết thu được; F: hệ số pha loãng dịch chiết; m: khối lượng mẫu phân tích; w: hàm lượng ẩm của mẫu.

Phụ lục 1.12. Xác định mật độ tế bào vi tảo bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer improved

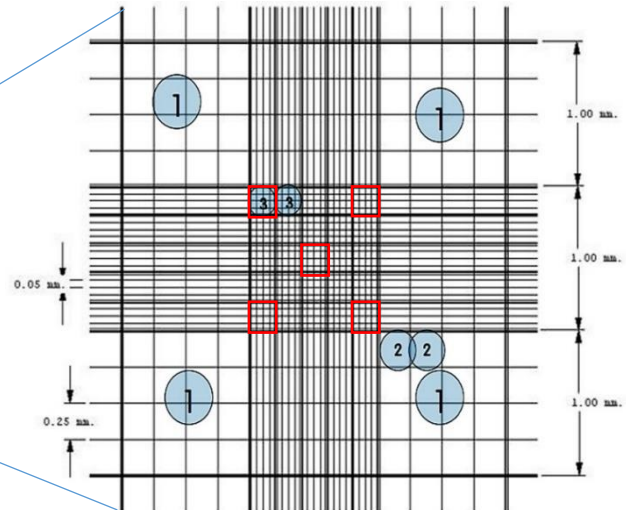
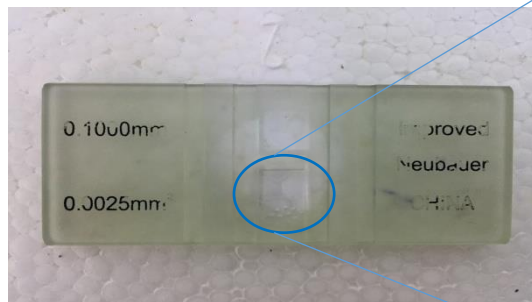
Nguyên lý: Sử dụng buồng đếm hồng cầu Neubauer để xác định mật độ tế bào các loài vi tảo đơn bào, có kích thước trong khoảng 2 – 30 μm và nồng độ tế bào trong khoảng $10^4 - 10^7$ tế bào/ml. Buồng đếm Neubauer's Hemacytometer (Hình PL1) là một tấm thủy tinh trong, dày, hình chữ nhật, chia làm 3 khoảng, khoảng giữa chia thành 2 khoảng nhỏ có kẻ ô đếm dưới kính hiển vi, với tổng 400 ô vuông nhỏ (16 x 25). Phần giữa lõm có độ sâu tính từ tấm kính đáy đến mặt buồng đếm là 0,1 mm, có kẻ hai khung đếm và chia thành 9 ô vuông lớn (số 1), mỗi ô có diện tích 1 mm^2 . Ô chính giữa khung đếm được chia thành 25 ô vuông trung bình (số 2), mỗi ô trung bình lại được chia thành 16 ô vuông rất nhỏ (số 3) có diện tích 0,0025 mm^2 và độ sâu buồng đếm là 0,1 mm.

Phương pháp lấy mẫu: Dùng pipet lấy mỗi mẫu 1 ml dung dịch vi tảo cần xác định mật độ cho vào ống ly tâm Eppendorf 1,5 ml và được cố định bằng Neutral Lugol đậm đặc (trung tính) với 1 giọt/1ml mẫu và vortex mẫu thật kỹ.

Chuẩn bị mẫu đếm: Lắc đều mẫu trước khi lấy khoảng 30 giây, pha loãng mẫu cần đếm (nếu cần) sao cho trong mỗi ô của buồng đếm có khoảng 5 – 10 tế bào, đẩy tấm lamên lên khoảng giữa khu vực có ô đếm. Dùng micropipet hút 10 μl mẫu dịch cần đếm và nhỏ vào khe của buồng đếm, theo cơ chế mao dẫn thì mẫu sẽ được dẫn lan đều khắp ô đếm. Để yên khoảng 3 – 5 phút để tế bào vi tảo lắng xuống, rồi đặt buồng đếm lên kính hiển vi. Tìm buồng đếm bằng vật kính 10x và đếm tế bào bằng vật kính 40x, mỗi mẫu tảo đếm 3 lần.

Quy tắc đếm: Tại ô trung tâm của buồng đếm, chọn 5 vị trí ô trung bình (số 2) có viền màu đỏ (gồm 16 ô nhỏ số 3) và đếm theo đường ziczac từ trái sang phải và từ trên xuống dưới. Tiến hành đếm tất cả các tế bào vi tảo trong 16 ô vuông nhỏ. Chọn đếm các tế bào nằm trên đường phân cách ở trên và bên trái, còn các tế bào dính trên đường bên phải và ở dưới thì không đếm. Đếm 2 lần nếu kết quả đếm có sự chênh lệch lớn thì đếm lần thứ 3 để lấy kết quả trung bình. Đếm một hàng và ghi số liệu một lần, đếm càng nhiều ô thì độ chính xác càng cao. Lưu ý: Loại lần đếm nếu có sự chênh lệch giữa mỗi khu đếm quá 10 tế bào (cần trải đều mẫu ở các ô). Nếu số lượng tế bào trong một ô ít

thì nên đếm toàn bộ các ô có viền đỏ ở 4 góc và cả ô trung tâm nhằm tăng độ chính xác của mẫu đếm.



Hình PL1. Cấu tạo buồng đếm Neubauer improved (China).

Công thức tính mật độ tế bào (tb/ml) vi tảo được tính theo công thức:

$$N = A \times 10^4$$

Trong đó, N: mật độ tế bào đếm được trong 1ml dịch vi tảo; A: số lượng tế bào vi tảo trung bình đếm được của các ô; 10^4 : hệ số quy đổi giá trị thể tích của buồng đếm.

Phụ lục 2. PHỤ LỤC SỐ LIỆU

Phụ lục 2.1.	Ảnh hưởng của độ tuổi tôm đến kích cỡ tôm, sản lượng vỏ lột xác thu hồi, tỷ lệ vỏ đầu/khối lượng vỏ thu được và chiều dài vỏ đầu của tôm.
Phụ lục 2.2	Ảnh hưởng của độ tuổi tôm đến thành phần hóa học của vỏ lột xác.
Phụ lục 2.3.	Ảnh hưởng của độ tuổi tôm đến hiệu suất thu hồi, hàm lượng khoáng và protein còn lại của chitin từ vỏ lột xác.
Phụ lục 2.4.	Ảnh hưởng của nồng độ HCl, nhiệt độ, thời gian khử khoáng và trạng thái nguyên liệu khô đến hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô và hiệu suất thu hồi chitin thô.
Phụ lục 2.5.	Ảnh hưởng của nồng độ HCl, nhiệt độ, thời gian khử khoáng và trạng thái nguyên liệu ướt đến hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô và hiệu suất thu hồi chitin thô.
Phụ lục 2.6.	Ảnh hưởng của nồng độ NaOH, nhiệt độ, thời gian khử protein và trạng thái nguyên liệu khô đến hàm lượng protein còn lại trong chitin tinh sạch và hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch.
Phụ lục 2.7.	Ảnh hưởng của nồng độ NaOH, nhiệt độ, thời gian khử protein và trạng thái nguyên liệu ướt đến hàm lượng protein còn lại trong chitin tinh sạch và hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch.
Phụ lục 2.8.	Ảnh hưởng của điều kiện sản xuất chitosan (nhiệt độ, thời gian xử lý) đến độ deacetyl, độ tan, độ nhớt và hiệu suất thu hồi chitosan, hàm lượng khoáng và protein còn lại.
Phụ lục 2.9.	Ảnh hưởng của nồng độ ethanol của hỗn hợp dung môi ethanol/nước đến độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate.
Phụ lục 2.10.	Ảnh hưởng của thời gian ngâm chitosan đến độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate.
Phụ lục 2.11.	Ảnh hưởng của nồng độ acid phản ứng đến độ hòa tan, hiệu suất thu hồi chitosan lactate.
Phụ lục 2.12.	Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến độ hòa tan, hiệu suất thu hồi chitosan lactate.

- Phụ lục 2.13.** Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate sử dụng đến hiệu suất lắng theo thời gian thu hoạch.
- Phụ lục 2.14.** Ảnh hưởng của phương pháp kết hợp sử dụng chitosan lactate và điều chỉnh pH đến hiệu suất lắng theo thời gian thu hoạch.
- Phụ lục 2.15.** Ảnh hưởng của loại muối chitosan lactate đến hiệu suất lắng vi tảo.
- Phụ lục 2.16.** Ảnh hưởng của phương pháp thu vi tảo *Nannochloropsis* sp. đến hiệu suất lắng và hiệu suất thu hồi chlorophyll-a và carotenoids
-

Phụ lục 2.1. Ảnh hưởng của độ tuổi tôm đến kích cỡ tôm, sản lượng vỏ lột xác thu hồi, tỷ lệ vỏ đầu/khối lượng vỏ thu được và chiều dài vỏ đầu của tôm.

Độ tuổi (ngày)	Kích cỡ tôm (con/kg)	Sản lượng vỏ (kg/ao/ngày)	Tỷ lệ vỏ đầu/khối lượng vỏ (%)	Chiều dài vỏ đầu (cm)
41 - 50	387 ± 49	1,9 ± 0,5	97,1 ± 0,3	2,8 ± 0,2
51 - 60	247 ± 37	3,7 ± 0,6	91,1 ± 0,3	3,5 ± 0,1
61 - 70	123 ± 16	5,2 ± 0,3	82,7 ± 0,8	4,1 ± 0,3
71 - 80	88 ± 11	7,2 ± 0,9	77,6 ± 1,2	4,8 ± 0,1
81 - 90	56 ± 3	7,5 ± 0,3	76,1 ± 0,7	5,5 ± 0,1
> 90	41 ± 3	8,3 ± 0,2	75,3 ± 0,7	6,1 ± 0,1

Descriptives

Chỉ tiêu	Độ tuổi (ngày)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
Kích cỡ tôm (con/kg)	41 - 50	3	386.67	60.28	34.80	236.93	536.40	330.00	450.00
	51 - 60	3	247.33	45.18	26.09	135.10	359.57	200.00	290.00
	61 - 70	3	123.33	20.21	11.67	73.14	173.53	105.00	145.00
	71 - 80	3	88.00	13.11	7.57	55.42	120.58	74.00	100.00
	81 - 90	3	56.00	4.00	2.31	46.06	65.94	52.00	60.00
	> 90	3	41.00	3.61	2.08	32.04	49.96	38.00	45.00
	Total	18	157.06	129.24	30.46	92.79	221.32	38.00	450.00
Sản lượng vỏ (kg/ao/ngày)	41 - 50	3	1.89	0.66	0.38	0.26	3.53	1.35	2.62
	51 - 60	3	3.72	0.70	0.40	1.99	5.45	2.97	4.35
	61 - 70	3	5.19	0.33	0.19	4.38	6.00	4.82	5.43
	71 - 80	3	7.23	1.05	0.61	4.62	9.83	6.04	8.03
	81 - 90	3	7.54	0.52	0.30	6.26	8.82	7.01	8.03
	> 90	3	8.30	0.38	0.22	7.36	9.24	7.95	8.70
	Total	18	5.64	2.41	0.57	4.45	6.84	1.35	8.70
Tỷ lệ vỏ đầu/khối lượng vỏ (%)	41 - 50	3	97.07	0.40	0.23	96.06	98.07	96.70	97.50
	51 - 60	3	91.10	0.36	0.21	90.20	92.00	90.80	91.50
	61 - 70	3	82.70	0.95	0.55	80.33	85.07	81.80	83.70
	71 - 80	3	77.57	1.48	0.86	73.88	81.25	76.30	79.20
	81 - 90	3	76.07	0.87	0.50	73.90	78.24	75.10	76.80
	> 90	3	75.30	0.92	0.53	73.02	77.58	74.30	76.10
	Total	18	83.30	8.44	1.99	79.10	87.50	74.30	97.50
Chiều dài vỏ đầu (cm)	41 - 50	3	2.84	0.21	0.12	2.32	3.36	2.61	3.00
	51 - 60	3	3.53	0.11	0.06	3.26	3.80	3.40	3.61
	61 - 70	3	4.15	0.31	0.18	3.38	4.91	3.80	4.40
	71 - 80	3	4.79	0.18	0.11	4.34	5.25	4.67	5.00
	81 - 90	3	5.51	0.10	0.05	5.27	5.74	5.41	5.60
	> 90	3	6.12	0.07	0.04	5.96	6.28	6.06	6.19
	Total	18	4.49	1.17	0.27	3.91	5.07	2.61	6.19

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kích cỡ tôm (con/kg)	Between Groups	271,374.94	5	54,274.99	51.82	0.00
	Within Groups	12,568.00	12	1,047.33		
	Total	283,942.94	17			
Sản lượng vỏ (kg/ao/ngày)	Between Groups	93.40	5	18.68	44.27	0.00
	Within Groups	5.06	12	0.42		
	Total	98.47	17			
Tỷ lệ vỏ đầu/khối lượng vỏ (%)	Between Groups	1,199.74	5	239.95	287.36	0.00
	Within Groups	10.02	12	0.84		
	Total	1,209.76	17			
Chiều dài vỏ đầu (cm)	Between Groups	22.69	5.00	4.54	138.02	0.00
	Within Groups	0.39	12.00	0.03		
	Total	23.08	17.00			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Kích cỡ tôm (con/kg)		Subset for alpha = 0.05			
Độ tuổi (ngày)	N	1	2	3	4
> 90	3	41.00			
81 - 90	3	56.00			
71 - 80	3	88.00	88.00		

61 - 70	3		123.33		
51 - 60	3			247.33	
41 - 50	3				386.67
Sig.		.12	.21	1.00	1.00
Sản lượng vỏ (kg/ao/ngày)		Subset for alpha = 0.05			
Độ tuổi (ngày)	N	1	2	3	4
41 - 50	3	1.89			
51 - 60	3		3.72		
61 - 70	3			5.19	
71 - 80	3				7.23
81 - 90	3				7.54
> 90	3				8.30
Sig.		1.00	1.00	1.00	.08

Tỷ lệ vỏ đầu/khối lượng vỏ (%)		Subset for alpha = 0.05				
Độ tuổi (ngày)	N	1	2	3	4	5
> 90	3	75.30				
81 - 90	3	76.07	76.07			
71 - 80	3		77.57			
61 - 70	3			82.70		
51 - 60	3				91.10	
41 - 50	3					97.07
Sig.		.32	.07	1.00	1.00	1.00

Chiều dài vỏ đầu (cm)		Subset for alpha = 0.05					
Độ tuổi (ngày)	N	1	2	3	4	5	6
41 - 50	3	2.84					
51 - 60	3		3.53				
61 - 70	3			4.15			
71 - 80	3				4.79		
81 - 90	3					5.51	
> 90	3						6.12
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Phụ lục 2.2. Ảnh hưởng của độ tuổi tôm đến thành phần hóa học của vỏ tôm lột xác.

Độ tuổi (ngày)	Khoáng (%)	Protein (%)	Chitin (%)
41 - 50	52,8 ± 2,6	13,1 ± 1,4	20,6 ± 0,6
51 - 60	57,1 ± 1,6	11,8 ± 0,5	21,8 ± 1,1
61 - 70	60,8 ± 1,9	10,4 ± 0,7	23,4 ± 0,5
71 - 80	53,4 ± 0,5	12,9 ± 0,6	23,7 ± 0,2
81 - 90	55,1 ± 0,8	12,4 ± 0,9	23,5 ± 0,6
> 90	55,9 ± 2,1	12,7 ± 0,6	23,6 ± 0,5

Descriptives

Chỉ tiêu	Độ tuổi (ngày)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
Hàm lượng khoáng (%)	41 - 50	3	52.83	3.19	1.84	44.91	60.75	50.70	56.50
	51 - 60	3	57.14	1.93	1.11	52.35	61.92	55.02	58.79
	61 - 70	3	60.78	2.36	1.36	54.91	66.64	58.08	62.47
	71 - 80	3	53.35	0.57	0.33	51.94	54.76	52.92	53.99
	81 - 90	3	55.12	0.97	0.56	52.72	57.52	54.06	55.95
	> 90	3	55.87	2.54	1.47	49.55	62.19	54.10	58.78
	Total	18	55.85	3.25	0.77	54.23	57.47	50.70	62.47
Hàm lượng protein (%)	41 - 50	3	13.14	1.67	0.96	8.99	17.29	11.40	14.73
	51 - 60	3	11.79	0.57	0.33	10.37	13.20	11.23	12.37
	61 - 70	3	10.42	0.80	0.46	8.42	12.41	9.85	11.34
	71 - 80	3	12.88	0.68	0.39	11.19	14.57	12.15	13.49
	> 90	3	12.70	0.71	0.41	10.93	14.47	11.95	13.37
	Total	18	12.21	1.25	0.29	11.59	12.84	9.85	14.73
Hàm lượng chitin (%)	41 - 50	3	20.57	0.79	0.46	18.60	22.53	19.69	21.24
	51 - 60	3	21.81	1.38	0.80	18.38	25.24	20.31	23.03

	61 - 70	3	23.40	0.67	0.38	21.75	25.06	22.67	23.97
	71 - 80	3	23.69	0.28	0.16	23.01	24.38	23.42	23.97
	81 - 90	3	23.47	0.71	0.41	21.71	25.22	22.89	24.26
	> 90	3	23.61	0.60	0.35	22.12	25.09	22.92	23.99
	Total	18	22.76	1.38	0.33	22.07	23.44	19.69	24.26

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hàm lượng khoáng (%)	Between Groups	125.35	5	25.07	5.54	0.01
	Within Groups	54.34	12	4.53		
	Total	179.69	17			
Hàm lượng protein (%)	Between Groups	14.87	5	2.97	3.06	0.05
	Within Groups	11.66	12	0.97		
	Total	26.53	17			
Hàm lượng chitin (%)	Between Groups	24.62	5	4.92	7.56	0.00
	Within Groups	7.82	12	0.65		
	Total	32.44	17			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Hàm lượng khoáng (%)		Subset for alpha = 0.05		
Độ tuổi (ngày)	N	1	2	3
41 - 50	3	52.83		
71 - 80	3	53.35	53.35	
81 - 90	3	55.12	55.12	
> 90	3	55.87	55.87	
51 - 60	3		57.14	57.14
61 - 70	3			60.78
Sig.		0.13	0.07	0.06
Hàm lượng protein (%)		Subset for alpha = 0.05		
Độ tuổi (ngày)	N	1	2	
61 - 70	3	10.42		
51 - 60	3	11.79	11.79	
81 - 90	3		12.37	
> 90	3		12.70	
71 - 80	3		12.88	
41 - 50	3		13.14	
Sig.		0.12	0.15	
Hàm lượng chitin (%)		Subset for alpha = 0.05		
Độ tuổi (ngày)	N	1	2	
41 - 50	3	20.57		
51 - 60	3	21.81		
61 - 70	3		23.40	
81 - 90	3		23.47	
> 90	3		23.61	
71 - 80	3		23.69	
Sig.		0.08	0.69	

Phụ lục 2.3. Ảnh hưởng của độ tuổi tôm đến hiệu suất thu hồi, hàm lượng khoáng và protein còn lại của chitin từ vỏ lột xác.

Độ tuổi (ngày)	Khoáng (%)	Protein (%)	HSTH (%)
41 - 50	1,6 ± 0,2	1,10 ± 0,05	19,5 ± 1,3
51 - 60	0,8 ± 0,1	1,66 ± 0,12	20,6 ± 0,7
61 - 70	0,3 ± 0,1	0,72 ± 0,06	23,7 ± 1,2
71 - 80	0,4 ± 0,2	0,89 ± 0,03	23,1 ± 0,9
81 - 90	0,4 ± 0,2	0,54 ± 0,10	23,5 ± 1,2
> 90	0,5 ± 0,3	0,31 ± 0,10	23,4 ± 0,8

Descriptives

Chỉ tiêu	Độ tuổi (ngày)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
Hàm lượng khoáng (%)	41 - 50	3	1.60	0.26	0.15	0.95	2.25	1.35	1.88
	51 - 60	3	0.78	0.07	0.04	0.61	0.95	0.72	0.85
	61 - 70	3	0.32	0.11	0.07	0.04	0.61	0.20	0.43
	71 - 80	3	0.42	0.28	0.16	(0.28)	1.13	0.25	0.75

	81 - 90	3	0.43	0.20	0.12	(0.07)	0.92	0.21	0.60
	> 90	3	0.49	0.31	0.18	(0.29)	1.27	0.24	0.84
	Total	18	0.67	0.49	0.11	0.43	0.92	0.20	1.88
Hàm lượng protein (%)	41 - 50	3	1.14	0.07	0.04	0.98	1.30	1.07	1.19
	51 - 60	3	1.63	0.10	0.06	1.38	1.89	1.52	1.72
	61 - 70	3	0.72	0.07	0.04	0.54	0.89	0.66	0.80
	71 - 80	3	0.85	0.10	0.06	0.61	1.09	0.74	0.91
	81 - 90	3	0.54	0.13	0.07	0.23	0.86	0.44	0.68
	> 90	3	0.31	0.12	0.07	0.02	0.60	0.19	0.42
	Total	18	0.87	0.45	0.11	0.64	1.09	0.19	1.72
Hiệu suất thu hồi (%)	41 - 50	3	19.55	1.64	0.95	15.48	23.61	17.99	21.25
	51 - 60	3	20.59	0.92	0.53	18.32	22.87	19.60	21.41
	61 - 70	3	23.70	1.43	0.83	20.14	27.26	22.07	24.78
	71 - 80	3	23.13	1.15	0.66	20.28	25.97	22.04	24.32
	81 - 90	3	23.54	1.48	0.85	19.88	27.21	22.28	25.16
	> 90	3	23.39	0.99	0.57	20.93	25.86	22.30	24.23
	Total	18	22.32	2.00	0.47	21.32	23.31	17.99	25.16

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hàm lượng khoáng (%)	Between Groups	3.43	5	0.69	13.46	0.00
	Within Groups	0.61	12	0.05		
	Total	4.04	17			
Hàm lượng protein (%)	Between Groups	3.29	5	0.66	66.73	0.00
	Within Groups	0.12	12	0.01		
	Total	3.40	17			
Hiệu suất thu hồi (%)	Between Groups	47.63	5	9.53	5.68	0.01
	Within Groups	20.11	12	1.68		
	Total	67.74	17			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Hàm lượng khoáng (%)		Subset for alpha = 0.05		
Độ tuổi (ngày)	N	1	2	3
61 – 70	3	0.32		
71 – 80	3	0.42	0.42	
81 - 90	3	0.43	0.43	
> 90	3	0.49	0.49	
51 - 60	3		0.78	
41 - 50	3			1.60
Sig.		0.42	0.10	1.00

Hàm lượng protein (%)		Subset for alpha = 0.05				
Độ tuổi (ngày)	N	1	2	3	4	5
> 90	3	0.31				
81 - 90	3		0.54			
61 - 70	3		0.72	0.72		
71 - 80	3			0.85		
41 - 50	3				1.14	
51 - 60	3					1.63
Sig.		1.00	0.06	0.12	1.00	1.00

Hiệu suất thu hồi (%)		Subset for alpha = 0.05	
Độ tuổi (ngày)	N	1	2
41 – 50	3	19.55	
51 – 60	3	20.59	
71 - 80	3		23.13
> 90	3		23.39
81 - 90	3		23.54
61 - 70	3		23.70
Sig.		0.34	0.62

Phụ lục 2.4. Ảnh hưởng của nồng độ HCl, nhiệt độ, thời gian khử khoáng và trạng thái nguyên liệu khô đến hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô và hiệu suất thu hồi chitin thô.

	Hàm lượng khoáng còn lại (%)			Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		
12 giờ	HCl 2%	HCl 3%	HCl 4%	HCl 2%	HCl 3%	HCl 4%
30°C	16,7 ± 1,9	2,6 ± 0,4	1,2 ± 0,3	49,9 ± 1,3	37,5 ± 0,6	30,4 ± 2,0
50°C	14,4 ± 2,1	2,1 ± 0,3	1,1 ± 0,2	48,5 ± 2,2	37,3 ± 0,3	30,3 ± 0,4
70°C	12,3 ± 1,0	1,9 ± 0,2	0,8 ± 0,3	46,6 ± 2,7	36,9 ± 0,4	28,4 ± 0,6
	Hàm lượng khoáng còn lại (%)			Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		
30°C	HCl 2%	HCl 3%	HCl 4%	HCl 2%	HCl 3%	HCl 4%
1 h	32,0 ± 0,8	6,5 ± 0,3	2,7 ± 0,6	56,7 ± 1,9	41,5 ± 1,6	39,5 ± 3,2
2 h	27,3 ± 0,5	6,2 ± 0,3	2,1 ± 0,5	56,3 ± 1,8	38,9 ± 1,0	39,4 ± 2,2
3h	22,3 ± 1,8	4,5 ± 0,3	1,3 ± 0,1	55,7 ± 3,8	38,8 ± 0,7	36,3 ± 2,1
6 h	20,6 ± 0,7	4,3 ± 0,4	1,3 ± 0,2	53,9 ± 1,3	38,3 ± 0,7	34,6 ± 2,9
9 h	19,3 ± 1,5	3,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3	52,1 ± 0,6	37,7 ± 0,8	31,1 ± 1,0
12 h	16,7 ± 1,9	2,6 ± 0,4	1,2 ± 0,3	49,9 ± 1,3	37,5 ± 0,6	30,4 ± 2,0

PL2.4A. Ảnh hưởng của nồng độ HCl, nhiệt độ đến hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô và hiệu suất thu hồi chitin thô.
Descriptives

Chi tiêu	12 giờ	HCl (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
							Lower	Upper		
Hàm lượng khoáng còn lại (%)	30°C	2	3	16.67	2.25	1.30	11.08	22.25	14.20	18.60
		3	3	2.57	0.49	0.28	1.34	3.79	2.00	2.90
		4	3	1.17	0.31	0.18	0.41	1.93	0.90	1.50
		Total	9	6.80	7.51	2.50	1.02	12.58	0.90	18.60
	50°C	2	3	14.43	2.56	1.48	8.08	20.79	11.50	16.20
		3	3	2.17	0.31	0.18	1.41	2.93	1.90	2.50
		4	3	1.10	0.20	0.12	0.60	1.60	0.90	1.30
		Total	9	5.90	6.55	2.18	0.87	10.93	0.90	16.20
	70°C	2	3	12.33	1.17	0.68	9.42	15.24	11.00	13.20
		3	3	1.87	0.31	0.18	1.11	2.63	1.60	2.20
		4	3	0.77	0.35	0.20	(0.11)	1.64	0.40	1.10
		Total	9	4.99	5.56	1.85	0.71	9.27	0.40	13.20
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)	30°C	2	3	49.97	1.58	0.91	6.04	53.90	48.60	51.70
		3	3	37.47	0.80	0.46	35.47	39.46	36.70	38.30
		4	3	30.40	2.43	1.40	24.36	36.44	27.60	32.00
		Total	9	39.28	8.71	2.90	32.58	45.97	27.60	51.70
	50°C	2	3	48.53	2.71	1.56	41.81	55.26	45.50	50.70
		3	3	37.27	0.31	0.18	36.51	38.03	37.00	37.60
		4	3	30.37	0.46	0.27	29.22	31.51	30.10	30.90
		Total	9	38.72	8.06	2.69	32.53	44.92	30.10	50.70
	70°C	2	3	46.63	3.29	1.90	38.46	54.80	42.90	49.10
		3	3	36.93	0.51	0.30	35.66	38.21	36.50	37.50
		4	3	28.37	0.81	0.47	26.36	30.37	27.90	29.30
		Total	9	37.31	8.10	2.70	31.09	43.54	27.90	49.10

ANOVA

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hàm lượng khoáng còn lại (%)	30°C	Between Groups	441.02	2	220.51	122.73	0.00
		Within Groups	10.78	6	1.80		
		Total	451.80	8			
	50°C	Between Groups	329.39	2	164.69	74.00	0.00
		Within Groups	13.35	6	2.23		
		Total	342.74	8			
	70°C	Between Groups	244.55	2	122.27	230.71	0.00
		Within Groups	3.18	6	0.53		
		Total	247.73	8			
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)	30°C	Between Groups	589.04	2	294.52	97.45	0.00
		Within Groups	18.13	6	3.02		
		Total	607.18	8			
	50°C	Between Groups	504.58	2	252.29	99.20	0.00
		Within Groups	15.26	6	2.54		
		Total	519.84	8			
	70°C	Between Groups	501.15	2	250.57	64.09	0.00
		Within Groups	23.46	6	3.91		
		Total	524.61	8			
			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hàm lượng khoáng còn lại (%)	HCl 2%	Between Groups	28.18	2	14.09	3.26	0.11
		Within Groups	25.94	6	4.32		
		Total	54.12	8			
	HCl 3%	Between Groups	0.74	2	0.37	2.58	0.16
		Within Groups	0.86	6	0.14		
		Total	1.60	8			
	HCl 4%	Between Groups	0.28	2	0.14	1.61	0.28
		Within Groups	0.51	6	0.09		
		Total	0.79	8			
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)	HCl 2%	Between Groups	16.78	2	8.39	1.22	0.36
		Within Groups	41.28	6	6.88		
		Total	58.06	8			
	HCl 3%	Between Groups	0.44	2	0.22	0.65	0.55
		Within Groups	2.00	6	0.33		
		Total	2.44	8			
	HCl 4%	Between Groups	8.14	2	4.07	1.80	0.24
		Within Groups	13.57	6	2.26		
		Total	21.71	8			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05	
30°C, Nồng độ HCl (%)	N	1	2
HCl 4%	3	1.17	
HCl 3%	3	2.57	
HCl 2%	3		16.67
Sig.		0.46	1.00
Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05	
50°C, Nồng độ HCl (%)	N	1	2
HCl 4%	3	1.10	
HCl 3%	3	2.17	
HCl 2%	3		14.43
Sig.		0.67	1.00
Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05	
70°C, Nồng độ HCl (%)	N	1	2
HCl 4%	3	0.77	
HCl 3%	3	1.87	
HCl 2%	3		12.33
Sig.		0.23	1.00
Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 2%, Nhiệt độ khử khoáng (°C)	N	1	
70°C	3	12.33	
50°C	3	14.43	
30°C	3	16.67	
Sig.		0.10	
Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05	

HCl 3%, Nhiệt độ khử khoáng (°C)	N	1
70°C	3	1.87
50°C	3	2.17
30°C	3	2.57
Sig.		0.14
Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05
HCl 4%, Nhiệt độ khử khoáng (°C)	N	1
70°C	3	0.77
50°C	3	1.10
30°C	3	1.17
Sig.		0.29

Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05		
30°C, Nồng độ HCl (%)	N	1	2	3
HCl 4%	3	30.40		
HCl 3%	3		37.47	
HCl 2%	3			49.97
Sig.		1.00	1.00	1.00
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05		
50°C, Nồng độ HCl (%)	N	1	2	3
HCl 4%	3	30.37		
HCl 3%	3		37.27	
HCl 2%	3			48.53
Sig.		1.00	1.00	1.00
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05		
70°C, Nồng độ HCl (%)	N	1	2	3
HCl 4%	3	28.37		
HCl 3%	3		36.93	
HCl 2%	3			46.63
Sig.		1.00	1.00	1.00
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05		
HCl 2%, Nhiệt độ khử khoáng (°C)	N	1		
70°C	3	46.63		
50°C	3	48.53		
30°C	3	49.97		
Sig.		0.33		
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05		
HCl 3%, Nhiệt độ khử khoáng (°C)	N	1		
70°C	3	36.93		
50°C	3	37.27		
30°C	3	37.47		
Sig.		0.53		
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05		
HCl 4%, Nhiệt độ khử khoáng (°C)	N	1		
70°C	3	28.37		
50°C	3	30.37		
30°C	3	30.40		
Sig.		0.30		

PL2.4B. Ảnh hưởng của nồng độ HCl, thời gian đến hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô và hiệu suất thu hồi chitin thô.

Descriptives

Chi tiêu	30°C	Thời gian (giờ)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
							Lower	Upper		
	HCl 2%	1	3	32.03	0.98	0.57	29.60	34.47	30.90	32.60
		2	3	27.27	0.64	0.37	25.69	28.84	26.90	28.00
		3	3	22.33	2.18	1.26	16.91	27.75	20.40	24.70
		6	3	20.57	0.87	0.50	18.40	22.74	19.60	21.30
		9	3	19.37	1.80	1.04	14.89	23.84	17.60	21.20
		12	3	16.67	2.25	1.30	11.08	22.25	14.20	18.60
		Total	18	23.04	5.47	1.29	20.32	25.76	14.20	32.60
	HCl 3%	1	3	6.47	0.35	0.20	5.59	7.34	6.10	6.80
		2	3	6.23	0.35	0.20	5.36	7.11	5.90	6.60
		3	3	4.47	0.38	0.22	3.53	5.41	4.20	4.90
		6	3	4.30	0.52	0.30	3.01	5.59	3.70	4.60
		9	3	3.20	0.30	0.17	2.45	3.95	2.90	3.50

Hàm lượng khoáng còn lại (%)	HCl 4%	12	3	2.57	0.49	0.28	1.34	3.79	2.00	2.90
		Total	18	4.54	1.51	0.36	3.79	5.29	2.00	6.80
		1	3	2.67	0.78	0.45	0.74	4.60	1.80	3.30
		2	3	2.07	0.59	0.34	0.61	3.52	1.40	2.50
		3	3	1.30	0.17	0.10	0.87	1.73	1.20	1.50
		6	3	1.37	0.21	0.12	0.85	1.88	1.20	1.60
		9	3	1.27	0.31	0.18	0.51	2.03	1.00	1.60
		12	3	1.17	0.31	0.18	0.41	1.93	0.90	1.50
		Total	18	1.64	0.68	0.16	1.30	1.98	0.90	3.30
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)	HCl 2%	1	3	56.63	2.27	1.31	50.99	62.28	54.20	58.70
		2	3	56.37	2.15	1.24	51.01	61.72	54.70	58.80
		3	3	55.67	4.65	2.68	44.12	67.22	50.30	58.50
		6	3	53.87	1.62	0.93	49.85	57.88	52.40	55.60
		9	3	52.07	0.81	0.47	50.06	54.07	51.60	53.00
		12	3	49.97	1.58	0.91	46.04	53.90	48.60	51.70
		Total	18	54.09	3.26	0.77	52.48	55.71	48.60	58.80
	HCl 3%	1	3	41.57	1.98	1.14	36.66	46.47	39.80	43.70
		2	3	38.90	1.22	0.70	35.88	41.92	37.50	39.70
		3	3	38.77	0.83	0.48	36.70	40.84	38.10	39.70
		6	3	38.30	0.87	0.50	36.13	40.47	37.70	39.30
		9	3	37.67	0.97	0.56	35.25	40.08	36.60	38.50
		12	3	37.47	0.80	0.46	35.47	39.46	36.70	38.30
		Total	18	38.78	1.71	0.40	37.93	39.63	36.60	43.70
	HCl 4%	1	3	39.50	3.94	2.27	29.72	49.28	35.00	42.30
		2	3	39.40	2.69	1.55	32.72	46.08	37.20	42.40
		3	3	36.33	2.60	1.50	29.87	42.80	33.80	39.00
		6	3	34.63	3.53	2.04	25.86	43.40	31.40	38.40
		9	3	31.07	1.15	0.67	28.20	33.94	30.40	32.40
		12	3	30.40	2.43	1.40	24.36	36.44	27.60	32.00
		Total	18	35.22	4.42	1.04	33.02	37.42	27.60	42.40

ANOVA

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hàm lượng khoáng còn lại (%)	HCl 2%	Between Groups	478.42	5	95.68	37.80	0.00
		Within Groups	30.38	12	2.53		
		Total	508.80	17			
	HCl 3%	Between Groups	37.00	5	7.40	44.69	0.00
		Within Groups	1.99	12	0.17		
		Total	38.98	17			
	HCl 4%	Between Groups	5.37	5	1.07	5.34	0.01
		Within Groups	2.41	12	0.20		
		Total	7.78	17			
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)	HCl 2%	Between Groups	105.85	5	21.17	3.41	0.04
		Within Groups	74.40	12	6.20		
		Total	180.25	17			
	HCl 3%	Between Groups	32.92	5	6.58	0.01	0.01
		Within Groups	16.85	12	1.40		
		Total	49.77	17			
	HCl 4%	Between Groups	233.57	5	46.71	5.69	0.01
		Within Groups	98.44	12	8.20		
		Total	332.01	17			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Hàm lượng khoáng còn lại (%)			Subset for alpha = 0.05			
HCl 2%, Thời gian khử khoáng (giờ)	N		1	2	3	4
12	3		16.67			
9	3		19.37	19.37		
6	3		20.57	20.57		
3	3			22.33		
2	3				27.27	
1	3					32.03
Sig.			0.09	0.27	1.00	1.00
Hàm lượng khoáng còn lại (%)			Subset for alpha = 0.05			
HCl 3%, Thời gian khử khoáng (giờ)	N		1	2	3	4
12	3		2.57			
9	3		3.20	3.20		

6	3		4.30	4.30	
3	3			4.47	
2	3				6.23
1	3				6.47
Sig.		0.44	0.05	1.00	0.98
Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05			
HCl 4%, Thời gian khử khoáng (giờ)	N	1	2	3	4
12	3	1.17			
9	3	1.27			
3	3	1.30			
6	3	1.37			
2	3	2.07	2.07		
1	3		2.67		
Sig.		0.21	0.59		

Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 2%, Thời gian khử khoáng (giờ)	N	1	2
12	3	49.97	
9	3	52.07	
6	3	53.87	
3	3	55.67	
2	3	56.37	
1	3	56.63	
Sig.		0.06	
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 3%, Thời gian khử khoáng (giờ)	N	1	2
12	3	37.47	
9	3	37.67	
6	3	38.30	
3	3	38.77	38.77
2	3	38.90	38.90
1	3		41.57
Sig.		0.68	0.11
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 4%, Thời gian khử khoáng (giờ)	N	1	2
12	3	30.40	
9	3	31.07	
6	3	34.63	
3	3	36.33	36.33
2	3		39.40
1	3		39.50
Sig.		0.19	0.36

Phụ lục 2.5. Ảnh hưởng của nồng độ HCl, nhiệt độ, thời gian khử khoáng và trạng thái nguyên liệu ướt đến hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô và hiệu suất thu hồi chitin thô.

	Hàm lượng khoáng còn lại (%)			Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		
	HCl 2%	HCl 3%	HCl 4%	HCl 2%	HCl 3%	HCl 4%
12 giờ						
30°C	15,3 ± 0,7	1,9 ± 0,3	1,2 ± 0,1	49,7 ± 2,4	43,4 ± 0,7	39,6 ± 1,2
50°C	11,3 ± 1,1	1,6 ± 0,2	1,1 ± 0,2	46,1 ± 1,3	42,1 ± 1,7	39,2 ± 1,5
70°C	8,4 ± 1,0	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,2	44,2 ± 3,5	34,1 ± 1,3	28,3 ± 0,8
30°C	Hàm lượng khoáng còn lại (%)			Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		
	HCl 2%	HCl 3%	HCl 4%	HCl 2%	HCl 3%	HCl 4%
1 h	22,4 ± 3,7	2,9 ± 1,0	1,6 ± 0,3	55,9 ± 1,2	46,7 ± 1,6	45,3 ± 3,3
2 h	19,7 ± 1,8	2,9 ± 1,0	1,6 ± 0,3	51,1 ± 1,5	46,2 ± 1,3	45,6 ± 1,0
3 h	19,5 ± 1,4	2,6 ± 0,6	1,3 ± 0,2	49,4 ± 2,3	45,5 ± 0,5	41,6 ± 1,5
6 h	19,1 ± 2,5	2,5 ± 0,7	1,3 ± 0,3	49,2 ± 4,0	43,7 ± 0,5	41,1 ± 1,2
9 h	18,2 ± 2,5	2,1 ± 0,4	1,2 ± 0,2	49,5 ± 5,3	43,1 ± 0,5	39,7 ± 1,2
12 h	15,3 ± 0,7	1,9 ± 0,3	1,2 ± 0,1	49,7 ± 2,4	43,4 ± 0,7	39,6 ± 1,2

PL2.5A. Ảnh hưởng của nồng độ HCl, nhiệt độ đến hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô và hiệu suất thu hồi chitin thô.

Descriptives

Chỉ tiêu	12 giờ	HCl (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
							Lower	Upper		
Hàm lượng khoáng còn lại (%)	30°C	2	3	15.30	0.85	0.49	13.18	17.42	14.50	16.20
		3	3	1.85	0.37	0.21	0.93	2.78	1.43	2.12
		4	3	1.20	0.20	0.12	0.70	1.70	1.00	1.40
		Total	9	6.12	6.91	2.30	0.81	11.43	1.00	16.20
	50°C	2	3	11.30	1.40	0.81	7.82	14.78	9.70	12.30
		3	3	1.60	0.20	0.12	1.10	2.10	1.40	1.80
		4	3	1.07	0.25	0.15	0.44	1.69	0.80	1.30
		Total	9	4.66	5.04	1.68	0.78	8.53	0.80	12.30
	70°C	2	3	8.47	1.17	0.68	5.56	11.38	7.60	9.80
		3	3	1.07	0.31	0.18	0.31	1.83	0.80	1.40
		4	3	0.63	0.21	0.12	0.12	1.15	0.40	0.80
		Total	9	3.39	3.86	1.29	0.42	6.36	0.40	9.80
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)	30°C	2	3	49.70	2.95	1.70	42.37	57.03	46.70	52.60
		3	3	43.43	0.86	0.50	41.29	45.58	42.50	44.20
		4	3	39.60	1.40	0.81	36.12	43.08	38.20	41.00
		Total	9	44.24	1.73	1.58	40.61	47.88	38.20	52.60
	50°C	2	3	46.13	1.55	0.90	42.27	49.99	44.40	47.40
		3	3	42.10	2.13	1.23	36.81	47.39	40.20	44.40
		4	3	39.17	1.87	1.08	34.52	43.82	37.80	41.30
		Total	9	42.47	3.43	1.14	39.83	45.11	37.80	47.40
	70°C	2	3	44.17	4.31	2.49	33.46	54.87	39.30	47.50
		3	3	34.07	1.56	0.90	30.18	37.95	32.40	35.50
		4	3	28.30	1.00	0.58	25.82	30.78	27.30	29.30
		Total	9	35.51	7.34	2.45	29.87	41.15	27.30	47.50

ANOVA

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hàm lượng khoáng còn lại (%)	30°C	Between Groups	380.06	2	190.03	627.43	0.00
		Within Groups	1.82	6	0.30		
		Total	381.88	8			
	50°C	Between Groups	199.10	2	99.55	144.74	0.00
		Within Groups	4.13	6	0.69		
		Total	203.22	8			
	70°C	Between Groups	116.31	2	58.15	115.54	0.00
		Within Groups	3.02	6	0.50		
		Total	119.33	8			
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)	30°C	Between Groups	155.98	2	77.99	20.50	0.00
		Within Groups	22.83	6	3.80		
		Total	178.80	8			
	50°C	Between Groups	73.41	2	36.70	10.54	0.00
		Within Groups	20.89	6	3.48		
		Total	94.30	8			
	70°C	Between Groups	387.02	2	193.51	26.37	0.00
		Within Groups	44.03	6	7.34		
		Total	431.05	8			
			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hàm lượng khoáng còn lại (%)	HCl 2%	Between Groups	70.72	2	35.36	26.11	0.00
		Within Groups	8.13	6	1.35		
		Total	78.85	8			
	HCl 3%	Between Groups	0.97	2	0.48	5.33	0.05
		Within Groups	0.54	6	0.09		
		Total	1.51	8			
	HCl 4%	Between Groups	0.53	2	0.26	5.39	0.05
		Within Groups	0.29	6	0.05		
		Total	0.82	8			
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)	HCl 2%	Between Groups	47.21	2	23.60	2.38	0.17
		Within Groups	59.39	6	9.90		
		Total	106.60	8			
	HCl 3%	Between Groups	154.05	2	77.02	29.94	0.00
		Within Groups	15.43	6	2.57		
		Total	169.48	8			

	HCl 4%	Between Groups	245.96	2	122.98	57.08	0.00
		Within Groups	12.93	6	2.15		
		Total	258.89	8			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05	
30°C, Nồng độ HCl (%)	N	1	2
HCl 4%	3	1.20	
HCl 3%	3	1.85	
HCl 2%	3		15.30
Sig.		0.38	1.00
Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05	
50°C, Nồng độ HCl (%)	N	1	2
HCl 4%	3	1.07	
HCl 3%	3	1.60	
HCl 2%	3		11.30
Sig.		0.72	1.00
Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05	
70°C, Nồng độ HCl (%)	N	1	2
HCl 4%	3	0.63	
HCl 3%	3	1.07	
HCl 2%	3		8.47
Sig.		0.75	1.00
Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 2%, Nhiệt độ khử khoáng (°C)	N	1	2
70°C	3	8.47	
50°C	3	11.30	
30°C	3		15.30
Sig.		0.06	1.00
Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 3%, Nhiệt độ khử khoáng (°C)	N	1	2
70°C	3	1.07	
50°C	3	1.60	1.60
30°C	3		1.85
Sig.		0.16	0.59
Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 4%, Nhiệt độ khử khoáng (°C)	N	1	2
70°C	3	0.63	
50°C	3	1.07	1.07
30°C	3		1.20
Sig.		0.12	0.75

Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05	
30°C, Nồng độ HCl (%)	N	1	2
HCl 4%	3	39.60	
HCl 3%	3	43.43	
HCl 2%	3		49.70
Sig.		0.11	1.00
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05	
50°C, Nồng độ HCl (%)	N	1	2
HCl 4%	3	39.17	
HCl 3%	3	42.10	42.10
HCl 2%	3		46.13
Sig.		0.21	0.08
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05	
70°C, Nồng độ HCl (%)	N	1	2
HCl 4%	3	28.30	
HCl 3%	3	34.07	
HCl 2%	3		44.17
Sig.		0.09	1.00
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 2%, Nhiệt độ khử khoáng (°C)	N	1	2
70°C	3	44.17	
50°C	3	46.13	
30°C	3		49.70
Sig.		0.16	
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05	

HCl 3%, Nhiệt độ khử khoáng (°C)	N	1	2
70°C	3	34.07	
50°C	3		42.10
30°C	3		43.43
Sig.		1.00	0.59
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 4%, Nhiệt độ khử khoáng (°C)	N	1	2
70°C	3	28.30	
50°C	3		39.17
30°C	3		39.60
Sig.		1.00	0.93

PL2.5B. Ảnh hưởng của nồng độ HCl, thời gian đến hiệu suất khử khoáng, hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô và hiệu suất thu hồi chitin thô.

Descriptives

Chi tiêu	30°C	Thời gian (giờ)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
							Lower	Upper		
Hàm lượng khoáng còn lại (%)	HCl 2%	1	3	22.37	4.57	2.64	11.03	33.71	17.10	25.20
		2	3	19.63	2.24	1.29	14.08	25.19	17.20	21.60
		3	3	19.53	1.76	1.02	15.16	23.91	17.50	20.60
		6	3	19.10	2.98	1.72	11.69	26.51	15.80	21.60
		9	3	18.23	3.03	1.75	10.71	25.76	16.10	21.70
		12	3	15.30	0.85	0.49	13.18	17.42	14.50	16.20
		Total	18	19.03	3.20	0.75	17.44	20.62	14.50	25.20
	HCl 3%	1	3	2.87	1.19	0.69	(0.10)	5.83	1.90	4.20
		2	3	2.83	1.29	0.74	(0.36)	6.03	1.90	4.30
		3	3	2.63	0.81	0.47	0.63	4.64	1.90	3.50
		6	3	2.47	0.83	0.48	0.40	4.54	1.80	3.40
		9	3	2.07	0.47	0.27	0.89	3.24	1.70	2.60
		12	3	1.83	0.38	0.22	0.89	2.77	1.40	2.10
		Total	18	2.45	0.85	0.20	2.03	2.87	1.40	4.30
	HCl 4%	1	3	1.60	0.40	0.23	0.63	2.64	1.20	2.00
		2	3	1.60	0.36	0.21	0.70	2.50	1.20	1.90
		3	3	1.27	0.21	0.12	0.75	1.78	1.10	1.50
		6	3	1.37	0.40	0.23	0.36	2.37	1.00	1.80
		9	3	1.20	0.20	0.12	0.70	1.70	1.00	1.40
		12	3	1.20	0.20	0.12	0.70	1.70	1.00	1.40
		Total	18	1.38	0.32	0.08	1.22	1.54	1.00	2.00
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)	HCl 2%	1	3	55.90	1.44	0.83	52.32	59.48	54.30	57.10
		2	3	51.17	1.93	1.11	46.37	55.96	49.00	52.70
		3	3	49.40	2.82	1.63	42.39	56.41	46.40	52.00
		6	3	49.23	4.88	2.82	37.11	61.35	45.70	54.80
		9	3	49.53	6.52	3.76	33.33	65.73	44.50	56.90
		12	3	49.70	2.95	1.70	42.37	57.03	46.70	52.60
		Total	18	50.82	4.04	0.95	48.81	52.83	44.50	57.10
	HCl 3%	1	3	46.67	1.93	1.11	41.87	51.46	44.50	48.20
		2	3	46.23	1.57	0.91	42.33	50.13	45.00	48.00
		3	3	45.50	0.62	0.36	43.95	47.05	45.00	46.20
		6	3	43.67	0.65	0.38	42.05	45.28	43.00	44.30
		9	3	43.13	0.55	0.32	41.77	44.50	42.50	43.50
		12	3	43.43	0.86	0.50	41.29	45.58	42.50	44.20
		Total	18	44.77	1.75	0.41	43.90	45.64	42.50	48.20
	HCl 4%	1	3	45.37	4.01	2.31	35.42	55.32	41.80	49.70
		2	3	45.57	1.15	0.66	42.71	48.42	44.40	46.70
		3	3	41.60	1.82	1.05	37.08	46.12	40.50	43.70
		6	3	41.10	1.40	0.81	37.62	44.58	39.50	42.10
		9	3	39.70	1.47	0.85	36.04	43.36	38.10	41.00
		12	3	39.60	1.40	0.81	36.12	43.08	38.20	41.00
		Total	18	42.16	3.08	0.73	40.62	43.69	38.10	49.70

ANOVA

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
	HCl 2%	Between Groups	78.91	5	15.78	1.98	0.15
		Within Groups	95.49	12	7.96		
		Total	174.40	17			
		Between Groups	2.65	5	0.53	0.66	0.66

Hàm lượng khoáng còn lại (%)	HCl 3%	Within Groups	9.58	12	0.80		
		Total	12.23	17			
	HCl 4%	Between Groups	0.57	5	0.11	1.18	0.37
		Within Groups	1.16	12	0.10		
		Total	1.73	17			
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)	HCl 2%	Between Groups	100.11	5	20.02	1.35	0.31
		Within Groups	177.60	12	14.80		
		Total	277.71	17			
	HCl 3%	Between Groups	35.86	5	7.17	5.35	0.01
		Within Groups	16.09	12	1.34		
		Total	51.96	17			
	HCl 4%	Between Groups	107.79	5	21.56	4.83	0.01
		Within Groups	53.53	12	4.46		
		Total	161.32	17			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 2%, Thời gian khử khoáng (giờ)		N	1
12	3		15.30
9	3		18.23
6	3		19.10
3	3		19.53
2	3		19.63
1	3		22.37
Sig.			
Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 3%, Thời gian khử khoáng (giờ)		N	1
12	3		1.83
9	3		2.07
6	3		2.47
3	3		2.63
2	3		2.83
1	3		2.87
Sig.			0.72
Hàm lượng khoáng còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 4%, Thời gian khử khoáng (giờ)		N	1
12	3		1.20
9	3		1.20
3	3		1.27
6	3		1.37
2	3		1.60
1	3		1.63
Sig.			0.55

Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 2%, Thời gian khử khoáng (giờ)		N	1 2
6	3		49.23
3	3		49.40
9	3		49.53
12	3		49.70
2	3		51.17
1	3		55.90
Sig.			0.34
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 3%, Thời gian khử khoáng (giờ)		N	1 2
9	3		43.13
12	3		43.43
6	3		43.67
3	3		45.50
2	3		46.23
1	3		46.67
Sig.			0.06 0.07
Hiệu suất thu hồi chitin thô (%)		Subset for alpha = 0.05	
HCl 4%, Thời gian khử khoáng (giờ)		N	1 2
12	3		39.60

9	3	39.70	
6	3	41.10	41.10
3	3	41.60	41.60
1	3	45.37	45.37
2	3		45.57
Sig.		0.05	0.17

Phụ lục 2.6. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH, nhiệt độ, thời gian khử protein và trạng thái nguyên liệu khô đến hàm lượng protein còn lại trong chitin tinh sạch và hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch.

	Hàm lượng protein còn lại (%)			Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		
24 giờ	NaOH 2%	NaOH 3%	NaOH 4%	NaOH 2%	NaOH 3%	NaOH 4%
30°C	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	30,4 ± 0,2	25,1 ± 1,4	24,1 ± 0,6
50°C	1,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	27,7 ± 0,6	24,6 ± 0,3	23,4 ± 0,1
70°C	0,8 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	22,2 ± 0,7	20,8 ± 0,7	19,8 ± 0,7
	Hàm lượng protein còn lại (%)			Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		
50°C	NaOH 2%	NaOH 3%	NaOH 4%	NaOH 2%	NaOH 3%	NaOH 4%
3 h	2,8 ± 0,2	1,2 ± 0,4	0,8 ± 0,1	35,3 ± 0,3	27,7 ± 1,1	26,6 ± 0,2
6 h	2,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	32,1 ± 1,7	26,3 ± 1,1	25,7 ± 0,6
9h	1,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	31,7 ± 1,9	25,0 ± 0,3	24,7 ± 0,5
12 h	1,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,0	28,0 ± 0,6	24,9 ± 0,3	24,1 ± 0,5
24 h	1,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	27,7 ± 0,6	24,6 ± 0,3	23,4 ± 0,1

PL2.6A. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH, nhiệt độ đến hàm lượng protein còn lại trong chitin tinh sạch và hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch.

Descriptives

Chi tiêu	24 giờ	NaOH (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
							Lower	Upper		
Hàm lượng protein còn lại (%)	30°C	2	3	1.73	0.15	0.09	1.35	2.11	1.60	1.90
		3	3	1.07	0.06	0.03	0.92	1.21	1.00	1.10
		4	3	0.57	0.15	0.09	0.19	0.95	0.40	0.70
		Total	9	1.12	0.52	0.17	0.72	1.52	0.40	1.90
	50°C	2	3	1.17	0.06	0.03	1.02	1.31	1.10	1.20
		3	3	0.27	0.06	0.03	0.12	0.41	0.20	0.30
		4	3	0.13	0.06	0.03	(0.01)	0.28	0.10	0.20
		Total	9	0.52	0.49	0.16	0.15	0.90	0.10	1.20
	70°C	2	3	0.83	0.06	0.03	0.69	0.98	0.80	0.90
		3	3	0.10	0.00	0.00	0.10	0.10	0.10	0.10
		4	3	0.10	0.00	0.00	0.10	0.10	0.10	0.10
		Total	9	0.34	0.37	0.12	0.06	0.63	0.10	0.90
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)	30°C	2	3	30.43	0.21	0.12	29.92	30.95	30.20	30.60
		3	3	25.13	1.74	1.00	20.81	29.45	23.80	27.10
		4	3	24.13	0.80	0.46	22.14	26.13	23.30	24.90
		Total	9	26.57	3.09	1.03	24.19	28.94	23.30	30.60
	50°C	2	3	27.73	0.65	0.38	26.12	29.35	27.10	28.40
		3	3	24.63	0.31	0.18	23.87	25.39	24.30	24.90
		4	3	23.43	0.15	0.09	23.05	23.81	23.30	23.60
		Total	9	25.27	1.96	0.65	23.76	26.77	23.30	28.40
	70°C	2	3	22.23	0.91	0.52	19.98	24.49	21.20	22.90
		3	3	20.83	0.81	0.47	18.81	22.86	19.90	21.40
		4	3	19.77	0.76	0.44	17.89	21.65	18.90	20.30
		Total	9	20.94	1.29	0.43	19.95	21.94	18.90	22.90

ANOVA

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hàm lượng protein còn lại (%)	30°C	Between Groups	2.06	2	1.03	61.67	0.00
		Within Groups	0.10	6	0.02		
		Total	2.16	8			
	50°C	Between Groups	1.90	2	0.95	284.33	0.00
		Within Groups	0.02	6	0.00		
		Total	1.92	8			
	70°C	Between Groups	1.08	2	0.54	484.00	0.00
		Within Groups	0.01	6	0.00		
		Total	1.08	8			
		Between Groups	68.78	2	34.39	27.81	0.00

Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)	30°C	Within Groups	7.42	6	1.24		
		Total	76.20	8			
		Between Groups	29.54	2	14.77	82.06	0.00
	50°C	Within Groups	1.08	6	0.18		
		Total	30.92	8			
		70°C	Between Groups	9.18	2	4.59	6.69
	Within Groups		4.12	6	0.69		
	Total		13.30	8			
			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hàm lượng protein còn lại (%)	NaOH 2%	Between Groups	1.24	2	0.62	62.11	0.00
		Within Groups	0.06	6	0.01		
		Total	1.30	8			
	NaOH 3%	Between Groups	1.60	2	0.80	360.50	0.00
		Within Groups	0.01	6	0.00		
		Total	1.62	8			
	NaOH 4%	Between Groups	0.41	2	0.20	22.88	0.00
		Within Groups	0.05	6	0.01		
		Total	0.46	8			
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)	NaOH 2%	Between Groups	104.78	2	52.39	121.84	0.00
		Within Groups	2.58	6	0.43		
		Total	107.36	8			
	NaOH 3%	Between Groups	33.18	2	16.59	13.17	0.01
		Within Groups	7.56	6	1.26		
		Total	40.74	8			
	NaOH 4%	Between Groups	33.00	2	16.50	39.92	0.00
		Within Groups	2.48	6	0.41		
		Total	35.48	8			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Hàm lượng protein còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05		
30°C, Nồng độ NaOH (%)	N	1	2	3
NaOH 4%	3	0.57		
NaOH 3%	3		1.07	
NaOH 2%	3			1.73
Sig.		1.00	1.00	1.00
Hàm lượng protein còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05		
50°C, Nồng độ NaOH (%)	N	1	2	3
NaOH 4%	3	0.13		
NaOH 3%	3		0.27	
NaOH 2%	3			1.17
Sig.		1.00	1.00	1.00
Hàm lượng protein còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05		
70°C, Nồng độ NaOH (%)	N	1	2	3
NaOH 4%	3	0.10		
NaOH 3%	3	0.10		
NaOH 2%	3		0.83	
Sig.		1.00	1.00	
Hàm lượng protein còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 2%, Nhiệt độ khử protein (°C)	N	1	2	3
70°C	3	0.83		
50°C	3		1.17	
30°C	3			1.73
Sig.		1.00	1.00	1.00
Hàm lượng protein còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 3%, Nhiệt độ khử protein (°C)	N	1	2	3
70°C	3	0.10		
50°C	3		0.27	
30°C	3			1.07
Sig.		0.07	1.00	1.00
Hàm lượng protein còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 4%, Nhiệt độ khử protein (°C)	N	1	2	3
70°C	3	0.10		
50°C	3	0.13		
30°C	3		0.57	
Sig.		0.90	1.00	

Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
30°C, NaOH (%)	N	1	2	
4	3	24.13		
3	3	25.13		
2	3		30.43	
Sig.		0.31	1.00	
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
50°C, NaOH (%)	N	1	2	3
4	3	23.43		
3	3		24.63	
2	3			27.73
Sig.		1.00	1.00	1.00
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
70°C, NaOH (%)	N	1	2	
4	3	19.77		
3	3	20.83	20.83	
2	3		22.23	
Sig.		0.17	0.08	
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 2%, Nhiệt độ	N	1	2	3
70°C	3	22.23		
50°C	3		27.73	
30°C	3			30.43
Sig.		1.00	1.00	1.00
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 3%, Nhiệt độ	N	1	2	
70°C	3	20.83		
50°C	3		24.63	
30°C	3		25.13	
Sig.		1.00	0.61	
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 4%, Nhiệt độ	N	1	2	
70°C	3	19.77		
50°C	3		23.43	
30°C	3		24.13	
Sig.		1.00	0.23	

PL 2.6B. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH, thời gian đến hàm lượng protein còn lại trong chitin tinh sạch.
Descriptives

Chi tiêu	50°C	Thời gian (giờ)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
							Lower	Upper		
Hàm lượng protein còn lại (%)	NaOH 2%	3	3	2.77	0.21	0.12	2.25	3.28	2.60	3.00
		6	3	2.10	0.10	0.06	1.85	2.35	2.00	2.20
		9	3	1.67	0.23	0.13	1.09	2.24	1.40	1.80
		12	3	1.47	0.15	0.09	1.09	1.85	1.30	1.60
		24	3	1.17	0.06	0.03	1.02	1.31	1.10	1.20
		Total	15	1.83	0.59	0.15	1.51	2.16	1.10	3.00
	NaOH 3%	3	3	1.20	0.44	0.25	0.12	2.28	0.90	1.70
		6	3	0.73	0.12	0.07	0.45	1.02	0.60	0.80
		9	3	0.60	0.10	0.06	0.35	0.85	0.50	0.70
		12	3	0.43	0.12	0.07	0.15	0.72	0.30	0.50
		24	3	0.27	0.06	0.03	0.12	0.41	0.20	0.30
		Total	15	0.65	0.38	0.10	0.44	0.85	0.20	1.70
	NaOH 4%	3	3	0.80	0.10	0.06	0.55	1.05	0.70	0.90
		6	3	0.47	0.12	0.07	0.18	0.75	0.40	0.60
		9	3	0.40	0.10	0.06	0.15	0.65	0.30	0.50
		12	3	0.23	0.06	0.03	0.09	0.38	0.20	0.30
		24	3	0.13	0.06	0.03	(0.01)	0.28	0.10	0.20
		Total	15	0.41	0.25	0.06	0.27	0.54	0.10	0.90
	NaOH 2%	3	3	35.43	1.87	1.08	30.78	40.08	33.30	36.80
		6	3	32.07	2.03	1.17	27.02	37.11	30.70	34.40
		9	3	31.73	2.29	1.32	26.03	37.43	29.10	33.30
		12	3	28.00	0.80	0.46	26.01	29.99	27.20	28.80
		24	3	27.73	0.65	0.38	26.12	29.35	27.10	28.40
		Total	15	30.99	3.28	0.85	29.18	32.81	27.10	36.80
		3	3	27.73	1.32	0.76	24.45	31.01	26.30	28.90

Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)	NaOH 3%	6	3	26.30	1.30	0.75	23.07	29.53	25.50	27.80
		9	3	25.00	0.44	0.25	23.92	26.08	24.70	25.50
		12	3	24.90	0.36	0.21	24.00	25.80	24.60	25.30
		24	3	24.63	0.31	0.18	23.87	25.39	24.30	24.90
		Total	15	25.71	1.41	0.37	24.93	26.50	24.30	28.90
	NaOH 4%	3	3	26.60	0.26	0.15	25.94	27.26	26.30	26.80
		6	3	25.77	0.71	0.41	24.00	27.53	25.00	26.40
		9	3	24.70	0.62	0.36	23.15	26.25	24.00	25.20
		12	3	24.10	0.62	0.36	22.55	25.65	23.40	24.60
		24	3	23.43	0.15	0.09	23.05	23.81	23.30	23.60
		Total	15	24.92	1.26	0.32	24.22	25.62	23.30	26.80

ANOVA

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hàm lượng protein còn lại (%)	NaOH 2%	Between Groups	4.65	4	1.16	43.56	0.00
		Within Groups	0.27	10	0.03		
		Total	4.91	14			
	NaOH 3%	Between Groups	1.52	4	0.38	8.25	0.00
		Within Groups	0.46	10	0.05		
		Total	1.98	14			
	NaOH 4%	Between Groups	0.79	4	0.20	24.67	0.00
		Within Groups	0.08	10	0.01		
		Total	0.87	14			
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)	NaOH 2%	Between Groups	123.00	4	30.75	11.02	0.00
		Within Groups	27.91	10	2.79		
		Total	150.91	14			
	NaOH 3%	Between Groups	20.28	4	5.07	6.59	0.01
		Within Groups	7.69	10	0.77		
		Total	27.98	14			
	NaOH 4%	Between Groups	19.41	4	4.85	17.62	0.00
		Within Groups	2.75	10	0.28		
		Total	22.16	14			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Hàm lượng protein còn lại (%)			Subset for alpha = 0.05			
NaOH 2%, Thời gian khử protein (giờ)	N		1	2	3	4
24	3		1.17			
12	3			1.47		
9	3			1.67		
6	3				2.10	
3	3					2.77
Sig.			1.00	0.16	1.00	1.00
Hàm lượng protein còn lại (%)			Subset for alpha = 0.05			
NaOH 3%, Thời gian khử protein (giờ)	N		1	2	3	
24	3		0.27			
12	3		0.43	0.43		
9	3		0.60	0.60		
6	3			0.73		
3	3				1.20	
Sig.			0.10	0.13	1.00	
Hàm lượng protein còn lại (%)			Subset for alpha = 0.05			
NaOH 4%, Thời gian khử protein (giờ)	N		1	2	3	
24	3		0.13			
12	3		0.23			
9	3			0.40		
6	3			0.47		
3	3				0.80	
Sig.			0.20	0.38	1.00	
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)			Subset for alpha = 0.05			
NaOH 2%, Thời gian (giờ)	N		1	2	3	
24	3		27.73			
12	3		28.00			
9	3			31.73		
6	3			32.07		
3	3				35.43	

Sig.		0.85	0.81	1.00
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 3%, Thời gian (giờ)	N	1	2	
24	3	24.63		
12	3	24.90		
9	3	25.00		
6	3	26.30	26.30	
3	3		27.73	
Sig.		0.06	0.07	
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 4%, Thời gian (giờ)	N	1	2	3
24	3	23.43		
12	3	24.10	24.10	
9	3		24.70	
6	3			25.77
3	3			26.60
Sig.		0.15	0.19	0.08

Phụ lục 2.7. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH, nhiệt độ, thời gian khử protein và trạng thái nguyên liệu ướt hàm lượng protein còn lại trong chitin tinh sạch và hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch.

	Hàm lượng protein còn lại (%)			Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		
24 giờ	NaOH 2%	NaOH 3%	NaOH 4%	NaOH 2%	NaOH 3%	NaOH 4%
30°C	1,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	32,6 ± 1,4	31,1 ± 1,5	31,0 ± 1,7
50°C	1,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	30,8 ± 1,5	30,7 ± 1,8	27,0 ± 0,7
70°C	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	23,8 ± 0,9	20,6 ± 0,9	19,2 ± 1,0
	Hàm lượng protein còn lại (%)			Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		
50°C	NaOH 2%	NaOH 3%	NaOH 4%	NaOH 2%	NaOH 3%	NaOH 4%
3 h	2,8 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,1	39,9 ± 0,7	34,7 ± 3,7	32,6 ± 3,4
6 h	1,8 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	36,4 ± 0,4	32,4 ± 2,2	27,4 ± 1,0
9h	1,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	35,6 ± 2,3	32,3 ± 2,5	27,3 ± 0,6
12 h	1,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	33,1 ± 2,1	31,9 ± 2,5	27,3 ± 0,7
24 h	1,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	30,8 ± 1,5	30,7 ± 1,8	27,0 ± 0,7

PL2.7A. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH, nhiệt độ đến hàm lượng protein còn lại trong chitin tinh sạch và hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch.

Descriptives

Chi tiêu	24 giờ	NaOH (%)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
							Lower	Upper		
Hàm lượng protein còn lại (%)	30°C	2	3	1.57	0.15	0.09	1.19	1.95	1.40	1.70
		3	3	1.00	0.10	0.06	0.75	1.25	0.90	1.10
		4	3	0.47	0.06	0.03	0.32	0.61	0.40	0.50
		Total	9	1.01	0.49	0.16	0.64	1.38	0.40	1.70
	50°C	2	3	1.13	0.12	0.07	0.85	1.42	1.00	1.20
		3	3	0.20	0.10	0.06	(0.05)	0.45	0.10	0.30
		4	3	0.13	0.06	0.03	(0.01)	0.28	0.10	0.20
		Total	9	0.49	0.49	0.16	0.11	0.87	0.10	1.20
	70°C	2	3	0.57	0.06	0.03	0.42	0.71	0.50	0.60
		3	3	0.13	0.06	0.03	(0.01)	0.28	0.10	0.20
		4	3	0.10	0.00	0.00	0.10	0.10	0.10	0.10
		Total	9	0.27	0.23	0.08	0.09	0.44	0.10	0.60
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)	30°C	2	3	32.57	1.72	0.99	28.29	36.84	30.60	33.80
		3	3	31.30	1.87	1.08	26.66	35.94	29.30	33.00
		4	3	30.97	2.08	1.20	25.80	36.13	28.60	32.50
		Total	9	31.61	1.80	0.60	30.23	32.99	28.60	33.80
	50°C	2	3	30.77	1.86	1.07	26.14	35.39	28.80	32.50
		3	3	30.70	2.18	1.26	25.29	36.11	28.20	32.20
		4	3	26.97	0.85	0.49	24.85	29.08	26.10	27.80
		Total	9	29.48	2.40	0.80	27.63	31.33	26.10	32.50
	70°C	2	3	23.83	1.10	0.63	21.11	26.56	22.60	24.70
		3	3	20.63	1.10	0.64	17.90	23.37	19.50	21.70
		4	3	19.23	1.15	0.67	16.36	22.10	17.90	19.90
		Total	9	21.23	2.26	0.75	19.50	22.97	17.90	24.70

ANOVA

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hàm lượng protein còn lại (%)	30°C	Between Groups	1.82	2	0.91	74.27	0.00
		Within Groups	0.07	6	0.01		
		Total	1.89	8			
	50°C	Between Groups	1.88	2	0.94	105.50	0.00
		Within Groups	0.05	6	0.01		
		Total	1.93	8			
	70°C	Between Groups	0.41	2	0.20	91.50	0.00
		Within Groups	0.01	6	0.00		
		Total	0.42	8			
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)	30°C	Between Groups	4.28	2	2.14	0.60	0.58
		Within Groups	21.55	6	3.59		
		Total	25.83	8			
	50°C	Between Groups	28.38	2	14.19	4.76	0.06
		Within Groups	17.87	6	2.98		
		Total	46.26	8			
	70°C	Between Groups	33.36	2	16.68	13.34	0.01
		Within Groups	7.50	6	1.25		
		Total	40.86	8			
			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hàm lượng protein còn lại (%)	NaOH 2%	Between Groups	1.51	2	0.75	56.58	0.00
		Within Groups	0.08	6	0.01		
		Total	1.59	8			
	NaOH 3%	Between Groups	1.40	2	0.70	89.71	0.00
		Within Groups	0.05	6	0.01		
		Total	1.44	8			
	NaOH 4%	Between Groups	0.25	2	0.12	55.50	0.00
		Within Groups	0.01	6	0.00		
		Total	0.26	8			
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)	NaOH 2%	Between Groups	127.58	2	63.79	25.08	0.00
		Within Groups	15.26	6	2.54		
		Total	142.84	8			
	NaOH 3%	Between Groups	215.48	2	107.74	34.19	0.00
		Within Groups	18.91	6	3.15		
		Total	234.38	8			
	NaOH 4%	Between Groups	213.48	2	106.74	50.19	0.00
		Within Groups	12.76	6	2.13		
		Total	226.24	8			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Hàm lượng protein còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05		
30°C, Nồng độ NaOH (%)	N	1	2	3
NaOH 4%	3	0.47		
NaOH 3%	3		1.00	
NaOH 2%	3			1.57
Sig.		1.00	1.00	1.00
Hàm lượng protein còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05		
50°C, Nồng độ NaOH (%)	N	1	2	
NaOH 4%	3	0.13		
NaOH 3%	3	0.20		
NaOH 2%	3		1.13	
Sig.		0.42	1.00	
Hàm lượng protein còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05		
70°C, Nồng độ NaOH (%)	N	1	2	
NaOH 4%	3	0.10		
NaOH 3%	3	0.13		
NaOH 2%	3		0.57	
Sig.		0.42	1.00	
Hàm lượng protein còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 2%, Nhiệt độ khử protein (°C)	N	1	2	3
70°C	3	0.57		
50°C	3		1.13	
30°C	3			1.57
Sig.		1.00	1.00	1.00
Hàm lượng protein còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 3%, Nhiệt độ khử protein (°C)	N	1	2	

70°C	3	0.13		
50°C	3	0.20		
30°C	3		1.00	
Sig.		0.39	1.00	
NaOH 4%, Nhiệt độ khử protein (°C)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 4%, Nhiệt độ	N	1	2	
70°C	3	0.10		
50°C	3	0.13		
30°C	3		0.47	
Sig.		0.42	1.00	

Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
30°C, NaOH (%)	N	1		
4	3	30.97		
3	3	31.30		
2	3	32.57		
Sig.		0.36		
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
50°C, NaOH (%)	N	1	2	
4	3	26.97		
3	3		30.70	
2	3		30.77	
Sig.		1.00	0.96	
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
70°C, NaOH (%)	N	1	2	
4	3	19.23		
3	3	20.63		
2	3		23.83	
Sig.		0.18	1.00	
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 2%, Nhiệt độ	N	1	2	
70°C	3	23.83		
50°C	3		30.77	
30°C	3		32.57	
Sig.		1.00	0.22	
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 3%, Nhiệt độ	N	1	2	
70°C	3	20.63		
50°C	3		30.70	
30°C	3		31.30	
Sig.		1.00	0.69	
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 4%, Nhiệt độ	N	1	2	3
70°C	3	19.23		
50°C	3		26.97	
30°C	3			30.97
Sig.		1.00	1.00	1.00

PL 2.7B. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH, thời gian đến hàm lượng protein còn lại trong chitin tinh sạch và hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch.

Descriptives

Chỉ tiêu	50°C	Thời gian (giờ)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
							Lower	Upper		
Hàm lượng protein còn lại (%)	NaOH 2%	3	3	2.83	0.23	0.13	2.26	3.41	2.70	3.10
		6	3	1.77	0.25	0.15	1.14	2.39	1.50	2.00
		9	3	1.40	0.10	0.06	1.15	1.65	1.30	1.50
		12	3	1.30	0.10	0.06	1.05	1.55	1.20	1.40
		24	3	1.13	0.12	0.07	0.85	1.42	1.00	1.20
		Total	15	1.69	0.65	0.17	1.33	2.05	1.00	3.10
	NaOH 3%	3	3	1.03	0.15	0.09	0.65	1.41	0.90	1.20
		6	3	0.05	0.10	0.06	0.25	0.75	0.40	0.60
		9	3	0.27	0.06	0.03	0.12	0.41	0.20	0.30
		12	3	0.20	0.10	0.06	(0.05)	0.45	0.10	0.30
		24	3	0.20	0.10	0.06	(0.05)	0.45	0.10	0.30
		Total	15	0.44	0.34	0.09	0.25	0.63	0.10	1.20
		3	3	0.70	0.17	0.10	0.27	1.13	0.50	0.80

	NaOH 4%	6	3	0.30	0.10	0.06	0.05	0.55	0.20	0.40
		9	3	0.19	0.08	0.04	(0.00)	0.37	0.10	0.24
		12	3	0.16	0.08	0.04	(0.03)	0.34	0.07	0.20
		24	3	0.11	0.05	0.03	(0.02)	0.24	0.05	0.15
		Total	15	0.29	0.24	0.06	0.16	0.42	0.05	0.80
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)	NaOH 2%	3	3	39.90	0.92	0.53	37.62	42.18	39.10	40.90
		6	3	36.37	0.51	0.30	35.09	37.64	35.80	36.80
		9	3	35.57	2.76	1.60	28.70	42.43	32.40	37.50
		12	3	33.17	2.57	1.48	26.78	39.55	31.30	36.10
		24	3	30.77	1.86	1.07	26.14	35.39	28.80	32.50
		Total	15	35.15	3.58	0.93	33.17	37.14	28.80	40.90
	NaOH 3%	3	3	34.70	4.50	2.60	23.51	45.89	29.50	37.30
		6	3	32.47	2.75	1.59	25.64	39.29	29.40	34.70
		9	3	32.37	3.04	1.76	24.81	39.93	28.90	34.60
		12	3	31.93	3.06	1.76	24.34	39.52	28.60	34.60
		24	3	30.70	2.18	1.26	25.29	36.11	28.20	32.20
		Total	15	32.43	3.02	0.78	30.76	34.10	28.20	37.30
	NaOH 4%	3	3	32.63	4.14	2.39	22.36	42.91	28.10	36.20
		6	3	27.37	1.25	0.72	24.26	30.47	26.10	28.60
		9	3	27.33	0.76	0.44	25.44	29.23	26.50	28.00
		12	3	27.27	0.80	0.46	25.27	29.26	26.50	28.10
		24	3	26.97	0.85	0.49	24.85	29.08	26.10	27.80
		Total	15	28.31	2.82	0.73	26.75	29.88	26.10	36.20

ANOVA

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hàm lượng protein còn lại (%)	NaOH 2%	Between Groups	5.58	4	1.39	46.48	0.00
		Within Groups	0.30	10	0.03		
		Total	5.88	14			
	NaOH 3%	Between Groups	1.50	4	0.38	33.15	0.00
		Within Groups	0.11	10	0.01		
		Total	1.62	14			
	NaOH 4%	Between Groups	0.69	4	0.17	15.86	0.00
		Within Groups	0.11	10	0.01		
		Total	0.80	14			
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)	NaOH 2%	Between Groups	142.09	4	35.52	9.44	0.00
		Within Groups	37.65	10	3.76		
		Total	179.74	14			
	NaOH 3%	Between Groups	25.19	4	6.30	0.62	0.66
		Within Groups	102.34	10	10.23		
		Total	127.53	14			
	NaOH 4%	Between Groups	70.28	4	17.57	4.26	0.03
		Within Groups	41.23	10	0.03		
		Total	111.52	14			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Hàm lượng protein còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 2%, Thời gian khử protein (giờ)	N	1	2	3
24	3	1.13		
12	3	1.30		
9	3	1.40		
6	3		1.77	
3	3			2.83
Sig.		0.10	1.00	1.00
Hàm lượng protein còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 3%, Thời gian khử protein (giờ)	N	1	2	3
24	3	0.20		
12	3	0.20		
9	3	0.27		
6	3		0.50	
3	3			1.03
Sig.		0.48	1.00	1.00
Hàm lượng protein còn lại (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 4%, Thời gian khử protein (giờ)	N	1	2	3
24	3	0.11		

12	3	0.16		
9	3	0.19		
6	3	0.30		
3	3		0.70	
Sig.		0.06	1.00	

Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 2%, Thời gian (giờ)	N	1	2	3
24	3	30.77		
12	3	33.17	33.17	
9	3		35.57	
6	3		36.37	
3	3			39.90
Sig.		0.16	0.08	1.00
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 3%, Thời gian (giờ)	N	1		
24	3	30.70		
12	3	31.93		
9	3	32.37		
6	3	32.47		
3	3	34.70		
Sig.		0.19		
Hiệu suất thu hồi chitin tinh sạch (%)		Subset for alpha = 0.05		
NaOH 4%, Thời gian (giờ)	N	1		
24	3	26.97		
12	3	27.27		
9	3	27.33		
6	3	27.37		
3	3		32.63	
Sig.		0.83	1.00	

PL 2.8. Ảnh hưởng của điều kiện sản xuất chitosan (nhiệt độ và thời gian xử lý) đến độ deacetyl, độ tan, độ nhớt, hiệu suất thu hồi chitosan, hàm lượng khoáng và protein còn lại.

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (h)	Độ deacetyl (%)	Độ tan (%)	Độ nhớt (cP)	HSTH Chitosan (%)	Khoáng (%)	Protein (%)
80	12	83,5 ± 1,4	97,0 ± 0,8	1,227 ± 38	24,2 ± 2,5	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,0
	24	86,7 ± 0,7	99,0 ± 0,1	986 ± 24	23,6 ± 2,9	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,0
	36	90,2 ± 1,7	99,0 ± 0,2	639 ± 32	23,3 ± 3,0	0,3 ± 0,1	0,0 ± 0,0
90	12	86,1 ± 0,1	97,7 ± 0,7	558 ± 51	24,2 ± 2,6	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1
	24	89,2 ± 1,6	99,0 ± 0,2	479 ± 72	23,0 ± 2,4	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
	36	90,5 ± 1,3	99,1 ± 0,2	342 ± 13	22,1 ± 3,3	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0

Descriptives

80°C	Thời gian (giờ)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
Độ deacetyl (%)	12	3	83.45	1.77	1.02	79.06	87.85	82.12	85.46
	24	3	86.71	0.90	0.52	84.46	88.95	85.67	87.33
	36	3	90.24	2.03	1.17	85.21	95.27	88.65	92.52
	Total	9	86.80	3.26	1.09	84.29	89.31	82.12	92.52
Độ tan (%)	12	3	97.03	1.02	0.59	94.50	99.57	96.30	98.20
	24	3	98.97	0.12	0.07	98.68	99.25	98.90	99.10
	36	3	99.03	0.21	0.12	98.52	99.55	98.80	99.20
	Total	9	98.34	1.11	0.37	97.49	99.20	96.30	99.20
Độ nhớt (cP)	12	3	1,227.00	46.12	26.63	1,112.43	1,341.57	1,174.00	1,258.00
	24	3	986.00	29.44	17.00	912.85	1,059.15	952.00	1,003.00
	36	3	639.33	39.00	22.52	542.44	736.23	600.00	678.00
	Total	9	950.78	258.03	86.01	752.44	1,149.12	600.00	1,258.00
Hiệu suất thu hồi chitosan (%)	12	3	24.17	3.01	1.74	16.69	31.64	21.30	27.30
	24	3	23.60	3.48	2.01	14.96	32.24	19.90	26.80
	36	3	23.23	3.62	2.09	14.23	32.23	19.40	26.60
	Total	9	23.67	2.96	0.99	21.40	25.94	19.40	27.30
	12	3	0.53	0.12	0.07	0.25	0.82	0.40	0.60
	24	3	0.53	0.06	0.03	0.39	0.68	0.50	0.60

Hàm lượng khoáng còn lại (%)	36	3	0.33	0.12	0.07	0.05	0.62	0.20	0.40
	Total	9	0.47	0.13	0.04	0.36	0.57	0.20	0.60
Hàm lượng protein còn lại (%)	12	3	0.11	0.04	0.02	0.01	0.21	0.06	0.13
	24	3	0.07	0.01	0.00	0.05	0.08	0.06	0.07
	36	3	0.02	0.02	0.01	(0.02)	0.06	0.01	0.04
	Total	9	0.06	0.04	0.01	0.03	0.10	0.01	0.13

90°C	Thời gian (giờ)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
Độ deacetyl (%)	12	3	86.05	0.07	0.04	85.88	86.22	86.00	86.13
	24	3	89.23	1.91	1.10	84.49	93.96	87.21	91.00
	36	3	90.51	1.58	0.91	86.60	94.43	88.81	91.92
	Total	9	88.60	2.34	0.78	86.80	90.40	86.00	91.92
Độ tan (%)	12	3	97.73	0.86	0.50	95.59	99.88	96.80	98.50
	24	3	99.03	0.25	0.15	98.41	99.66	98.80	99.30
	36	3	99.07	0.21	0.12	98.55	99.58	98.90	99.30
	Total	9	98.61	0.80	0.27	97.99	99.23	96.80	99.30
Độ nhớt (cP)	12	3	558.33	62.79	36.25	402.36	714.31	513.00	630.00
	24	3	479.67	88.64	51.17	259.48	699.85	427.00	582.00
	36	3	342.33	16.50	9.53	301.34	383.33	324.00	356.00
	Total	9	460.11	109.46	36.49	375.97	544.25	324.00	630.00
Hiệu suất thu hồi chitosan (%)	12	3	24.23	3.25	1.88	16.16	32.31	20.70	27.10
	24	3	23.00	2.94	1.70	15.69	30.31	19.60	24.70
	36	3	22.10	4.01	2.32	12.13	32.07	17.90	25.90
	Total	9	23.11	3.11	1.04	20.72	25.51	17.90	27.10
Hàm lượng khoáng còn lại (%)	12	3	0.30	0.20	0.12	(0.20)	0.80	0.10	0.50
	24	3	0.20	0.10	0.06	(0.05)	0.45	0.10	0.30
	36	3	0.10	-	-	0.10	0.10	0.10	0.10
	Total	9	0.20	0.14	0.05	0.09	0.31	0.10	0.50
Hàm lượng protein còn lại (%)	12	3	0.15	0.10	0.06	(0.09)	0.39	0.04	0.21
	24	3	0.10	0.06	0.04	(0.05)	0.25	0.03	0.14
	36	3	0.09	0.01	0.01	0.07	0.11	0.08	0.10
	Total	9	0.11	0.06	0.02	0.06	0.16	0.03	0.21

ANOVA

80°C		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Độ deacetyl (%)	Between Groups	69.13	2	34.564	12.885	0.007
	Within Groups	16.09	6	2.682		
	Total	85.22	8			
Độ tan (%)	Between Groups	7.74	2	3.871	10.558	0.011
	Within Groups	2.20	6	0.367		
	Total	9.94	8			
Độ nhớt (cP)	Between Groups	523,610.89	2	261805.444	173.944	0.000
	Within Groups	9,030.67	6	1505.111		
	Total	532,641.56	8			
Hiệu suất thu hồi chitosan (%)	Between Groups	1.33	2	0.663	0.058	0.944
	Within Groups	68.53	6	11.422		
	Total	69.86	8			
Hàm lượng khoáng còn lại (%)	Between Groups	0.08	2	0.040	4.000	0.079
	Within Groups	0.06	6	0.010		
	Total	0.14	8			
Hàm lượng protein còn lại (%)	Between Groups	0.01	2	0.006	8.610	0.017
	Within Groups	0.00	6	0.001		
	Total	0.02	8			
90°C		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Độ deacetyl (%)	Between Groups	31.62	2	15.81	7.74	0.02
	Within Groups	12.25	6	2.04		
	Total	43.87	8			
Độ tan (%)	Between Groups	3.47	2	1.73	6.12	0.04
	Within Groups	1.70	6	0.28		
	Total	5.17	8			
Độ nhớt (cP)	Between Groups	71,704.89	2	35,852.44	8.91	0.02
	Within Groups	24,142.00	6	4,023.67		

	Total	95,846.89	8			
Hiệu suất thu hồi chitosan (%)	Between Groups	6.88	2	3.44	0.29	0.76
	Within Groups	70.73	6	11.79		
	Total	77.61	8			
Hàm lượng khoáng còn lại (%)	Between Groups	0.06	2	0.03	1.80	0.24
	Within Groups	0.10	6	0.02		
	Total	0.16	8			
Hàm lượng protein còn lại (%)	Between Groups	0.01	2	0.00	0.72	0.52
	Within Groups	0.03	6	0.00		
	Total	0.03	8			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Độ deacetyl (%)			Subset for alpha = 0.05		
Nhiệt độ (°C)	Thời gian (h)	N	1	2	
80°C	12	3	83.45		
	24	3	86.71		
	36	3		90.24	
	Sig.		0.05	1.00	
90°C	12	3	86.05		
	24	3		89.23	
	36	3		90.51	
	Sig.		1.00	0.31	
Độ tan (%)			Subset for alpha = 0.05		
Nhiệt độ (°C)	Thời gian (h)	N	1	2	
80°C	12	3	97.03		
	24	3		98.97	
	36	3		99.03	
	Sig.		1.00	0.90	
90°C	12	3	97.73		
	24	3		99.03	
	36	3		99.07	
	Sig.		1.00	0.94	
Độ nhớt (cP)			Subset for alpha = 0.05		
Nhiệt độ (°C)	Thời gian (h)	N	1	2	3
80°C	36	3	639.33		
	24	3		986.00	
	12	3			1,227.00
	Sig.		1.00	1.00	1.00
90°C	36	3	342.33		
	24	3		479.67	
	12	3		558.33	
	Sig.		1.00	0.18	
Hiệu suất thu hồi chitosan (%)			Subset for alpha = 0.05		
Nhiệt độ (°C)	Thời gian (h)	N	1		
80°C	36	3	23.23		
	24	3	23.60		
	12	3	24.17		
	Sig.		0.75		
90°C	36	3	22.10		
	24	3	23.00		
	12	3	24.23		
	Sig.		0.49		
Hàm lượng khoáng còn lại (%)			Subset for alpha = 0.05		
Nhiệt độ (°C)	Thời gian (h)	N	1		
80	36	3	0.33		
	24	3	0.53		
	12	3	0.53		
	Sig.		0.06		
90	36	3	0.10		
	24	3	0.20		
	12	3	0.30		
	Sig.		0.12		
Hàm lượng protein còn lại (%)			Subset for alpha = 0.05		
Nhiệt độ (°C)	Thời gian (h)	N	1	2	
80	36	3	0.02		
	24	3	0.07		0.07
	12	3			0.11

	Sig.		0.07	0.10
90	36	3	0.09	
	24	3	0.10	
	12	3	0.15	
	Sig.		0.32	

PL 2.9. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol của hỗn hợp dung môi ethanol/nước đến độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate.

Descriptives

Chi tiêu	Nồng độ EtOH/H ₂ O	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
Độ trương (%)	0	3	505.97	34.66	20.01	419.88	592.06	466.00	527.70
	10	3	504.00	34.12	19.70	419.25	588.75	464.70	526.00
	20	3	501.17	33.99	19.63	416.72	585.61	462.10	524.00
	30	3	493.63	32.95	19.02	411.78	575.49	455.60	513.60
	40	3	474.43	28.51	16.46	403.61	545.25	450.10	505.80
	50	3	466.73	17.63	10.18	422.95	510.52	452.10	486.30
	60	3	452.33	5.81	3.35	437.91	466.76	445.70	456.50
	70	3	450.60	7.92	4.57	430.93	470.27	441.60	456.50
	80	3	428.83	2.38	1.37	422.92	434.75	426.70	431.40
	90	3	402.27	4.11	2.37	392.06	412.48	398.00	406.20
	Total	30	468.00	39.18	7.15	453.37	482.63	398.00	527.70
Độ tan (%)	ĐC (Không trương)	3	83.67	2.51	1.45	77.42	89.91	81.70	86.50
	50	3	98.17	1.10	0.64	95.43	100.90	97.10	99.30
	60	3	98.33	1.68	0.97	94.16	102.51	96.50	99.80
	70	3	98.13	0.55	0.32	96.77	99.50	97.10	99.10
	80	3	97.93	1.04	0.60	95.35	100.52	97.10	99.10
	90	3	96.30	0.36	0.21	95.40	97.20	96.00	96.70
	Total	18	95.42	5.58	1.32	92.65	98.20	81.70	99.80
Hiệu suất thu hồi (%)	ĐC (Không trương)	3	138.30	4.00	2.31	128.35	148.25	134.40	142.40
	50	3	132.07	1.45	0.84	128.47	135.66	140.10	146.60
	60	3	143.57	3.27	1.89	135.44	151.69	140.10	146.60
	70	3	151.00	1.82	1.05	146.47	155.53	148.90	152.20
	80	3	151.63	0.55	0.32	150.27	153.00	151.00	152.00
	90	3	146.30	6.15	3.55	131.03	161.57	139.20	149.90
	Total	18	143.81	7.68	1.81	139.99	147.63	130.40	152.20

ANOVA

Chi tiêu		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Độ trương (%)	Between Groups	32821.98	9	3646.89	6.24	0.00
	Within Groups	11697.35	20	584.87		
	Total	44519.33	29			
Độ tan (%)	Between Groups	505.88	5	101.18	51.11	0.00
	Within Groups	23.75	12	1.98		
	Total	529.63	17			
Hiệu suất thu hồi (%)	Between Groups	862.28	5	172.46	14.73	0.00
	Within Groups	140.54	12	11.71		
	Total	1002.82	17			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Độ trương (%)		Subset for alpha = 0.05			
Nồng độ EtOH/H ₂ O (%)	N	1	2	3	4
90	3	402.27			
80	3	428.83	428.83		
70	3		450.60	450.60	
60	3		452.33	452.33	
50	3		466.73	466.73	466.73
40	3			474.43	474.43
30	3			493.63	493.63
20	3				501.17
10	3				504.00
0	3				505.97

Sig.		0.19	0.09	0.06	0.09
Độ tan (%)		Subset for alpha = 0.05			
Nồng độ EtOH/H ₂ O (%)	N	1	2	3	4
ĐC (Không tương)	3	83.67			
90	3		96.30		
80	3		97.93		
70	3		98.13		
50	3		98.17		
60	3		98.33		
Sig.		1.00	0.13		
Hiệu suất thu hồi (%)		Subset for alpha = 0.05			
Nồng độ EtOH/H ₂ O (%)	N	1	2	3	4
50	3	132.07			
ĐC (Không tương)	3		138.30		
60	3		143.57	143.57	
90	3			146.30	146.30
70	3				151.00
80	3				151.63
Sig.		1.00	0.08	0.35	0.09

PL 2.10. Ảnh hưởng của thời gian ngâm chitosan đến độ trương nở của chitosan, độ tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate.

Descriptives

Chỉ tiêu	Thời gian trương nở (giờ)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
Độ trương (%)	0,25	3	425.20	3.94	2.27	415.42	434.98	422.40	429.70
	0,5	3	445.63	4.10	2.37	435.45	455.82	440.90	448.00
	1	3	446.33	3.31	1.91	438.12	454.55	442.90	449.50
	2	3	447.80	3.47	2.00	439.19	456.41	443.80	449.90
	3	3	448.30	1.85	1.07	443.70	452.90	446.20	449.70
	4	3	451.17	3.99	2.30	441.26	461.07	446.90	454.80
	6	3	450.93	7.89	4.56	431.33	470.54	441.90	456.50
	8	3	445.67	4.60	2.65	434.25	457.08	440.50	449.30
	10	3	445.43	2.71	1.56	438.70	452.16	442.60	448.00
	12	3	445.80	3.83	2.21	436.28	455.32	441.40	448.40
Độ tan (%)	Total	30	445.23	7.92	1.45	442.27	448.19	422.40	456.50
	0,25	3	90.67	2.15	1.24	85.33	96.01	88.30	92.50
	0,5	3	93.83	2.06	1.19	88.73	98.94	92.50	96.20
	1	3	94.40	1.82	1.05	89.88	98.92	93.30	96.50
	2	3	94.90	1.30	0.75	91.67	98.13	94.10	96.40
	3	3	95.03	1.31	0.75	91.79	98.28	93.80	96.40
	4	3	98.53	0.35	0.20	97.66	99.41	98.20	98.90
	6	3	98.10	0.46	0.26	96.96	99.24	97.60	98.50
	8	3	98.13	0.31	0.18	97.37	98.89	97.80	98.40
	10	3	97.80	1.01	0.59	95.28	100.32	96.70	98.70
Hiệu suất thu hồi (%)	12	3	96.13	0.47	0.27	94.96	97.31	95.60	96.50
	Total	30	95.75	2.64	0.48	94.77	96.74	88.30	98.90
	0,25	3	140.40	4.23	2.44	129.89	150.91	136.90	145.10
	0,5	3	143.93	3.00	1.73	136.49	151.37	140.60	146.40
	1	3	144.53	5.14	2.97	131.76	157.30	138.70	148.40
	2	3	146.20	3.49	2.01	137.54	154.86	142.20	148.60
	3	3	147.73	3.74	2.16	138.44	157.03	143.50	150.60
	4	3	151.13	2.70	1.56	144.42	157.85	148.50	153.90
	6	3	151.00	1.99	1.15	146.05	155.95	148.70	152.20
	8	3	148.73	3.28	1.89	140.58	156.88	146.50	152.50
Hiệu suất thu hồi (%)	10	3	148.23	4.84	2.80	136.21	160.26	143.80	153.40
	12	3	147.53	3.45	1.99	138.96	156.11	143.70	150.40
	Total	30	146.94	4.43	0.81	145.29	148.60	136.90	153.90

ANOVA

Chỉ tiêu		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Độ trương (%)	Between Groups	1460.82	9	162.31	9.02	0.00
	Within Groups	360.06	20	18.00		
	Total	1820.88	29			

Độ tan (%)	Between Groups	167.61	9	18.62	10.81	0.00
	Within Groups	34.46	20	1.72		
	Total	202.07	29			
Hiệu suất thu hồi (%)	Between Groups	294.27	9	32.70	2.39	0.05
	Within Groups	273.71	20	13.69		
	Total	567.97	29			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Độ trương nở (%)		Subset for alpha = 0.05			
Thời gian trương nở (giờ)	N	1	2	3	4
0,25	3	425.20			
10	3		445.43		
0,5	3		445.63		
8	3		445.67		
12	3		445.80		
1	3		446.33		
2	3		447.80		
3	3		448.30		
6	3		450.93		
4	3		451.17		
Sig.		1.00	0.81		
Độ tan (%)		Subset for alpha = 0.05			
Thời gian trương nở (giờ)	N	1	2	3	4
0,25	3	90.67			
0,5	3	93.83	93.83		
1	3	94.40	94.40	94.40	
2	3		94.90	94.90	94.90
3	3		95.03	95.03	95.03
12	3		96.13	96.13	96.13
10	3			97.80	97.80
6	3			98.10	98.10
8	3			98.13	98.13
4	3				98.53
Sig.		0.06	0.52	0.06	0.07
Hiệu suất thu hồi (%)		Subset for alpha = 0.05			
Thời gian trương nở (giờ)	N	1	2	3	4
0,25	3	140.40			
0,5	3	143.93	143.93		
1	3	144.53	144.53		
2	3	146.20	146.20		
12	3	147.53	147.53		
3	3	147.73	147.73		
10	3	148.23	148.23		
8	3	148.73	148.73		
6	3	151.00	151.00		
4	3		151.13		
Sig.		0.05	0.38		

PL 2.11. Ảnh hưởng của nồng độ acid phản ứng đến độ tan, hiệu suất thu hồi chitosan lactate.

Descriptives

Chỉ tiêu	Nồng độ acid lactic (M)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
Độ tan (%)	0,5	3	56.17	3.23	1.87	48.13	64.20	54.20	59.90
	0,6	3	72.83	3.30	1.91	64.63	81.04	69.60	76.20
	0,7	3	83.23	3.27	1.89	75.11	91.36	79.50	85.60
	0,8	3	92.63	1.98	1.15	87.71	97.56	90.37	94.07
	0,9	3	95.40	1.04	0.60	92.82	97.98	94.20	96.00
	1,0	3	98.47	0.25	0.15	97.84	99.09	98.20	98.70
	1,5	3	98.83	0.12	0.07	98.55	99.12	98.70	98.90
	Total	21	85.37	15.23	3.32	78.44	92.30	54.20	98.90
	0,5	3	114.37	7.92	4.57	94.71	134.04	108.84	123.44
	0,6	3	131.95	5.41	3.12	118.51	145.39	125.72	135.44
	0,7	3	140.47	1.42	0.82	136.94	143.99	139.20	142.00
	0,8	3	141.70	1.41	0.81	138.20	145.20	140.20	143.00

Hiệu suất thu hồi (%)	0,9	3	144.07	2.00	1.16	139.09	149.04	141.80	145.60
	1,0	3	151.73	2.25	1.30	146.13	157.33	149.40	153.90
	1,5	3	152.10	1.41	0.81	148.60	155.60	150.80	153.60
	Total	21	139.48	12.81	2.80	133.65	145.32	108.84	153.90

ANOVA

Chỉ tiêu		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Độ tan (%)	Between Groups	4562.13	6	760.35	143.22	0.00
	Within Groups	74.32	14.00	5.31		
	Total	4636.45	20.00			
Hiệu suất thu hồi (%)	Between Groups	3070.03	6	511.67	33.47	0.00
	Within Groups	214.04	14.00	15.29		
	Total	3284.07	20.00			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Độ tan (%)		Subset for alpha = 0.05				
Nồng độ acid lactic (M)	N	1	2	3	4	5
0,5	3	56.17				
0,6	3		72.83			
0,7	3			83.23		
0,8	3				92.63	
0,9	3				95.40	95.40
1,0	3					98.47
1,5	3					98.83
Sig.		1.00	1.00	1.00	0.16	0.10
Hiệu suất thu hồi (%)		Subset for alpha = 0.05				
Nồng độ acid lactic (M)	N	1	2	3	4	
0,5	3	114.37				
0,6	3		131.95			
0,7	3			140.47		
0,8	3			141.70		
0,9	3			144.07		
1,0	3				151.73	
1,5	3				152.10	
Sig.		1.00	1.00	0.30	0.91	

PL 2.12. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến độ tan, hiệu suất thu hồi chitosan lactate.

Descriptives

Chỉ tiêu	Thời gian phản ứng (giờ)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
Độ tan (%)	0,5	3	97.77	0.64	0.37	96.19	99.34	97.40	98.50
	1,0	3	98.27	0.65	0.38	96.65	99.88	97.60	98.90
	1,5	3	98.47	0.25	0.15	97.84	99.09	98.20	98.70
	2,0	3	99.40	0.36	0.21	98.50	100.30	99.10	99.80
	2,5	3	99.50	0.36	0.21	98.60	100.40	99.10	99.80
	3,0	3	99.50	0.36	0.21	98.60	100.40	99.10	99.80
	Total	18	98.82	0.80	0.19	98.42	99.22	97.40	99.80
Hiệu suất thu hồi (%)	0,5	3	150.80	0.53	0.31	149.49	152.11	150.40	151.40
	1,0	3	151.03	2.44	1.41	144.97	157.10	148.30	153.00
	1,5	3	151.73	2.25	1.30	146.13	157.33	149.40	153.90
	2,0	3	151.77	3.51	2.03	143.05	160.49	149.40	155.80
	2,5	3	152.00	1.77	1.02	147.61	156.39	150.40	153.90
	3,0	3	151.87	0.21	0.12	151.35	152.38	151.70	152.10
	Total	18	151.53	1.84	0.43	150.62	152.45	148.30	155.80

ANOVA

Chỉ tiêu		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Độ tan (%)	Between Groups	8.41	5	1.68	7.88	0.00
	Within Groups	2.56	12	0.21		
	Total	10.97	17			
Hiệu suất thu hồi (%)	Between Groups	3.63	5	0.73	0.16	0.97
	Within Groups	53.65	12	4.47		
	Total	57.28	17			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

Độ tan (%)		Subset for alpha = 0.05	
Thời gian phản ứng (giờ)	N	1	2
0,5	3	97.77	
1,0	3	98.27	98.27
1,5	3	98.47	98.47
2,0	3		99.40
2,5	3		99.50
3,0	3		99.50
Sig.		0.47	0.06
Hiệu suất thu hồi (%)		Subset for alpha = 0.05	
Thời gian phản ứng (giờ)	N	1	2
0,5	3	150.80	
1,0	3	151.03	
1,5	3	151.73	
2,0	3	151.77	
3,0	3	151.87	
2,5	3	152.00	
Sig.		0.98	

Phụ lục 2.13. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate sử dụng đến hiệu suất lắng theo thời gian thu hoạch.

Thời gian (phút)	0	100 ppm	200 ppm	300 ppm	400 ppm	500 ppm
0	0,2 ± 0,1	6,8 ± 2,1	8,9 ± 2,1	18,7 ± 0,8	48,8 ± 0,8	19,1 ± 0,3
15	0,4 ± 0,1	14,0 ± 2,9	38,8 ± 2,6	75,1 ± 3,0	76,9 ± 1,7	67,2 ± 3,8
30	0,7 ± 0,1	21,0 ± 1,1	43,4 ± 3,0	82,7 ± 1,5	80,4 ± 1,6	70,0 ± 1,0
45	1,1 ± 0,2	25,5 ± 0,9	47,4 ± 3,2	85,5 ± 1,2	83,2 ± 1,9	71,6 ± 0,3
60	1,2 ± 0,1	27,2 ± 1,5	50,9 ± 3,5	86,2 ± 0,6	84,7 ± 3,6	71,8 ± 0,8
120	1,6 ± 0,2	30,3 ± 1,7	55,7 ± 1,6	87,0 ± 0,2	86,6 ± 3,9	73,4 ± 0,3
180	2,0 ± 0,2	31,8 ± 2,0	57,2 ± 1,3	87,9 ± 0,5	88,4 ± 3,5	76,1 ± 0,5
240	2,5 ± 0,2	33,6 ± 2,1	59,0 ± 1,4	88,4 ± 0,6	90,2 ± 3,1	78,6 ± 0,6
300	2,8 ± 0,2	34,7 ± 1,4	59,8 ± 1,5	88,7 ± 0,7	90,4 ± 2,8	80,4 ± 0,4

A. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate sử dụng đến hiệu suất lắng theo thời gian thu hoạch

Descriptives

Nồng độ (ppm)	Thời gian (phút)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
0	0	3	0.16	0.11	0.06	(0.11)	0.42	0.09	0.28
	15	3	0.38	0.08	0.05	0.18	0.58	0.31	0.47
	30	3	0.66	0.14	0.08	0.32	1.01	0.56	0.82
	45	3	1.07	0.18	0.10	0.63	1.52	0.92	1.27
	60	3	1.24	0.12	0.07	0.95	1.52	1.13	1.36
	120	3	1.58	0.22	0.13	1.04	2.12	1.33	1.72
	180	3	2.00	0.20	0.11	1.52	2.49	1.78	2.15
	240	3	2.48	0.19	0.11	2.00	2.96	2.26	2.62
	300	3	2.79	0.18	0.10	2.35	3.23	2.66	2.99
100	Total	27	1.37	0.89	0.17	1.02	1.73	0.09	2.99
	0	3	6.76	2.15	1.24	1.42	12.10	4.40	8.61
	15	3	14.05	2.86	1.65	6.96	21.14	10.77	15.98
	30	3	21.01	1.06	0.61	18.37	23.64	20.38	22.23
	45	3	25.54	0.94	0.54	23.21	27.88	25.00	26.63
	60	3	27.17	1.50	0.86	23.45	30.89	26.13	28.89
	120	3	30.31	1.67	0.96	26.17	34.46	28.75	32.07
	180	3	31.77	2.01	1.16	26.77	36.77	29.87	33.88
	240	3	33.61	2.10	1.21	28.39	38.82	31.27	35.33
200	300	3	34.69	1.37	0.79	31.28	38.10	33.15	35.78
	Total	27	24.99	9.21	1.77	21.35	28.64	4.40	35.78
	0	3	8.92	2.07	1.19	3.78	14.06	6.55	10.35
	15	3	38.82	2.58	1.49	32.41	45.23	35.96	40.98
	30	3	43.45	2.96	1.71	36.11	50.79	40.04	45.32
	45	3	47.39	3.16	1.82	39.55	55.23	43.75	49.34
	60	3	50.87	3.52	2.03	42.13	59.61	47.19	54.20
	120	3	55.68	1.57	0.91	51.79	59.58	54.59	57.48

	180	3	57.17	1.25	0.72	54.05	60.28	56.34	58.61
	240	3	59.01	1.43	0.83	55.45	62.57	58.05	60.66
	300	3	59.85	1.50	0.87	56.12	63.58	58.97	61.58
	Total	27	46.80	15.44	2.97	40.69	52.90	6.55	61.58
300	0	3	18.66	0.83	0.48	16.60	20.72	17.70	19.16
	15	3	75.09	3.00	1.73	67.64	82.54	71.63	76.99
	30	3	82.68	1.48	0.85	79.01	86.35	81.46	84.32
	45	3	85.46	1.16	0.67	82.57	88.36	84.36	86.68
	60	3	86.20	0.59	0.34	84.74	87.66	85.77	86.87
	120	3	87.03	0.25	0.14	86.42	87.65	86.89	87.32
	180	3	87.91	0.52	0.30	86.61	89.21	87.50	88.50
	240	3	88.45	0.56	0.32	87.06	89.84	87.81	88.86
	300	3	88.70	0.68	0.39	87.00	90.39	87.91	89.14
	Total	27	77.80	21.72	4.18	69.21	86.39	17.70	89.14
400	0	3	18.78	0.85	0.49	16.67	20.89	18.16	19.75
	15	3	76.94	1.74	1.00	72.62	81.25	75.56	78.89
	30	3	80.38	1.62	0.93	76.36	84.40	78.53	81.55
	45	3	83.20	1.94	1.12	78.37	88.03	81.15	85.02
	60	3	84.73	3.56	2.05	75.89	93.57	81.56	88.58
	120	3	86.55	3.93	2.27	76.80	96.31	82.27	89.98
	180	3	88.36	3.54	2.04	79.57	97.15	84.63	91.67
	240	3	90.16	3.09	1.78	82.50	97.83	87.19	93.35
	300	3	90.39	2.83	1.64	83.35	97.43	87.70	93.35
	Total	27	77.72	21.78	4.19	69.10	86.34	18.16	93.35
500	0	3	19.15	0.32	0.18	18.36	19.93	18.85	19.48
	15	3	67.23	3.75	2.17	57.90	76.55	63.04	70.29
	30	3	69.96	1.04	0.60	67.39	72.53	68.93	71.00
	45	3	71.61	0.27	0.16	70.93	72.30	71.44	71.93
	60	3	71.79	0.83	0.48	69.72	73.85	70.83	72.34
	120	3	73.37	0.32	0.18	72.58	74.16	73.05	73.69
	180	3	76.12	0.53	0.31	74.81	77.43	75.51	76.45
	240	3	78.61	0.64	0.37	77.03	80.19	78.07	79.31
	300	3	80.45	0.43	0.25	79.38	81.51	80.16	80.94
	Total	27	67.59	17.94	3.45	60.49	74.68	18.85	80.94

ANOVA

Nồng độ chitosan lactate (ppm)		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
0	Between Groups	20.25	8	2.53	96.35	0.00
	Within Groups	0.47	18	0.03		
	Total	20.73	26			
100	Between Groups	2,146.80	8	268.35	80.10	0.00
	Within Groups	60.31	18	3.35		
	Total	2,207.10	26			
200	Between Groups	6,096.89	8	762.11	136.24	0.00
	Within Groups	100.69	18	5.59		
	Total	6,197.58	26			
300	Between Groups	12,233.76	8	1,529.22	937.72	0.00
	Within Groups	29.35	18	1.63		
	Total	12,263.11	26			
400	Between Groups	12,201.00	8	1,525.12	201.01	0.00
	Within Groups	136.57	18	7.59		
	Total	12,337.57	26			
500	Between Groups	8,337.36	8	1,042.17	551.81	0.00
	Within Groups	34.00	18	1.89		
	Total	8,371.35	26			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

ĐC (0 ppm)		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	7
0	3	0.16						
15	3	0.38						
30	3		0.66					
45	3			1.07				
60	3			1.24				
120	3				1.58			
180	3					2.00		

240	3						2.48	
300	3							2.79
Sig.		0.11	1.00	0.23	1.00	1.00	1.00	1.00
100 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	
0	3	6.76						
15	3		14.05					
30	3			21.01				
45	3				25.54			
60	3				27.17			
120	3					30.31		
180	3					31.77	31.77	
240	3					33.61	33.61	
300	3						34.69	
Sig.		1.00	1.00	1.00	0.29	0.05		0.08
200 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5		
0	3	8.92						
15	3		38.82					
30	3			43.45				
45	3			47.39	47.39			
60	3				50.87			
120	3					55.68		
180	3					57.17		
240	3					59.01		
300	3					59.85		
Sig.		1.00	1.00	0.06	0.09	0.06		
300 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	
0	3	18.66						
15	3		75.09					
30	3			82.68				
45	3				85.46			
60	3				86.20	86.20		
120	3				87.03	87.03	87.03	
180	3					87.91	87.91	
240	3					88.45	88.45	
300	3						88.70	
Sig.		1.00	1.00	1.00	0.17	0.06		0.16
400 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	
0	3	18.78						
15	3		76.94					
30	3		80.38	80.38				
45	3			83.20	83.20			
60	3			84.73	84.73	84.73		
120	3				86.55	86.55	86.55	
180	3					88.36	88.36	
240	3						90.16	
300	3						90.39	
Sig.		1.00	0.14	0.08	0.17	0.14		0.13
500 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	
0	3	19.15						
15	3		67.23					
30	3			69.96				
45	3			71.61	71.61			
60	3			71.79	71.79			
120	3				73.37			
180	3					76.12		
240	3						78.61	
300	3						80.45	
Sig.		1.00	1.00	0.14	0.15	1.00		0.12

B. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate sử dụng đến hiệu suất lắng sau 15 phút để yên

Descriptives

Nồng độ chitosan lactate (ppm)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower	Upper		
0	3	0.38	0.08	0.05	0.18	0.58	0.31	0.47
100	3	14.05	2.86	1.65	6.96	21.14	10.77	15.98
200	3	38.82	2.58	1.49	32.41	45.23	35.96	40.98
300	3	75.09	3.00	1.73	67.64	82.54	71.63	76.99
400	3	76.94	1.74	1.00	72.62	81.25	75.56	78.89
500	3	67.23	3.75	2.17	57.90	76.55	63.04	70.29
Total	18	45.42	30.96	7.30	30.02	60.81	0.31	78.89

ANOVA

Nồng độ chitosan lactate (ppm)		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
15 phút lắng	Between Groups	16,215.67	5	3,243.13	475.52	0.00
	Within Groups	81.84	12	6.82		
	Total	16,297.52	17			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

15 phút		Subset for alpha = 0.05				
Nồng độ chitosan lactate (ppm)	N	1	2	3	4	5
0	3	0.38				
100	3		14.05			
200	3			38.82		
500	3				67.23	
300	3					75.09
400	3					76.94
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	0.40

Phụ lục 2.14. Ảnh hưởng của phương pháp kết hợp sử dụng chitosan lactate và điều chỉnh pH đến hiệu suất lắng theo thời gian thu hoạch.

CTSs + Điều chỉnh pH	Thời gian (phút)	0 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm	250 ppm	300 ppm
pH tự nhiên	120	1,6 ± 0,2	30,3 ± 1,7	40,0 ± 1,1	55,7 ± 1,6	69,2 ± 1,1	87,0 ± 0,2
pH 9,0	0	2,8 ± 0,7	8,5 ± 1,6	12,4 ± 0,7	16,6 ± 1,5	16,5 ± 1,1	22,2 ± 2,1
	15	5,1 ^a ± 1,3	14,4 ^b ± 2,0	24,9 ^c ± 2,5	33,6 ^d ± 3,3	63,8 ^e ± 0,7	86,5 ^f ± 1,4
	30	6,8 ± 1,4	22,3 ± 2,4	31,5 ± 0,8	38,7 ± 0,9	66,1 ± 0,5	87,7 ± 0,4
	45	7,8 ± 1,1	26,1 ± 2,2	35,0 ± 1,5	44,3 ± 1,0	68,5 ± 0,7	89,2 ± 0,5
	60	8,6 ± 0,9	29,5 ± 1,4	36,8 ± 2,3	46,2 ± 2,3	70,4 ± 0,7	89,6 ± 0,7
	120	10,1 ± 2,0	33,7 ± 2,0	41,3 ± 0,6	50,0 ± 1,7	72,2 ± 1,3	90,4 ± 1,0
	180	12,6 ± 1,8	35,7 ± 2,2	44,2 ± 0,6	52,3 ± 1,2	73,6 ± 0,7	90,6 ± 0,9
	240	15,6 ± 0,4	37,6 ± 0,9	46,6 ± 1,0	53,3 ± 0,9	74,7 ± 0,6	90,8 ± 0,8
pH 9,5	300	17,9 ± 0,3	39,4 ± 0,3	51,3 ± 1,0	55,7 ± 1,1	76,3 ± 0,6	91,2 ± 0,5
	0	3,6 ± 0,6	10,4 ± 1,3	11,8 ± 0,9	15,2 ± 0,9	17,5 ± 0,6	23,9 ± 3,1
	15	5,0 ^a ± 0,8	20,3 ^b ± 6,3	33,1 ^c ± 1,2	46,2 ^d ± 1,8	78,0 ^e ± 0,5	86,7 ^f ± 2,0
	30	6,2 ± 1,0	27,8 ± 5,5	37,7 ± 0,8	50,6 ± 1,6	81,3 ± 1,1	88,7 ± 1,1
	45	6,8 ± 1,2	31,6 ± 5,1	41,2 ± 0,8	52,4 ± 2,5	83,1 ± 1,1	89,5 ± 1,2
	60	9,5 ± 0,4	32,8 ± 4,5	42,9 ± 0,7	54,9 ± 2,1	84,3 ± 0,8	90,0 ± 0,8
	120	11,9 ± 1,4	35,5 ± 2,4	46,2 ± 1,8	59,2 ± 2,0	86,1 ± 0,8	91,1 ± 0,6
	180	17,8 ± 0,2	37,9 ± 2,4	48,8 ± 2,5	61,4 ± 0,5	87,2 ± 1,8	91,7 ± 0,2
pH 10,0	240	19,6 ± 0,2	42,2 ± 1,7	52,6 ± 2,6	64,3 ± 2,0	88,7 ± 1,4	92,1 ± 0,4
	300	21,0 ± 0,6	44,3 ± 2,3	55,5 ± 1,2	66,9 ± 1,8	89,2 ± 1,7	92,6 ± 0,4
	0	5,7 ± 0,3	10,1 ± 2,6	11,1 ± 2,4	14,6 ± 1,3	17,3 ± 0,8	22,3 ± 0,1
	15	6,7 ^a ± 0,3	20,3 ^b ± 4,7	26,2 ^b ± 3,4	44,9 ^c ± 5,6	85,7 ^d ± 0,7	85,2 ^d ± 4,2
	30	6,9 ± 0,9	27,1 ± 2,4	32,9 ± 3,2	54,6 ± 4,0	86,7 ± 1,1	86,9 ± 3,4
	45	8,2 ± 1,6	31,4 ± 0,7	38,0 ± 2,3	57,6 ± 4,8	87,4 ± 1,0	87,7 ± 2,6
	60	9,9 ± 1,5	33,2 ± 1,8	40,8 ± 2,7	60,7 ± 3,3	88,2 ± 0,6	88,7 ± 2,0
	120	11,7 ± 1,1	37,8 ± 1,8	47,0 ± 0,5	64,7 ± 4,4	89,1 ± 0,4	90,2 ± 1,6
	180	19,1 ± 1,1	41,5 ± 1,9	50,8 ± 1,1	68,2 ± 4,1	90,2 ± 0,6	91,1 ± 1,3
	240	20,9 ± 1,2	43,8 ± 2,7	54,0 ± 2,7	69,4 ± 3,8	91,0 ± 0,5	91,4 ± 1,3
	300	28,9 ± 0,6	46,6 ± 2,9	55,3 ± 3,3	70,5 ± 4,5	91,5 ± 0,2	92,3 ± 0,7

A. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate sử dụng và điều chỉnh pH khác nhau đến hiệu suất lắng sau 120 để yên

Descriptives

Điều chỉnh pH	Nồng độ (ppm)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
pH tự nhiên	0	3	1.58	0.22	0.13	1.04	2.12	1.33	1.72
	100	3	30.31	1.67	0.96	26.17	34.46	28.75	32.07
	150	3	40.05	1.30	0.75	36.83	43.27	38.58	41.04
	200	3	55.68	1.57	0.91	51.79	59.58	54.59	57.48
	250	3	69.20	1.30	0.75	65.97	72.42	67.73	70.20
	300	3	87.03	0.25	0.14	86.42	87.65	86.89	87.32
	Total	18	47.31	28.39	6.69	33.19	61.42	1.33	87.32
pH 9.0	0	3	10.10	2.03	1.17	5.05	15.15	8.59	12.41
	100	3	33.70	2.05	1.18	28.62	38.78	31.84	35.89
	150	3	41.34	0.64	0.37	39.75	42.93	40.78	42.04
	200	3	50.01	1.74	1.01	45.68	54.35	48.54	51.94
	250	3	72.16	1.34	0.77	68.83	75.49	70.93	73.59
	300	3	90.39	0.95	0.55	88.03	92.76	89.56	91.43
	Total	18	49.62	26.78	6.31	36.30	62.94	8.59	91.43
pH 9.5	0	3	11.85	1.37	0.79	8.46	15.24	10.29	12.81
	100	3	35.53	2.35	1.35	29.70	41.36	32.82	36.99
	150	3	46.19	1.82	1.05	41.67	50.72	44.09	47.31
	200	3	59.21	1.98	1.14	54.28	64.13	56.99	60.81
	250	3	86.13	0.83	0.48	84.05	88.20	85.62	87.09
	300	3	91.10	0.55	0.32	89.72	92.47	90.48	91.55
	Total	18	55.00	28.55	6.73	40.80	69.20	10.29	91.55
pH 10.0	0	3	11.68	1.13	0.66	8.86	14.50	10.71	12.93
	100	3	37.81	1.76	1.02	33.42	42.19	35.77	38.88
	150	3	46.98	0.51	0.30	45.71	48.25	46.39	47.28
	200	3	64.66	4.44	2.56	53.64	75.68	59.55	67.54
	250	3	89.13	0.37	0.21	88.21	90.05	88.86	89.55
	300	3	90.19	1.57	0.90	86.30	94.08	88.39	91.21
	Total	18	56.74	28.90	6.81	42.37	71.11	10.71	91.21

ANOVA

Nồng độ chitosan lactate (ppm)		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
pH tự nhiên	Between Groups	13679.87	5	2735.97	1882.86	0.00
	Within Groups	17.44	12	1.45		
	Total	13697.31	17			
pH 9.0	Between Groups	12163.35	5	2432.67	1008.79	0.00
	Within Groups	28.94	12	2.41		
	Total	12192.29	17			
pH 9.5	Between Groups	13823.81	5	2764.76	1061.63	0.00
	Within Groups	31.25	12	2.60		
	Total	13.855.06	17			
pH 10.0	Between Groups	14144.39	5	2828.88	630.01	0.00
	Within Groups	53.88	12	4.49		
	Total	14198.27	17			
Điều chỉnh pH		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
0.25 g/L CTSS + điều chỉnh pH	Between Groups	888.61	3	296.20	274.41	0.00
	Within Groups	8.64	8	1.08		
	Total	897.24	11			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

pH tự nhiên (ĐC)		Subset for alpha = 0.05					
Nồng độ (ppm)	N	1	2	3	4	5	6
0	3	1.58					
100	3		30.31				
150	3			40.05			
200	3				55.68		
250	3					69.20	
300	3						87.03
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

pH 9.0		Subset for alpha = 0.05					
Nồng độ (ppm)	N	1	2	3	4	5	6
0	3	10.10					
100	3		33.70				
150	3			41.34			
200	3				50.01		
250	3					72.16	
300	3						90.39
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
pH 9.5		Subset for alpha = 0.05					
Nồng độ (ppm)	N	1	2	3	4	5	6
0	3	11.85					
100	3		35.53				
150	3			46.19			
200	3				59.21		
250	3					86.13	
300	3						91.10
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
pH 10		Subset for alpha = 0.05					
Nồng độ (ppm)	N	1	2	3	4	5	
0	3	11.68					
100	3		37.81				
150	3			46.98			
200	3				64.66		
250	3					89.13	
300	3					90.19	
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	0.55	
250 ppm CTSs		Subset for alpha = 0.05					
Điều chỉnh pH	N	1	2	3	4		
ĐC	3	69.20					
9.0	3		72.16				
9.5	3			86.13			
10.0	3				89.13		
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00		

B. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate sử dụng và điều chỉnh pH 9,0 đến hiệu suất lắng theo thời gian thu hoạch

Descriptives

Nồng độ (ppm)	Thời gian (phút)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
0	0	3	2.82	0.67	0.39	1.16	4.48	2.16	3.50
	15	3	5.12	1.26	0.73	1.99	8.26	4.15	6.55
	30	3	6.82	1.37	0.79	3.42	10.23	5.27	7.86
	45	3	7.80	1.14	0.66	4.97	10.64	6.73	9.00
	60	3	8.55	0.89	0.51	6.34	10.77	7.91	9.57
	120	3	10.10	2.03	1.17	5.05	15.15	8.59	12.41
	180	3	12.55	1.76	1.01	8.19	16.91	11.53	14.58
	240	3	15.56	0.43	0.25	14.49	16.63	15.25	16.05
	300	3	17.86	0.32	0.18	17.06	18.65	17.49	18.08
	Total	27	9.69	4.80	0.92	7.79	11.59	2.16	18.08
100	0	3	8.49	1.58	0.91	4.55	12.42	7.28	10.28
	15	3	14.42	1.99	1.15	9.48	19.37	12.14	15.80
	30	3	22.26	2.42	1.40	16.24	28.28	19.71	24.53
	45	3	26.14	2.22	1.28	20.63	31.66	23.59	27.61
	60	3	29.49	1.44	0.83	25.92	33.07	27.86	30.57
	120	3	33.70	2.05	1.18	28.62	38.78	31.84	35.89
	180	3	35.74	2.22	1.28	30.24	41.25	33.98	38.23
	240	3	37.65	0.87	0.50	35.50	39.80	36.89	38.59
	300	3	39.37	0.27	0.15	38.71	40.03	39.22	39.68
	Total	27	27.47	10.39	2.00	23.36	31.58	7.28	39.68
150	0	3	12.44	0.71	0.41	10.69	14.19	11.63	12.88
	15	3	24.95	2.47	1.42	18.82	31.08	22.23	27.05
	30	3	31.54	0.80	0.46	29.55	33.53	30.73	32.33
	45	3	34.98	1.48	0.85	31.30	38.65	33.30	36.10
	60	3	36.81	2.32	1.34	31.04	42.58	34.27	38.83

	120	3	41.34	0.64	0.37	39.75	42.93	40.78	42.04
	180	3	44.20	0.60	0.35	42.71	45.70	43.51	44.56
	240	3	46.58	0.99	0.57	44.12	49.03	45.90	47.71
	300	3	51.33	1.01	0.58	48.82	53.84	50.44	52.43
	Total	27	36.02	11.54	2.22	31.46	40.58	11.63	52.43
200	0	3	16.64	1.50	0.87	12.92	20.37	15.22	18.21
	15	3	33.64	3.30	1.90	25.45	41.83	30.29	36.88
	30	3	38.71	0.85	0.49	36.61	40.81	37.77	39.41
	45	3	44.32	1.03	0.59	41.76	46.88	43.30	45.36
	60	3	46.22	2.25	1.30	40.62	51.82	43.79	48.24
	120	3	50.01	1.74	1.01	45.68	54.35	48.54	51.94
	180	3	52.27	1.16	0.67	49.40	55.15	51.32	53.56
	240	3	53.32	0.86	0.50	51.19	55.46	52.62	54.28
	300	3	55.66	1.06	0.61	53.03	58.29	54.73	56.81
	Total	27	43.42	11.92	2.29	38.71	48.14	15.22	56.81
250	0	3	16.50	1.12	0.65	13.71	19.29	15.34	17.58
	15	3	63.82	0.74	0.43	61.98	65.67	63.39	64.68
	30	3	66.07	0.49	0.29	64.85	67.30	65.73	66.64
	45	3	68.48	0.71	0.41	66.72	70.23	67.67	68.98
	60	3	70.36	0.73	0.42	68.55	72.17	69.76	71.17
	120	3	72.16	1.34	0.77	68.83	75.49	70.93	73.59
	180	3	73.58	0.69	0.40	71.86	75.30	73.07	74.37
	240	3	74.73	0.61	0.35	73.22	76.25	74.03	75.12
	300	3	76.31	0.57	0.33	74.89	77.73	75.74	76.88
	Total	27	64.67	17.80	3.43	57.63	71.71	15.34	76.88
300	0	3	22.18	2.13	1.23	16.89	27.47	20.58	24.60
	15	3	86.54	1.44	0.83	82.97	90.11	85.34	88.13
	30	3	87.70	0.45	0.26	86.59	88.81	87.38	88.21
	45	3	89.21	0.53	0.31	87.88	90.54	88.83	89.82
	60	3	89.61	0.66	0.38	87.96	91.25	89.03	90.33
	120	3	90.39	0.95	0.55	88.03	92.76	89.56	91.43
	180	3	90.58	0.91	0.53	88.32	92.84	89.85	91.60
	240	3	90.83	0.82	0.47	88.79	92.87	90.24	91.77
	300	3	91.16	0.53	0.31	89.84	92.48	90.83	91.77
	Total	27	82.02	21.63	4.16	73.47	90.58	20.58	91.77

ANOVA

Nồng độ chitosan lactate (ppm)		Sum of Squares		df	Mean Square	F	Sig.
0	Between Groups	571.92		8	71.49	47.63	0.00
	Within Groups	27.02		18	1.50		
	Total	598.93		26			
100	Between Groups	2,748.29		8	343.54	105.72	0.00
	Within Groups	58.49		18	3.25		
	Total	2,806.77		26			
150	Between Groups	3,424.52		8	428.07	219.07	0.00
	Within Groups	35.17		18	1.95		
	Total	3,459.69		26			
200	Between Groups	3,639.44		8	454.93	156.22	0.00
	Within Groups	52.42		18	2.91		
	Total	3,691.86		26			
250	Between Groups	8,225.67		8	1,028.21	1,527.65	0.00
	Within Groups	12.12		18	0.67		
	Total	8,237.78		26			
300	Between Groups	12,140.74		8	1,517.59	1,337.86	0.00
	Within Groups	20.42		18	1.13		
	Total	12,161.16		26			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

0 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	7
0	3	2.82						
15	3		5.12					
30	3		6.82	6.82				
45	3			7.80				
60	3			8.55	8.55			
120	3				10.10			
180	3					12.55		
240	3						15.56	

300	3							17.86
Sig.		1.00	0.11	0.12	0.14	1.00	1.00	1.00
100 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	7
0	3	8.49						
15	3		14.42					
30	3			22.26				
45	3				26.14			
60	3					29.49		
120	3						33.70	
180	3						35.74	35.74
240	3							37.65
300	3							39.37
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.18	0.21
150 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	7
0	3	12.44						
15	3		24.95					
30	3			31.54				
45	3				34.98			
60	3				36.81			
120	3					41.34		
180	3						44.20	
240	3						46.58	
300	3							51.33
Sig.		1.00	1.00	1.00	0.13	1.00	0.05	1.00
200 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	7
0	3	16.64						
15	3		33.64					
30	3			38.71				
45	3				44.32			
60	3				46.22			
120	3					50.01		
180	3					52.27	52.27	
240	3						53.32	53.32
300	3							55.66
Sig.		1.00	1.00	1.00	0.19	0.12	0.46	0.11
250 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	7
0	3	16.50						
15	3		63.82					
30	3			66.07				
45	3				68.48			
60	3					70.36		
120	3						72.16	
180	3							73.58
240	3							74.73
300	3							76.31
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.10
300 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4			
0	3	22.18						
15	3		86.54					
30	3		87.70	87.70				
45	3			89.21	89.21			
60	3			89.61	89.61			
120	3				90.39			
180	3				90.58			
240	3				90.83			
300	3				91.16			
Sig.		1.00	0.20	0.05	0.06			

C. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate sử dụng và điều chỉnh pH 9,5 đến hiệu suất lắng theo thời gian thu hoạch

Descriptives

Nồng độ (ppm)	Thời gian (phút)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
0	0	3	3.26	0.64	0.37	1.67	4.84	2.58	3.85
	15	3	4.98	0.82	0.47	2.95	7.01	4.04	5.54
	30	3	6.25	0.97	0.56	3.84	8.65	5.16	7.02
	45	3	6.84	1.17	0.68	3.93	9.75	5.84	8.13
	60	3	9.50	0.37	0.21	8.59	10.41	9.20	9.91
	120	3	11.85	1.37	0.79	8.46	15.24	10.29	12.81
	180	3	17.81	0.19	0.11	17.33	18.29	17.59	17.96
	240	3	19.64	0.20	0.12	19.14	20.14	19.42	19.82
	300	3	20.99	0.60	0.35	19.48	22.49	20.49	21.66
	Total	27	11.23	6.47	1.25	8.67	13.80	2.58	21.66
100	0	3	10.41	1.34	0.77	7.08	13.75	9.42	11.94
	15	3	20.32	6.29	3.63	4.68	35.95	13.50	25.91
	30	3	27.77	5.50	3.17	14.12	41.43	21.46	31.50
	45	3	31.61	5.11	2.95	18.91	44.31	25.73	34.97
	60	3	32.78	4.46	2.57	21.71	43.85	27.67	35.87
	120	3	35.53	2.35	1.35	29.70	41.36	32.82	36.99
	180	3	37.86	2.38	1.37	31.95	43.78	35.34	40.07
	240	3	42.24	1.70	0.98	38.00	46.47	40.28	43.40
	300	3	44.28	2.34	1.35	38.47	50.09	41.68	46.21
	Total	27	31.42	10.81	2.08	27.15	35.70	9.42	46.21
150	0	3	11.78	0.90	0.52	9.54	14.02	11.20	12.82
	15	3	33.08	1.16	0.67	30.20	35.97	31.84	34.14
	30	3	37.73	0.81	0.47	35.71	39.75	37.07	38.64
	45	3	41.20	0.78	0.45	39.26	43.15	40.49	42.04
	60	3	42.85	0.71	0.41	41.09	44.61	42.08	43.47
	120	3	46.19	1.82	1.05	41.67	50.72	44.09	47.31
	180	3	48.85	2.48	1.43	42.70	55.00	46.69	51.55
	240	3	52.55	2.58	1.49	46.14	58.97	50.93	55.53
	300	3	55.46	1.24	0.72	52.37	58.54	54.71	56.89
	Total	27	41.08	12.60	2.42	36.09	46.06	11.20	56.89
200	0	3	15.24	0.86	0.50	13.10	17.38	14.27	15.92
	15	3	46.17	1.83	1.05	41.63	50.71	44.17	47.75
	30	3	50.60	1.64	0.94	46.53	54.66	49.13	52.36
	45	3	52.43	2.53	1.46	46.14	58.73	50.58	55.32
	60	3	54.94	2.08	1.20	49.78	60.10	53.40	57.30
	120	3	59.21	1.98	1.14	54.28	64.13	56.99	60.81
	180	3	61.40	0.46	0.27	60.25	62.54	61.02	61.91
	240	3	64.26	1.98	1.14	59.34	69.18	62.73	66.50
	300	3	66.95	1.82	1.05	62.44	71.46	65.03	68.64
	Total	27	52.35	14.92	2.87	46.45	58.26	14.27	68.64
250	0	3	17.51	0.64	0.37	15.94	19.09	16.99	18.22
	15	3	78.00	0.48	0.28	76.81	79.20	77.61	78.54
	30	3	81.27	1.06	0.61	78.64	83.90	80.36	82.43
	45	3	83.11	1.11	0.64	80.35	85.86	82.06	84.27
	60	3	84.27	0.84	0.49	82.18	86.36	83.47	85.15
	120	3	86.13	0.83	0.48	84.05	88.20	85.62	87.09
	180	3	87.19	1.76	1.02	82.82	91.56	86.07	89.22
	240	3	88.74	1.35	0.78	85.39	92.08	87.88	90.29
	300	3	89.17	1.74	1.00	84.85	93.48	88.08	91.17
	Total	27	77.26	21.83	4.20	68.63	85.90	16.99	91.17
300	0	3	23.94	3.13	1.81	16.16	31.72	20.58	26.78
	15	3	86.67	2.00	1.15	81.70	91.63	85.07	88.91
	30	3	88.68	1.06	0.61	86.06	91.30	88.06	89.90
	45	3	89.46	1.20	0.69	86.49	92.43	88.28	90.67
	60	3	90.03	0.76	0.44	88.15	91.91	89.48	90.89
	120	3	91.10	0.55	0.32	89.72	92.47	90.48	91.55
	180	3	91.73	0.17	0.10	91.32	92.15	91.55	91.88
	240	3	92.12	0.40	0.23	91.14	93.11	91.75	92.54
	300	3	92.60	0.44	0.25	91.51	93.68	92.23	93.08
	Total	27	82.92	21.36	4.11	74.47	91.37	20.58	93.08

ANOVA

Nồng độ chitosan lactate (ppm)		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
0	Between Groups	1,077.93	8	134.74	208.08	0.00
	Within Groups	11.66	18	0.65		
	Total	1,089.58	26			
100	Between Groups	2,761.53	8	345.19	22.64	0.00
	Within Groups	274.39	18	15.24		
	Total	3,035.92	26			
150	Between Groups	4,084.84	8	510.60	212.79	0.00
	Within Groups	43.19	18	2.40		
	Total	4,128.03	26			
200	Between Groups	5,727.18	8	715.90	223.32	0.00
	Within Groups	57.70	18	3.21		
	Total	5,784.88	26			
250	Between Groups	12,360.90	8	1,545.11	1,127.92	0.00
	Within Groups	24.66	18	1.37		
	Total	12,385.55	26			
300	Between Groups	11,827.06	8	1,478.38	755.64	0.00
	Within Groups	35.22	18	1.96		
	Total	11,862.28	26			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

0 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	7
0	3	3.26						
15	3		4.98					
30	3		6.25	6.25				
45	3			6.84				
60	3				9.50			
120	3					11.85		
180	3						17.81	
240	3							19.64
300	3							20.99
Sig.		1.00	0.07	0.38	1.00	1.00	1.00	0.06
100 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	
0	3	10.41						
15	3		20.32					
30	3			27.77				
45	3			31.61	31.61			
60	3			32.78	32.78			
120	3				35.53	35.53		
180	3				37.86	37.86	37.86	
240	3					42.24	42.24	
300	3						44.28	
Sig.		1.00	1.00	0.15	0.09	0.06	0.07	
150 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	7
0	3	11.78						
15	3		33.08					
30	3			37.73				
45	3				41.20			
60	3				42.85			
120	3					46.19		
180	3					48.85		
240	3						52.55	
300	3							55.46
Sig.		1.00	1.00	1.00	0.21	0.05	1.00	1.00
200 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	7
0	3	15.24						
15	3		46.17					
30	3			50.60				
45	3			52.43	52.43			
60	3				54.94			

120	3					59.21		
180	3					61.40	61.40	
240	3						64.26	64.26
300	3							66.95
Sig.		1.00	1.00	0.23	0.10	0.15	0.07	0.08
250 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	7
0	3	17.51						
15	3		78.00					
30	3			81.27				
45	3			83.11	83.11			
60	3				84.27	84.27		
120	3					86.13	86.13	
180	3						87.19	87.19
240	3							88.74
300	3							89.17
Sig.		1.00	1.00	0.07	0.24	0.07	0.28	0.06
300 ppm		Subset for alpha = 0.05						
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5		
0	3	23.94						
15	3		86.67					
30	3		88.68	88.68				
45	3			89.46	89.46			
60	3			90.03	90.03	90.03		
120	3			91.10	91.10	91.10		
180	3				91.73	91.73		
240	3					92.12		
300	3					92.60		
Sig.		1.00	0.09	0.07	0.08	0.06		

D. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate sử dụng và điều chỉnh pH 10,0 đến hiệu suất lắng theo thời gian thu hoạch

Descriptives

Nồng độ (ppm)	Thời gian (phút)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
0	0	3	5.68	0.27	0.15	5.01	6.34	5.37	5.86
	15	3	6.68	0.29	0.17	5.96	7.41	6.49	7.02
	30	3	6.95	0.89	0.51	4.74	9.16	5.93	7.58
	45	3	8.21	1.61	0.93	4.23	12.20	6.60	9.81
	60	3	9.89	1.49	0.86	6.20	13.58	8.84	11.59
	120	3	11.68	1.13	0.66	8.86	14.50	10.71	12.93
	180	3	19.12	1.08	0.62	16.43	21.80	18.39	20.36
	240	3	20.94	1.16	0.67	18.05	23.84	19.62	21.81
	300	3	28.90	0.65	0.37	27.30	30.51	28.43	29.64
	Total	27	13.12	7.78	1.50	10.04	16.19	5.37	29.64
100	0	3	10.09	2.57	1.48	3.70	16.47	7.12	11.62
	15	3	20.30	4.71	2.72	8.61	31.99	15.54	24.95
	30	3	27.10	2.40	1.38	21.15	33.05	25.56	29.86
	45	3	31.39	0.72	0.42	29.59	33.19	30.96	32.23
	60	3	33.21	1.84	1.06	28.64	37.79	31.18	34.77
	120	3	37.81	1.76	1.02	33.42	42.19	35.77	38.88
	180	3	41.49	1.88	1.09	36.81	46.17	39.33	42.77
	240	3	43.78	2.74	1.58	36.97	50.58	40.64	45.70
	300	3	46.60	2.91	1.68	39.37	53.84	43.26	48.60
	Total	27	32.42	11.56	2.22	27.85	36.99	7.12	48.60
150	0	3	11.06	2.44	1.41	4.98	17.13	8.24	12.63
	15	3	26.21	3.37	1.94	17.85	34.57	22.47	29.00
	30	3	32.88	3.18	1.83	24.99	40.78	30.27	36.42
	45	3	38.05	2.28	1.32	32.37	43.72	36.33	40.64
	60	3	40.76	2.69	1.55	34.08	47.45	38.48	43.73
	120	3	46.98	0.51	0.30	45.71	48.25	46.39	47.28
	180	3	50.76	1.10	0.64	48.02	53.51	49.53	51.66
	240	3	53.97	2.71	1.57	47.23	60.71	50.84	55.66
	300	3	55.31	3.32	1.92	47.05	63.57	51.50	57.62
	Total	27	39.55	14.07	2.71	33.99	45.12	8.24	57.62

Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	7	
0	3	10.09							
15	3		20.30						
30	3			27.10					
45	3			31.39	31.39				
60	3				33.21				
120	3					37.81			
180	3					41.49	41.49		
240	3						43.78	43.78	
300	3							46.60	
Sig.		1.00	1.00	0.06	0.40	0.10	0.30	0.20	
150 ppm		Subset for alpha = 0.05							
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6		
0	3	11.06							
15	3		26.21						
30	3			32.88					
45	3				38.05				
60	3				40.76				
120	3					46.98			
180	3					50.76	50.76		
240	3						53.97		
300	3						55.31		
Sig.		1.00	1.00	1.00	0.21	0.09	0.05		
200 ppm		Subset for alpha = 0.05							
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5			
0	3	14.60							
15	3		44.86						
30	3			54.64					
45	3			57.65	57.65				
60	3			60.65	60.65				
120	3				64.66	64.66			
180	3					68.19			
240	3					69.42			
300	3					70.52			
Sig.		1.00	1.00	0.11	0.06	0.13			
250 ppm		Subset for alpha = 0.05							
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5	6	7	8
0	3	17.26							
15	3		85.67						
30	3		86.67	86.67					
45	3			87.41	87.41				
60	3				88.18	88.18			
120	3					89.13	89.13		
180	3						90.15	90.15	
240	3							91.02	91.02
300	3								91.52
Sig.		1.00	0.09	0.21	0.19	0.11	0.09	0.14	0.40
300 ppm		Subset for alpha = 0.05							
Thời gian (phút)	N	1	2	3	4	5			
0	3	22.33							
15	3		85.25						
30	3		86.91	86.91					
45	3		87.73	87.73	87.73				
60	3		88.73	88.73	88.73	88.73			
120	3			90.19	90.19	90.19			
180	3			91.06	91.06	91.06			
240	3				91.39	91.39			
300	3					92.35			
Sig.		1.00	0.10	0.06	0.09	0.10			

Phụ lục 2.15. Ảnh hưởng của loại muối chitosan lactate đến hiệu suất lắng vi tảo.

Phương pháp thu	CTSs từ vỏ lột xác	CTSs từ công ty VNF	CTSs từ công ty MarkNature
250 ppm CTSs	58,8 ± 1,9	58,2 ± 2,4	52,5 ± 1,7
250 ppm CTSs + pH 10,0	85,9 ± 0,5	87,5 ± 0,5	65,8 ± 0,7

Descriptives

Phương pháp thu	Loại CTSs	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
CTSs	NTU	3	58.79	2.35	1.36	52.96	64.63	56.11	60.47
	VNF	3	57.15	2.99	1.73	50.72	65.58	54.93	60.84
	MarkNature	3	52.55	2.06	1.19	47.43	57.67	51.34	54.93
	Total	9	56.50	3.68	1.23	53.67	59.33	51.34	60.84
CTSs+pH	NTU	3	85.93	0.59	0.34	84.47	87.39	85.49	86.60
	VNF	3	87.49	0.56	0.32	86.11	88.87	86.93	88.04
	MarkNature	3	65.78	0.86	0.50	63.63	67.93	65.23	66.78
	Total	9	79.73	10.50	3.50	71.66	87.81	65.23	88.04

ANOVA

Các loại muối CTS lactate (250 ppm)		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CTSs	Between Groups	70.79	2	35.39	5.68	0.04
	Within Groups	37.43	6	6.24		
	Total	108.20	8			
CTSs+pH	Between Groups	879.47	2	439.74	941.28	0.00
	Within Groups	2.80	6	0.47		
	Total	882.27	8			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

CTSs		Subset for alpha = 0.05		
Loại CTS lactate	N	1	2	
MarkNature	3	52.55		
VNF	3		58.15	
NTU	3		58.79	
Sig.		1.00	0.76	
CTSs + pH		Subset for alpha = 0.05		
Loại CTS lactate	N	1	2	3
MarkNature	3	65.78		
NTU	3		85.93	
VNF	3			87.49
Sig.		1.00	1.00	1.00

Phụ lục 2.16. Ảnh hưởng của phương pháp thu vi tảo *Nannochloropsis* sp. đến hiệu suất lắng và hiệu suất thu hồi chlorophyll-a và carotenoids

Chỉ tiêu	pH 10,0	250 ppm CTSs	250 ppm CTSs + pH 10,0
Hiệu suất thu hồi Chlorophyll-a (%)	52,2 ± 5,2	94,1 ± 0,8	94,3 ± 1,1
Hiệu suất thu hồi Carotenoids (%)	63,4 ± 3,7	90,2 ± 2,3	88,4 ± 2,6
Hiệu suất lắng (%)	6,7 ± 0,3	58,5 ± 1,7	85,7 ± 0,7

Descriptives

Chỉ tiêu	Phương pháp thu	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower	Upper		
Chlorophyll-a	pH	3	52.13	6.37	3.68	36.31	67.95	45.50	58.20
	CTSs	3	94.13	0.95	0.55	91.79	96.48	93.40	95.20
	CTSs+pH	3	94.33	1.43	0.83	90.78	97.88	93.10	95.90
	Total	9	80.20	21.31	7.10	63.82	96.58	45.50	95.90
Carotenoids	pH	3	63.47	4.51	2.60	52.27	74.66	59.10	68.10
	CTSs	3	90.20	2.86	1.65	83.10	97.30	88.50	93.50
	CTSs+pH	3	88.43	3.20	1.85	80.48	96.38	86.20	92.10
	Total	9	80.70	13.32	4.44	70.46	90.94	59.10	93.50

Hiệu suất lắng	pH	3	6.68	0.29	0.17	5.96	7.41	6.49	7.02
	CTSs	3	58.47	2.11	1.22	53.23	63.71	56.86	60.86
	CTSs+pH	3	85.67	0.66	0.38	84.02	87.31	85.27	86.43
	Total	9	50.27	34.77	11.59	23.55	77.00	6.49	86.43

ANOVA

Phương pháp thu		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Chlorophyll-a	Between Groups	3,544.88	2	1,772.44	122.24	0.00
	Within Groups	87.00	6	14.50		
	Total	3,631.88	8			
Carotenoids	Between Groups	1,341.13	2	670.56	51.96	0.00
	Within Groups	77.43	6	12.91		
	Total	1,418.56	8			
Hiệu suất lắng	Between Groups	9,660.05	2	4,830.02	2,914.69	0.00
	Within Groups	9.94	6	1.66		
	Total	9,669.99	8			

Post Hoc Tests (Duncan tests)

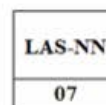
Chlorophyll-a		Subset for alpha = 0.05	
Phương pháp thu	N	1	2
pH	3	52.13	
CTSs	3		94.13
CTSs+pH	3		94.33
Sig.		1.00	0.95
Carotenoids		Subset for alpha = 0.05	
Phương pháp thu	N	1	2
pH	3	63.47	
CTSs	3		88.43
CTSs+pH	3		90.20
Sig.		1.00	0.57

Hiệu suất lắng		Subset for alpha = 0.05		
Phương pháp thu	N	1	2	3
pH	3	6.68		
CTSs	3		58.47	
CTSs+pH	3			85.67
Sig.		1.00	1.00	1.00

Phụ lục 3. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

- Phụ lục 3.1.** Thành phần acid amin còn lại trong chitosan tinh sạch thu từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng.
- Phụ lục 3.2** Thành phần khoáng còn lại và kim loại nặng trong chitosan tinh sạch thu từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng.
- Phụ lục 3.3** Phổ FTIR của chitin, chitosan tách chiết từ vỏ lột xác của tôm và chitosan tách chiết từ vỏ tôm chế biến
- Phụ lục 3.4** Phổ XRD của vỏ lột xác, chitin, chitosan tách chiết từ vỏ lột xác của tôm và chitosan tách chiết từ vỏ tôm chế biến
- Phụ lục 3.5** Phổ FTIR của chitosan lactate tách chiết từ vỏ lột xác, chitosan lactate tách chiết từ tôm chế biến của công ty VNF và chitosan lactate thương mại của công ty MarkNature
- Phụ lục 3.6** Phổ XRD của chitosan lactate tách chiết từ vỏ lột xác, chitosan lactate tách chiết từ tôm chế biến của công ty VNF và chitosan lactate thương mại của công ty MarkNature
-

Phụ lục 3.1. Thành phần acid amin còn lại trong chitosan tinh sạch thu từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng



ANALYTICAL REPORT

UVN2031008

Trường Đại học Nha Trang

02 Nguyễn Đình Chiểu, Nha Trang

Tel: - Fax:

Attention: Mr. Nguyễn Công Minh - 0974.099771

Date of report : 29/10/2020

Order ref : 0001CL174320

Client Code : CL1743

Issue No. : 1

SAMPLE INFORMATION

Sample name: Chitosan từ vỏ tôm lột

Date of reception : 28/09/2020

Analysis start : 29/09/2020

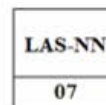
Analysis completion: 29/10/2020

Sample condition: SAMPLE IN PLASTIC BAG

Quantity (gr): 8.00

TEST RESULT(S)

Specification(s)	Method	Unit	Result
Amino acids profile	EC 152/2009 (VF)	g/100g	Not detected
Amino acid	Cystine	g/100g	Not detected
Amino acid	Aspartic acid	g/100g	Not detected
Amino acid	Methionine	g/100g	Not detected
Amino acid	Threonine	g/100g	Not detected
Amino acid	Serine	g/100g	Not detected
Amino acid	Glutamic acid	g/100g	Not detected
Amino acid	Glycine	g/100g	Not detected
Amino acid	Alanine	g/100g	Not detected
Amino acid	Valine	g/100g	Not detected



ANALYTICAL REPORT

UVN2031008

Trường Đại học Nha Trang

02 Nguyễn Đình Chiểu, Nha Trang

Tel: - Fax:

Attention: Mr. Nguyễn Công Minh - 0974.099771

Date of report : 29/10/2020

Order ref : 0001CL174320

Client Code : CL1743

Issue No. : 1

SAMPLE INFORMATION

Sample name: Chitosan từ vỏ tôm lột

Date of reception : 28/09/2020

Analysis start : 29/09/2020

Analysis completion: 29/10/2020

Sample condition: SAMPLE IN PLASTIC BAG

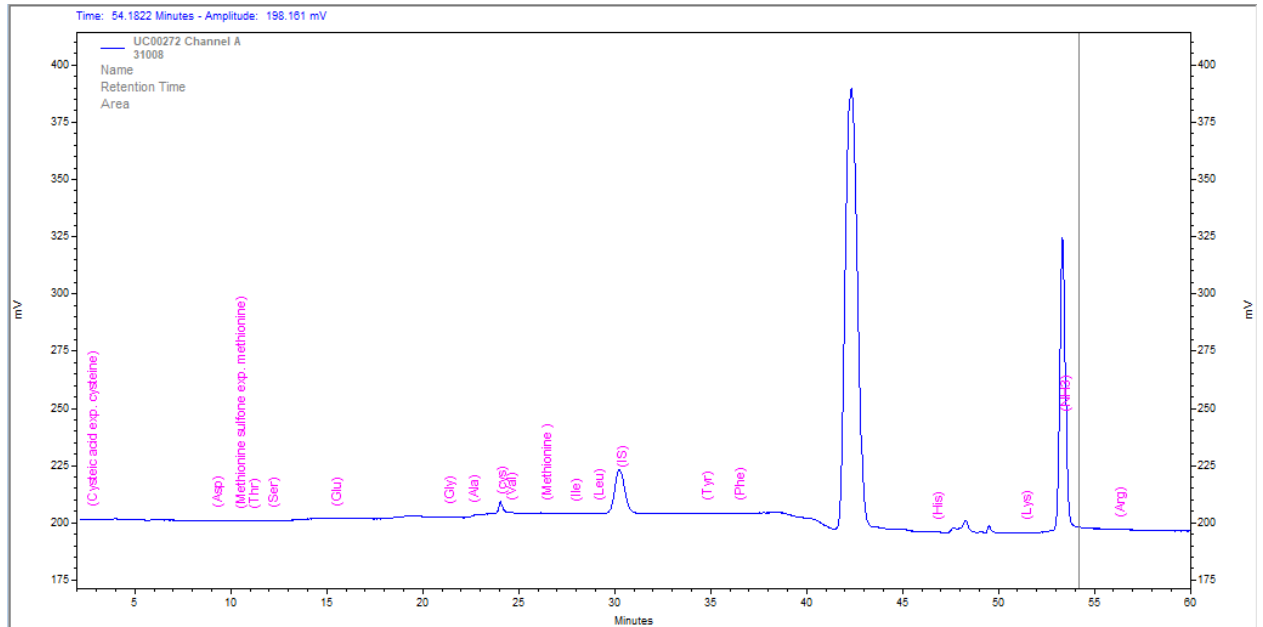
Quantity (gr): 8.00

TEST RESULT(S)

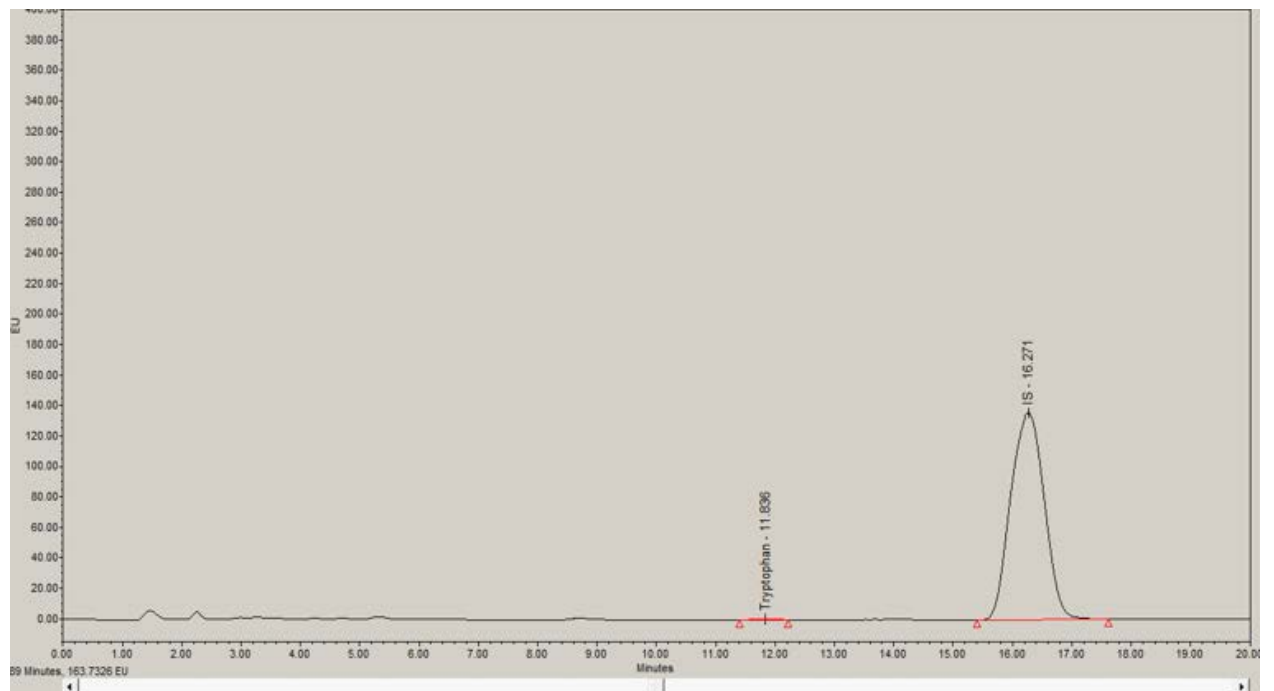
Specification(s)	Method	Unit	Result
Amino acid	Isoleucine	g/100g	Not detected
Amino acid	Leucine	g/100g	Not detected
Amino acid	Tyrosine	g/100g	Not detected
Amino acid	Phenylalanine	g/100g	Not detected
Amino acid	Histidine	g/100g	Not detected
Amino acid	Lysine	g/100g	Not detected
Amino acid	Arginine	g/100g	Not detected
Amino acid	Proline	g/100g	Not detected
Amino acid	Tryptophane	g/100g	Not detected
Ash	EC 152/2009 (VF)	g/100g	<0.2

CODE 31008:

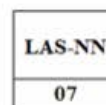
- Amino acids - Biochrom



- Tryptophane – HPLC-FLD



Phụ lục 3.2. Thành phần khoáng còn lại và kim loại nặng trong chitosan tinh sạch thu từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng



ANALYTICAL REPORT

UVN2031008

Trường Đại học Nha Trang

02 Nguyễn Đình Chiểu, Nha Trang

Tel: - Fax:

Attention: Mr. Nguyễn Công Minh - 0974.099771

Date of report : 29/10/2020

Order ref : 0001CL174320

Client Code : CL1743

Issue No. : 1

SAMPLE INFORMATION

Sample name: Chitosan từ vỏ tôm lột

Date of reception : 28/09/2020

Analysis start : 29/09/2020

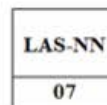
Analysis completion: 29/10/2020

Sample condition: SAMPLE IN PLASTIC BAG

Quantity (gr): 8.00

TEST RESULT(S)

Specification(s)	Method	Unit	Result
Heavy Metal group	GE297 - ICP MS (VF)	--	Done
Arsenic (As)	GE297 - ICP MS (VF)	ppm (mg/kg)	0.02
Mercury (Hg)	GE297 - ICP MS (VF)	ppm (mg/kg)	0.010
Cadmium (Cd)	GE297 - ICP MS (VF)	ppm (mg/kg)	0.010
Lead (Pb)	GE297 - ICP MS (VF)	ppm (mg/kg)	0.50
Sodium (Na)	GE297 - ICP MS (VF)	ppm (mg/kg)	28.28
Potassium (K)	GE297 - ICP MS (VF)	ppm (mg/kg)	20.89
Calcium (Ca)	GE297 - ICP MS (VF)	ppm (mg/kg)	21.57
Magnesium (Mg)	GE297 - ICP MS (VF)	ppm (mg/kg)	7.20
Iron (Fe)	GE297 - ICP MS (VF)	ppm (mg/kg)	57.22



ANALYTICAL REPORT

UVN2031008

Trường Đại học Nha Trang

02 Nguyễn Đình Chiểu, Nha Trang

Tel: - Fax:

Attention: Mr. Nguyễn Công Minh - 0974.099771

Date of report : 29/10/2020

Order ref : 0001CL174320

Client Code : CL1743

Issue No. : 1

SAMPLE INFORMATION

Sample name: Chitosan từ vỏ tôm lột

Date of reception : 28/09/2020

Analysis start : 29/09/2020

Analysis completion: 29/10/2020

Sample condition: SAMPLE IN PLASTIC BAG

Quantity (gr): 8.00

TEST RESULT(S)

Specification(s)	Method	Unit	Result
Zinc (Zn)	GE297 - ICP MS (VF)	ppm (mg/kg)	5.69

TECHNICAL COMMENTS

LOD: Amino acids profile 0.01g/100g.

APPROVAL

Mathilde BOUILLAND

Laboratory Senior Manager

(*) : Subcontracted test (V): Vilas accredited test ; (F): Department of livestock production accredited test (VF): Vilas & Department of livestock production

Test result is based exclusively on the sample received

This report shall not be reproduced, except in full, without the written approval of the laboratory

UPSCIENCE VIETNAM

Khu phố 1B, Phường An Phú, Thị Xã Thuận An, Tỉnh Bình Dương, Việt Nam
T: +84 (0) 274 371 4929 | F: +84 (0) 274 371 4929 | www.upsience-labs.com

Page 4 of 4

Phụ lục 3.3. Phổ FTIR của chitin, chitosan tách chiết từ vỏ lột xác của tôm và chitosan tách chiết từ vỏ tôm chế biến



ĐẠI HỌC NHA TRANG/ NHA TRANG UNIVERSITY
TRUNG TÂM THÍ NGHIỆM THỰC HÀNH/ CENTRE FOR EXPERIMENT AND PRACTICES
Văn Phòng: Tòa nhà C- 02 Nguyễn Đình Chiểu, Nha Trang, Khánh Hòa Điện thoại:
02582461888

KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

Số: KQ.09.06.2020

Tên khách hàng: Cô Phạm Thị Đan Phượng - NCS

Địa chỉ: Khoa Thực phẩm – Đại học Nha Trang

Ngày gửi mẫu: 09.06.2020

Số lượng mẫu: 03

Tên mẫu: Khách hàng cung cấp

Tình trạng mẫu: Dạng bột mịn

Lượng mẫu: 50 gam/ mẫu

Các kết quả đo FTIR đính kèm các trang sau.

Ghi chú

- Mẫu do khách hàng mang đến Trung tâm thí nghiệm thực hành; Tên mẫu do khách hàng cung cấp
- Kết quả phân tích chỉ có giá trị trên mẫu thử.
- Không được sao chép từng phần hay toàn bộ kết quả phân tích này nếu không được phép của Trung tâm
- Thời gian lưu mẫu là 05 ngày kể từ ngày trả kết quả. Hết thời gian lưu mẫu, Trung tâm không chịu trách nhiệm về việc khiếu nại kết quả thử nghiệm của khách hàng

Nha Trang, ngày 10 tháng 06 năm 2020

Cán bộ phân tích

Trần Ngọc Lê

Cán bộ kiểm tra

Trần Ngọc Lê

Giám đốc Trung tâm

Nguyễn Văn Hòa

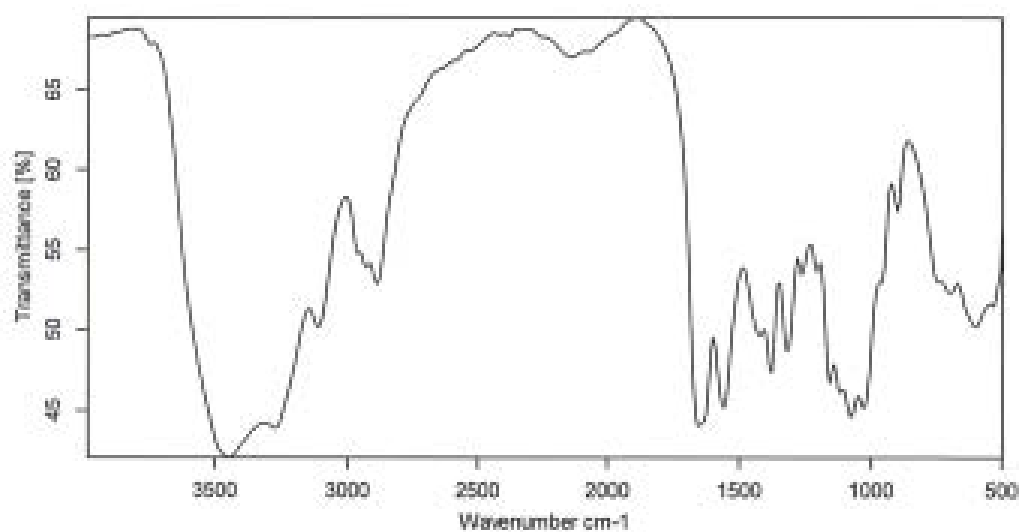


ANALYSIS REPORT

Instrument type	Alpha
Accessory	Sample Compartment *849DC1E2D
OPUS version	Version 7.5 Build: 7, 5, 18 20140810

Spectrum file name	Chitosan- che bien
Sample name	Sample description
Sample form	Instrument type and / or accessory

Spectrum



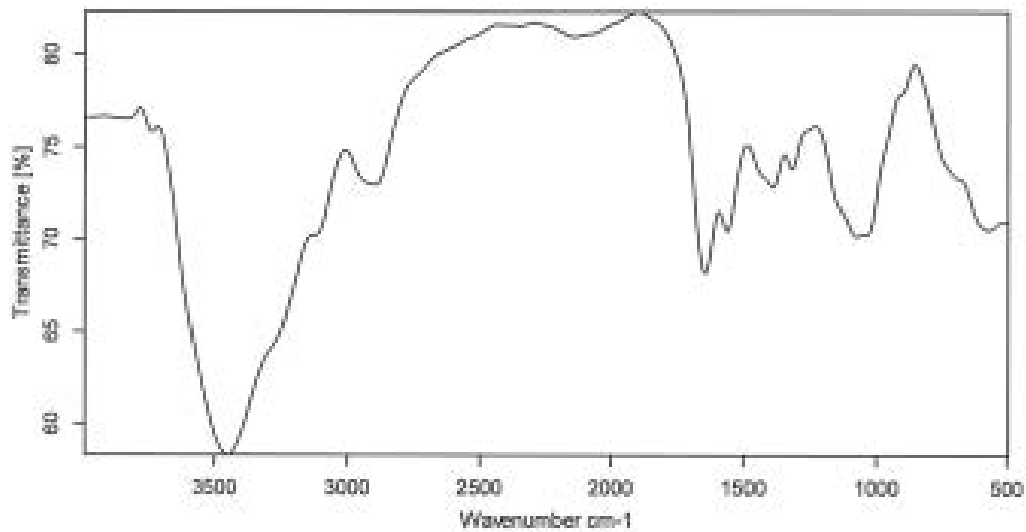
211
RU
Al
HA
/

ANALYSIS REPORT

Instrument type	Alpha
Accessory	Sample Compartment *848DC1E2D
OPUS version	Version 7.5 Build: 7, 5, 18 20140810

Spectrum file name	Chitin-40 lot xac.0
Sample name	Sample description
Sample form	Instrument type and / or accessory

Spectrum

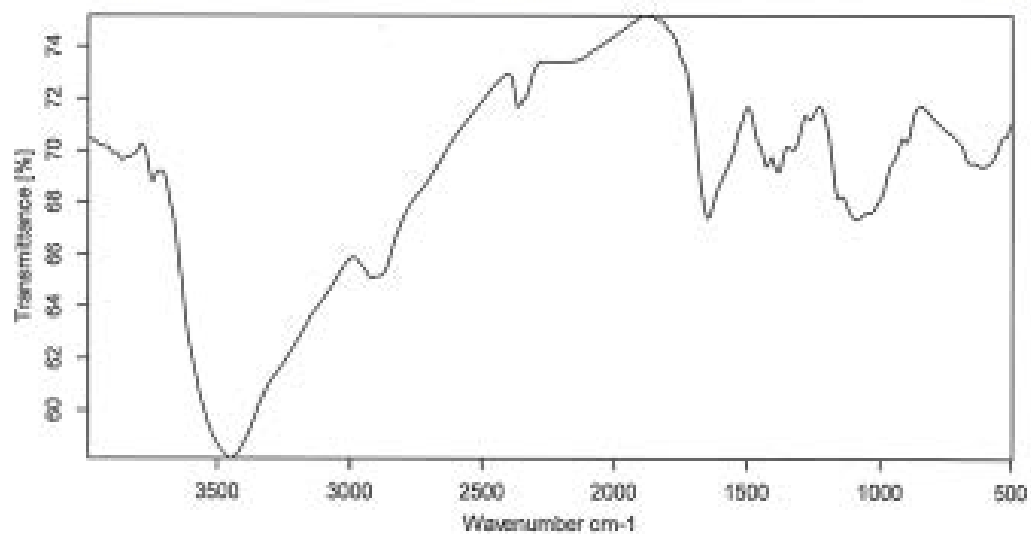


ANG
QC
ANG

ANALYSIS REPORT

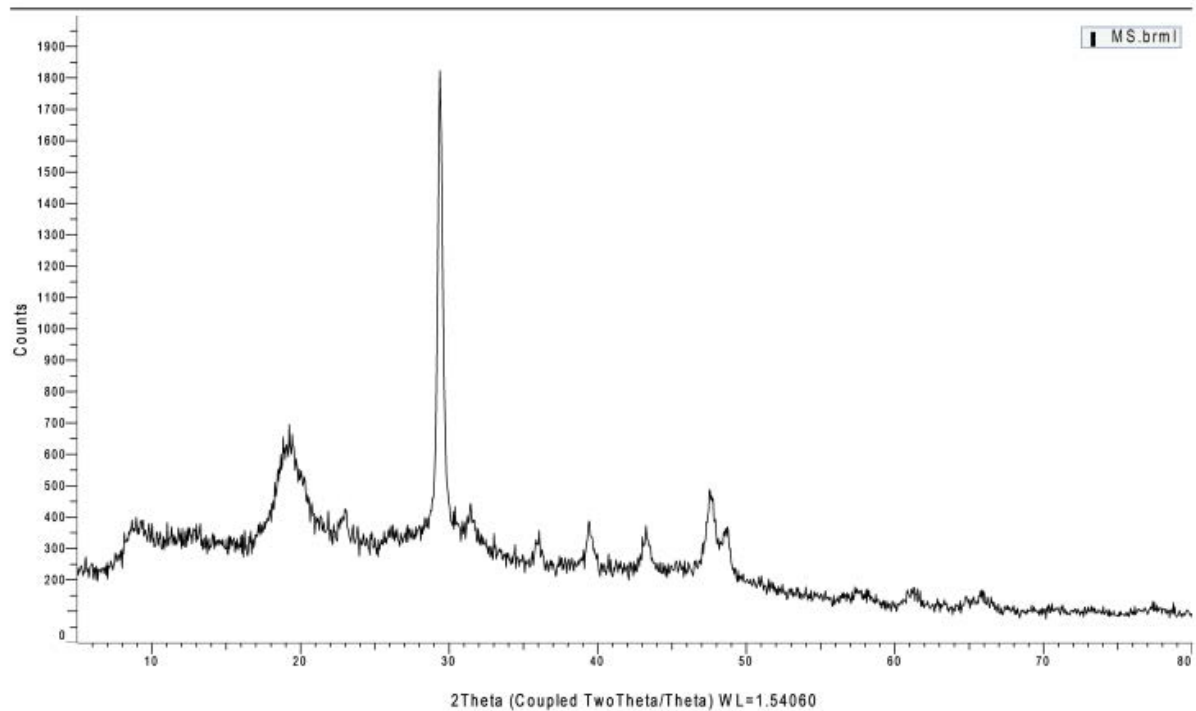
Instrument type	Alpha
Accessory	Sample Compartment *B49DC1E2D
OPUS version	Version 7.5 Build: 7, 5, 18 20140810
Spectrum file name	Chitosan-va lot xac.0
Sample name	Sample description
Sample form	Instrument type and / or accessory

Spectrum

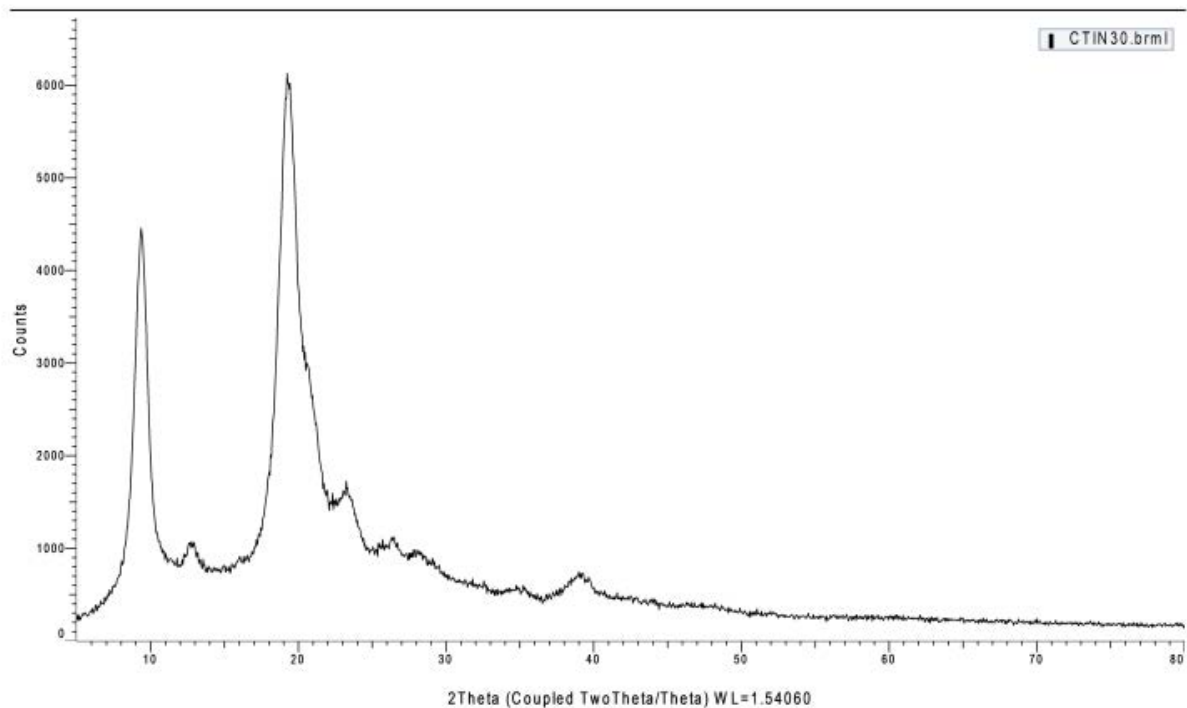


Phụ lục 3.4. Phổ XRD của vỏ lột xác (a), chitin (b), chitosan (c) tách chiết từ vỏ lột xác của tôm và chitosan (d) tách chiết từ vỏ tôm chế biến

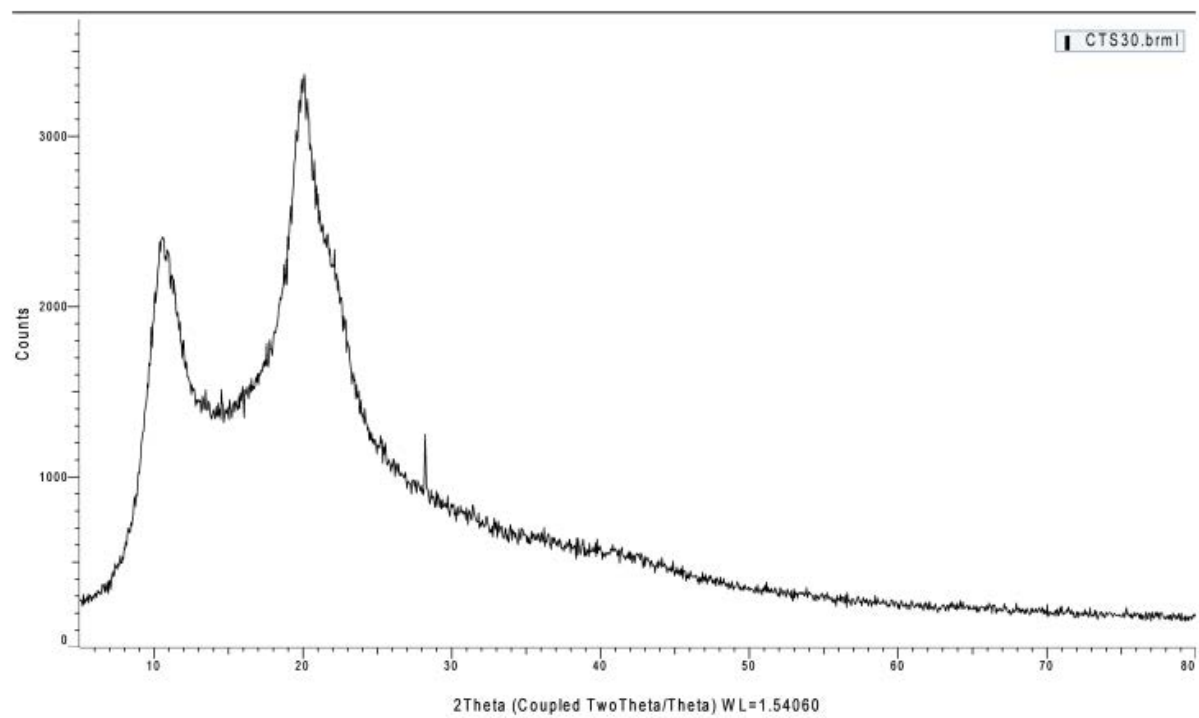
a. Phổ XRD của vỏ lột xác



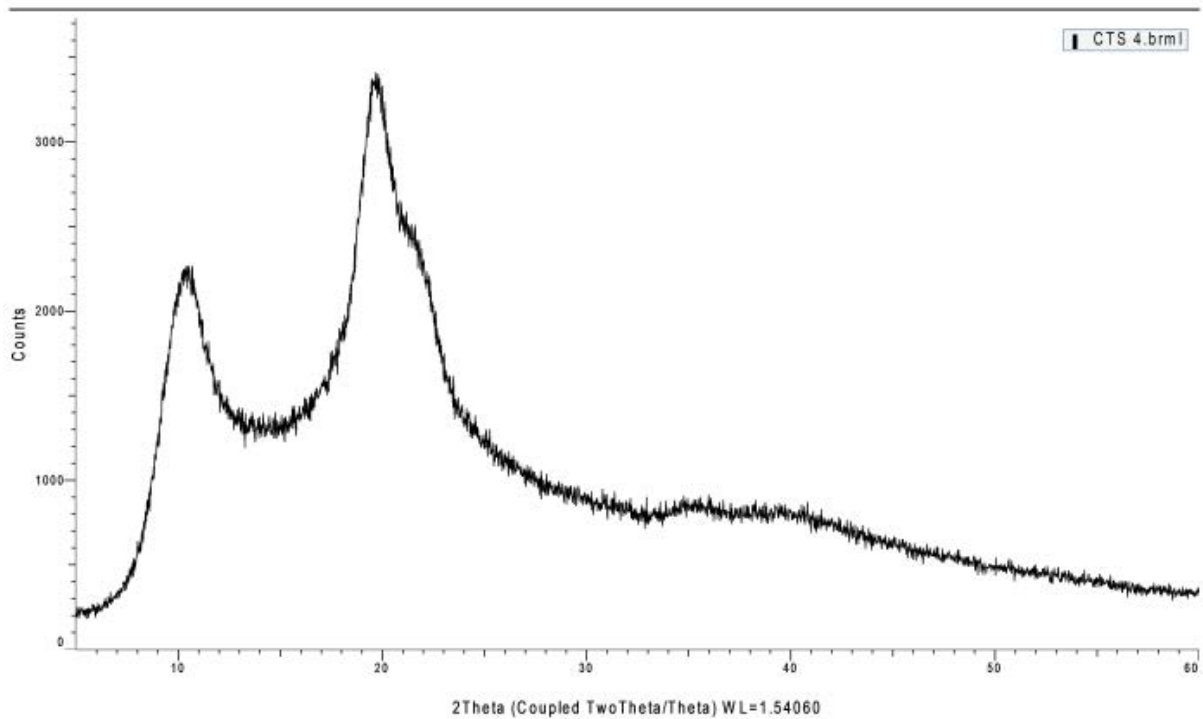
b. Phổ XRD của chitin từ vỏ lột xác



c. Phổ XRD của chitosan từ vỏ tôm lột xác



d. Phổ XRD của chitosan từ vỏ tôm chế biến



Phụ lục 3.5. Phổ FTIR của chitosan lactate tách chiết từ vỏ lột xác, chitosan lactate tách chiết từ tôm chế biến của công ty VNF và chitosan lactate thương mại của công ty MarkNature



ĐẠI HỌC NHA TRANG/ NHA TRANG UNIVERSITY
TRUNG TÂM THÍ NGHIỆM THỰC HÀNH/ CENTRE FOR EXPERIMENT AND PRACTICES
Văn Phòng: Tòa nhà C- 02 Nguyễn Đình Chiểu, Nha Trang, Khánh Hòa Điện thoại:
02582461888

KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

Số: KQ09.4.21

Tên khách hàng: Cô Phạm Thị Đan Phượng - NCS

Địa chỉ: Khoa Thực phẩm – Đại học Nha Trang

Ngày gửi mẫu: 07.4.2021

Số lượng mẫu: 03

Tên mẫu: Khách hàng cung cấp

Tình trạng mẫu: Dạng bột mịn

Lượng mẫu: 50 gam/ mẫu

Các kết quả đo FTIR đính kèm các trang sau.

Ghi chú

- Mẫu do khách hàng mang đến Trung tâm thí nghiệm thực hành; Tên mẫu do khách hàng cung cấp
- Kết quả phân tích chỉ có giá trị trên mẫu thử.
- Không được sao chép từng phần hay toàn bộ kết quả phân tích này nếu không được phép của Trung tâm
- Thời gian lưu mẫu là 05 ngày kể từ ngày trả kết quả. Hết thời gian lưu mẫu, Trung tâm không chịu trách nhiệm về việc khiếu nại kết quả thử nghiệm của khách hàng

Nha Trang, ngày 09 tháng 4 năm 2021

Cán bộ phân tích

Trần Ngọc Lê

Cán bộ kiểm tra

Trần Ngọc Lê

Giám đốc Trung tâm

Nguyễn Văn Hòa

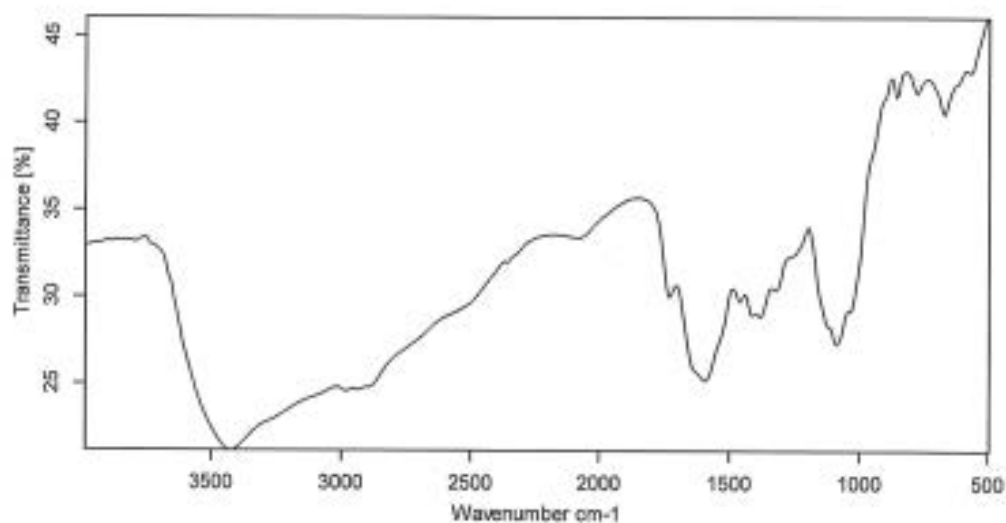


ANALYSIS REPORT

Instrument type	Alpha
Accessory	Sample Compartment *849DC1E2D
OPUS version	Version 7.5 Build: 7, 5, 18 20140810

Spectrum file name	Chitosan lactate_MarkNature
Sample name	Chitosan lactate_MarkNature
Sample form	Instrument type and / or accessory

Spectrum



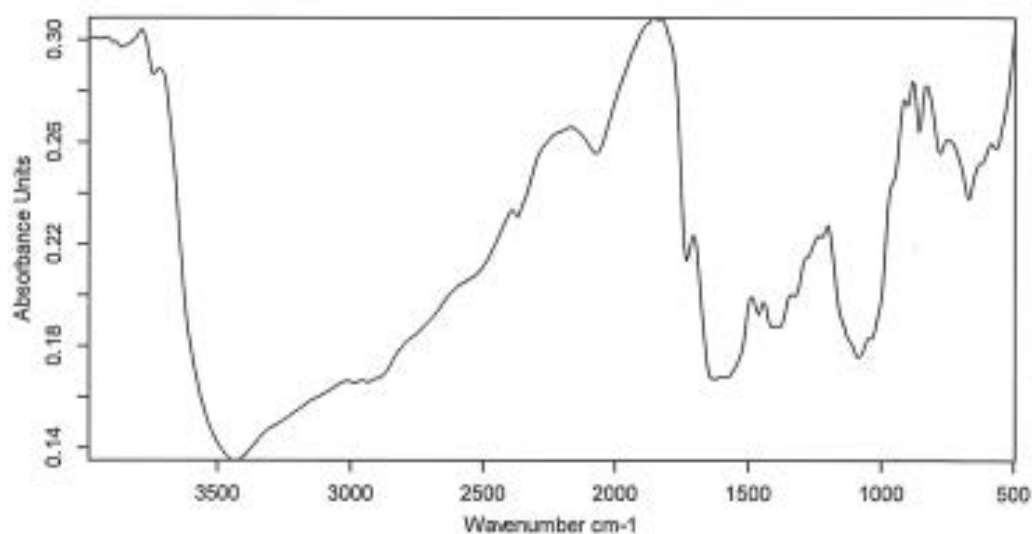
V2
ÔNG
HỌ
TRAN

ANALYSIS REPORT

Instrument type	Alpha
Accessory	Sample Compartment *84DC1E2D
OPUS version	Version 7.5 Build: 7, 5, 18 20140810

Spectrum file name	Chitosan lactate_VNF
Sample name	Chitosan lactate_VNF
Sample form	Instrument type and / or accessory

Spectrum

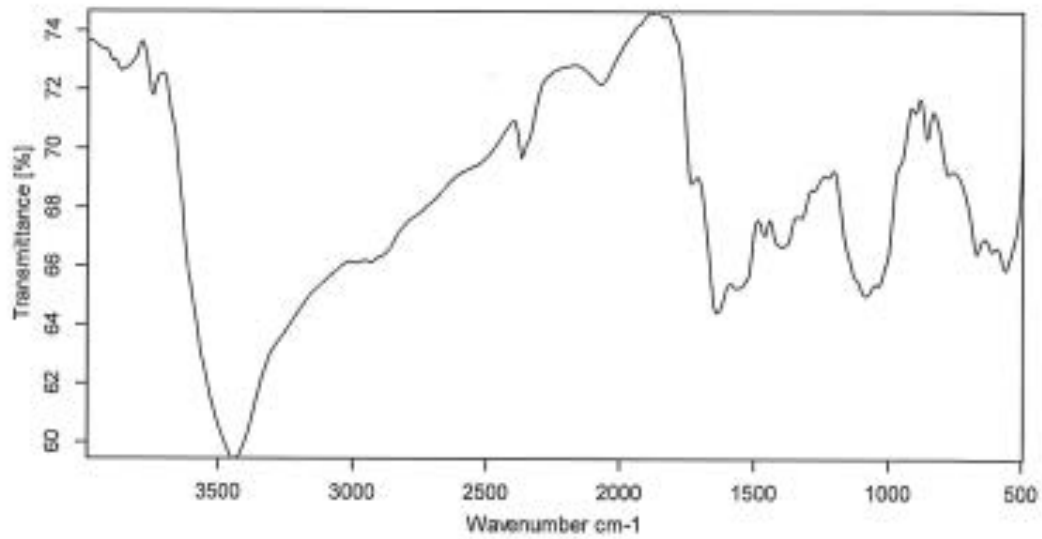


0.30
0.20
0.10

ANALYSIS REPORT

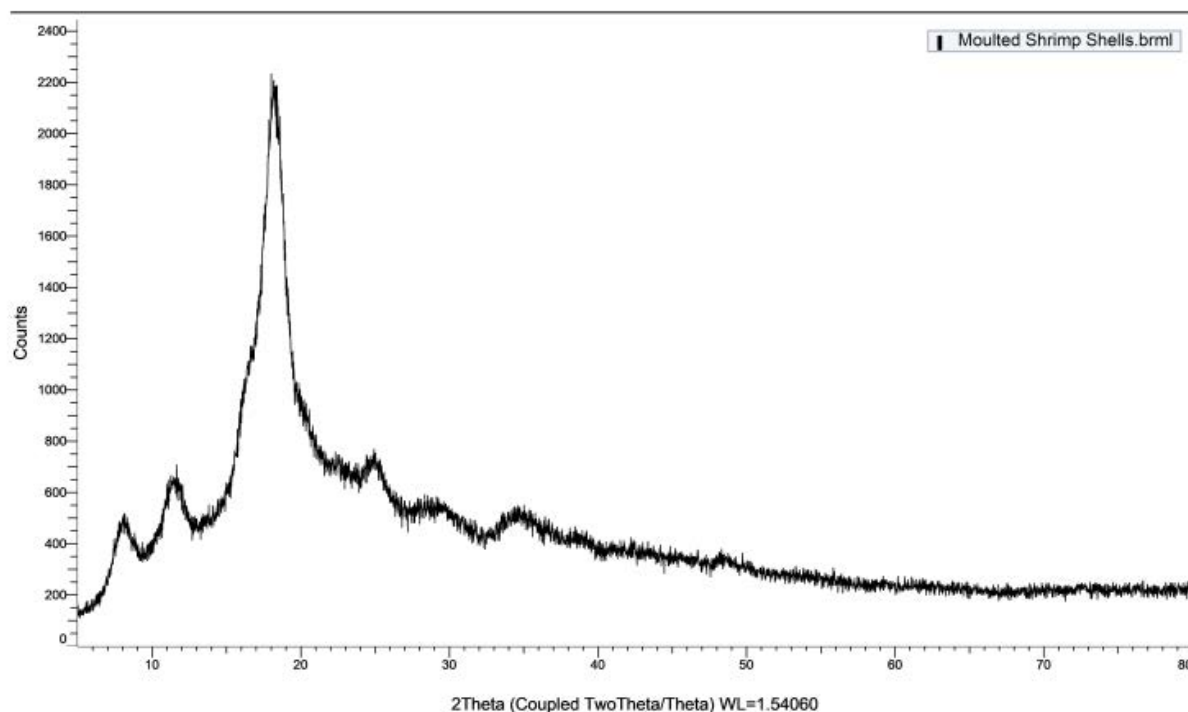
Instrument type	Alpha
Accessory	Sample Compartment *848DC1E2D
OPUS version	Version 7.5 Build: 7, 5, 18 20140810
Spectrum file name	Chitosan lactate_Vo tom lot xac
Sample name	Chitosan lactate_Vo tom lot xac
Sample form	Instrument type and / or accessory

Spectrum

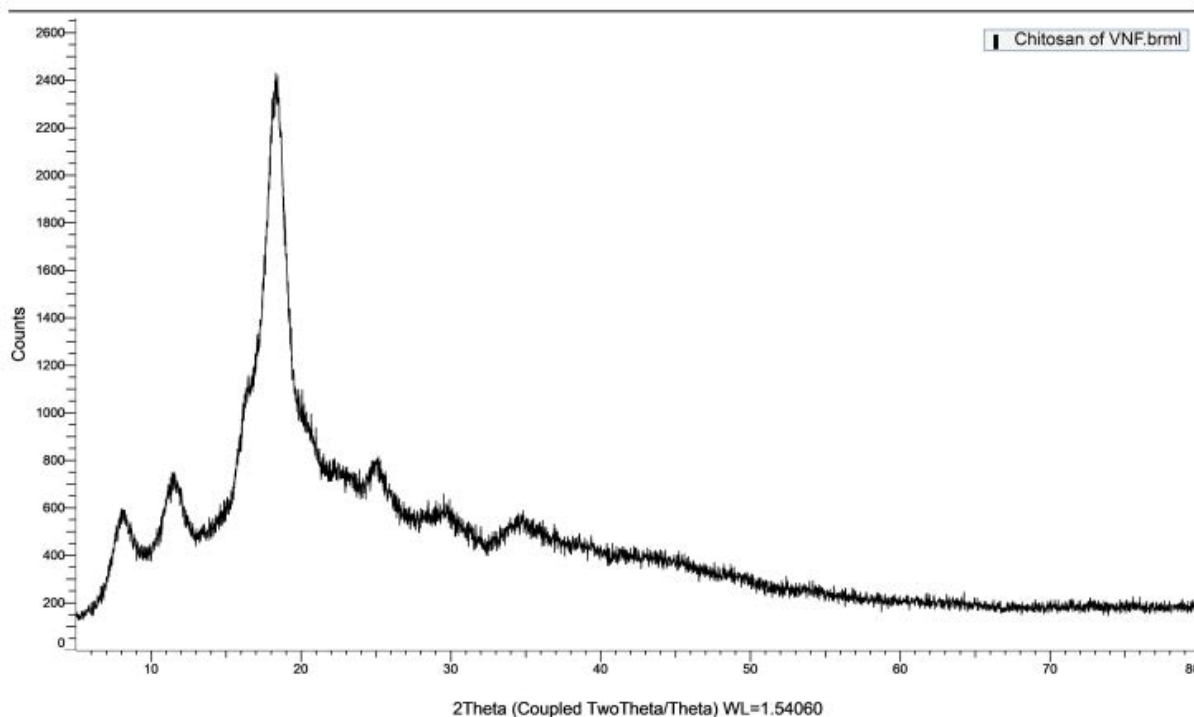


Phụ lục 3.6. Phổ XRD của chitosan lactate (a) tách chiết từ vỏ lột xác, chitosan lactate (b) tách chiết từ tôm chế biến của công ty VNF và chitosan lactate (c) thương mại của công ty MarkNature

a. Phổ XRD của chitosan lactate từ vỏ tôm lột xác



b. Phổ XRD của chitosan lactate từ chitosan của công ty VietNam Food



c. Phổ XRD của Chitosan lactate của công ty MarkNature

