

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.

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ CHẾ BIẾN THỦY SẢN

KHÁNH HÒA - 2023

TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Đề tài 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.

Nghiên cứu sinh: Phạm Thị Đan Phượng

Khóa: 2018 – 2022

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%). Đặc biệt, lượng khoáng và protein chứa trong vỏ lột xác tôm khác biệt lớn so với vỏ tôm từ các nhà máy chế biến tôm. Vì vậy, 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 (~ 23%), độ deacetyl cao (~ 90%), độ tan cao (~ 99%) và khối lượng phân tử đạt ~ 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 ~ 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

1. Tính cấp thiết

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 loài 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.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- 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.
- Xây dựng được quy trình điều chế chitosan lactate có độ tan tốt trong nước từ chitosan thu được ở trên.
- Xác định được điều kiện phù hợp khi sử dụng chitosan lactate để thu sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp.

3. Phạm vi và nội dung nghiên cứu

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

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

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

- 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.
- 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.
- 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.
- Đề xuất điều kiện thu hồi vi tảo biển *Nannochloropsis* sp. đạt hiệu quả cao (~ 90% sau 2 giờ để lắng) khi sử dụng chitosan lactate có kết hợp điều chỉnh pH môi trường.
- 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.
- 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. Tiềm năng thu hồi vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng

Việc áp dụng mô hình nuôi thâm canh, siêu thâm canh nhằm giảm thiểu ô nhiễm môi trường nuôi, hạn chế được dịch bệnh, tăng mật độ nuôi và vụ nuôi trong năm. Qua đó, việc xi phông mỗi ngày các chất thải để làm sạch ao nuôi giúp cho chúng ta có thể thu nhận một lượng lớn vỏ lột xác của tôm ở độ tuổi nuôi thương mại. Mặc dù cả Việt Nam chỉ chiếm xấp xỉ 10% trại nuôi áp dụng công nghệ cao nhưng chiếm ~ 80% tổng sản lượng tôm thu hoạch từ các trại nuôi mô hình thâm canh, siêu thâm canh và tập trung chủ yếu ở các tỉnh khu vực Đồng bằng sông Cửu Long. Trong đó, xuất khẩu tôm thẻ chân trắng chiếm 72% tổng giá trị xuất khẩu tôm năm 2020. 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 tốt hơn. Theo Tổng cục Thủy sản thống kê (tháng 2/2022) lượng tôm thẻ chân trắng ước đạt 25.500 tấn (tăng 6,3% so với cùng kỳ năm trước).

Trong quá trình sống, tôm thường xuyên lột xác để có thể sinh trưởng và phát triển. Lượng vỏ lột xác có thể thu nhận thường xuyên mỗi ngày do mô hình nuôi công nghệ cao có mật độ dày nên sự lột xác của các con tôm không đồng thời điểm. Sản lượng vỏ lột xác sẽ tăng tỷ lệ thuận cùng với sản lượng tôm thẻ chân trắng thu hoạch được. Vậy, nếu chúng

ta không tận thu một lượng vỏ (chất thải rắn trong ngành nuôi trồng) thì rất lãng phí, do bởi đây cũng là nguồn nguyên liệu tiềm năng để sản xuất chitin, chitosan. Thành phần chính của vỏ lột xác gồm chitin và khoáng chất, cần được tận thu để gia tăng giá trị cho các sản phẩm ngành nuôi và giải quyết ô nhiễm môi trường.

Vỏ lột xác chứa hàm lượng khoáng khá cao vì đây là lớp vỏ của tôm được lột ra sau khi bị vôi hóa, tạo nên độ cứng nhất định để con tôm có thể tự lột lớp vỏ này ra. Khoáng chất tồn tại trong vỏ dưới dạng tinh thể calci và calci cacbonat vô định hình và được bao quanh bởi chất nền lipid-protein, nên hàm lượng protein và lipid chiếm tỷ lệ thấp. Mặc dù lượng khoáng chiếm tỷ lệ cao nhưng chúng nằm xen kẽ với các sợi chitin-protein được hình thành các phiến mỏng, xốp. Vì vậy, chúng ta có thể xác lập quy trình sản xuất chitin với các chế độ khử khoáng và protein, không cần công đoạn khử chất màu. Đồng thời, quy trình sản xuất được định hướng tạo ra được sản phẩm có chất lượng cao (hàm lượng khoáng và protein < 1%) nhưng tiết kiệm được hóa chất và thời gian.

1.2. Sản xuất chitosan và điều chế chitosan lactate

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. Chitosan có khả năng kháng nấm, kháng khuẩn, chống oxy hóa, tạo màng, tạo gel, hấp phụ màu, làm trong dung dịch... nhưng hạn chế ứng dụng do chỉ hòa tan được trong một số loại acid loãng. Để nâng cao chất lượng và tăng khả năng ứng dụng, việc chuyển chitosan thành muối chitosan có thể hòa tan trong nước được các nhà khoa học quan tâm nhiều hiện nay. 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).

Hiện nay, chitosan sẽ được sản xuất từ chitin qua công đoạn deacetyl, đây là quá trình tách nhóm acetyl ra khỏi phân tử chitin. Muối chitosan được điều chế bằng cách cho chitosan phản ứng với các loại acid vô cơ hoặc hữu cơ trong điều kiện thích hợp. Sản phẩm muối thu được sau khi lọc và rửa để loại acid dư. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình hình thành muối chitosan phụ thuộc vào kích thước hạt chitosan, tỷ lệ chitosan và dung môi phản ứng, nồng độ và loại acid, nhiệt độ và thời gian phản ứng. Có 3 phương pháp điều chế sản phẩm muối giữa chitosan và acid: (1) sản phẩm tạo ra khi chitosan ở trạng thái rắn phản ứng với acid trong môi trường cồn 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.

1.3. Thu hoạch vi tảo biển *Nannochloropsis* sp.

Đến nay, việc thu hồi sinh khối vi tảo vẫn còn trở ngại nên ngành kinh tế vi tảo ở Việt Nam chưa phát triển mạnh. Khó khăn chủ yếu là do chi phí đầu tư thiết bị và công nghệ của hệ thống thu hoạch vi tảo thương mại quá cao, phương pháp thu hiệu quả tập trung chỉ một số loài tảo có kích thước lớn và là vi tảo nước ngọt. Các giải pháp hiện nay được áp dụng phổ biến là nuôi vi tảo tại trại nuôi thủy sản, hoặc ly tâm để thu dạng sệt rồi bảo quản lạnh đến khi cung cấp cho các trại nuôi giống. Ngoài ra, đã có nhiều phương pháp thu nhận đã được nghiên cứu và ứng dụng: lắng trọng lực, vi lọc, đông

tụ/kết bông, tuyển nổi và kết hợp các phương pháp. Tuy nhiên, các phương pháp này vẫn tồn tại một số hạn chế như chi phí năng lượng cao, độc tính của các chất hóa học sử dụng..., không khả thi trong việc mở rộng quy mô sản xuất.

Những năm gần đây, phương pháp keo tụ vi tảo bằng polyme sinh học được nghiên cứu và ứng dụng nhằm thay thế các chất hóa học có tính độc hại, chi phí đầu tư thấp, kỹ thuật đơn giản nên dễ áp dụng thực tế. Tuy nhiên, đối với loài vi tảo biển thì khả năng thu không cao do môi trường vi tảo chứa hàm lượng muối cao, gây ảnh hưởng cho quá trình keo tụ.

Muối chitosan có khả năng hòa tan cao trong phạm vi pH rộng, mở ra triển vọng mới cho ứng dụng của chitosan. Việc sử dụng chitosan lactate để nghiên cứu phương pháp thu hoạch vi tảo *Nannochloropsis* sp. nhằm giảm chi phí vận chuyển từ trại nuôi vi tảo đến trại nuôi thủy sản và giữ được chất lượng yêu cầu (hoạt chất sinh học và khả năng phục hồi sinh trưởng). Bên cạnh đó, các nghiên cứu chỉ ra rằng 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.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu nghiên cứu

Vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), vi tảo *Nannochloropsis* sp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Sơ đồ nghiên cứu tổng quát được trình bày ở Hình 2.4.

Giải thích sơ đồ:

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

Mục tiêu của nội dung này là ước tính sơ bộ sản lượng nhận, thành phần hóa học cơ bản vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng theo độ tuổi trong quá trình nuôi thâm canh và thử nghiệm sản xuất chitin, chitosan theo quy trình đã được công bố.

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

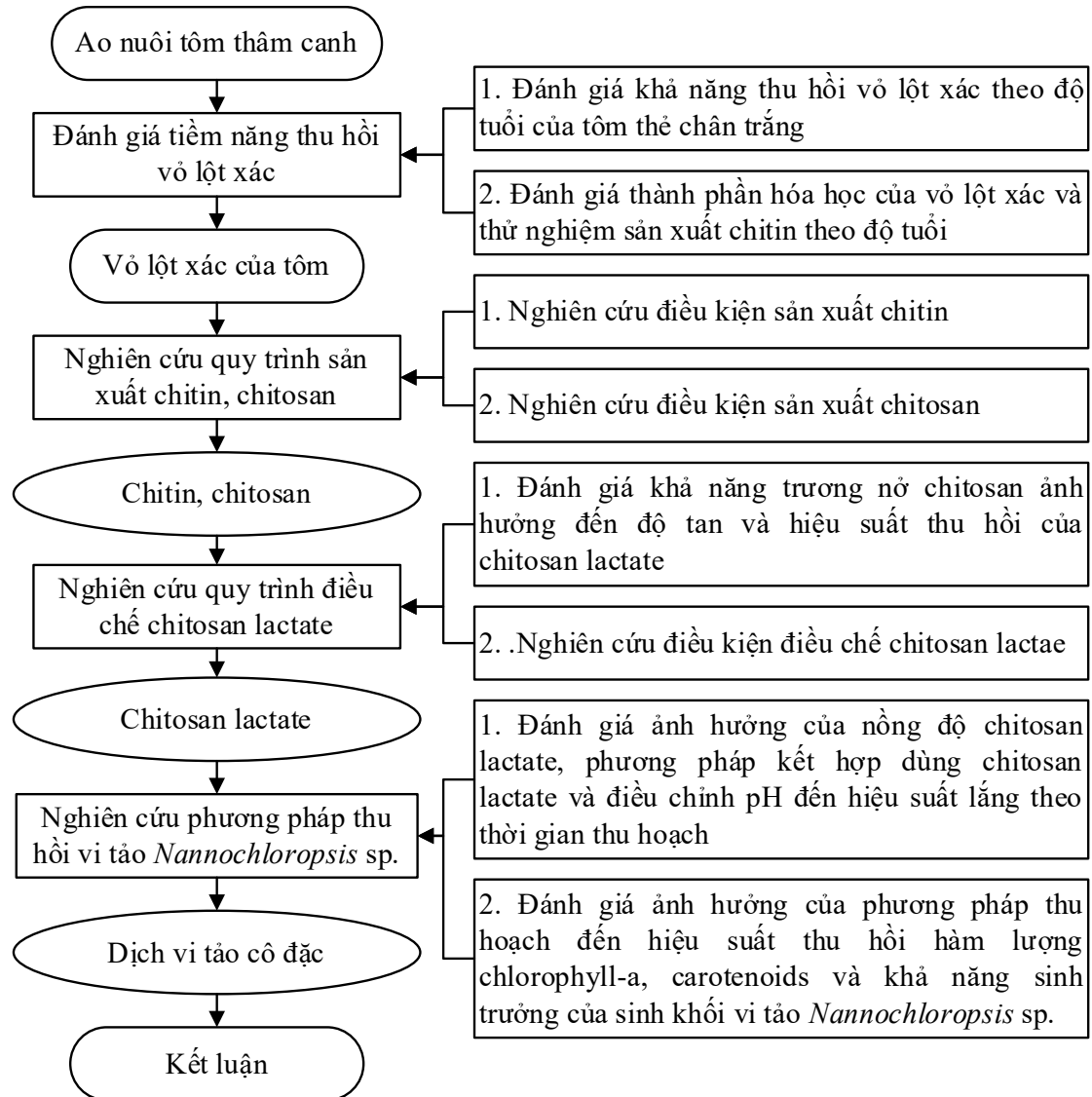
Mục tiêu của nội dung này là xác định được điều kiện thích hợp để thu chitin có độ tinh sạch cao, chitosan có độ deacetyl cao, độ tan tốt từ vỏ lột xác của tôm thẻ chân trắng, giảm lượng hóa chất sử dụng và rút ngắn thời gian khử khoáng.

(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 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. Từ đó, 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

(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. cô đặc.

Mục tiêu của nội dung này là 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. Đồng thời, duy trì tối đa hàm lượng chlorophyll-a, carotenoids có trong sản phẩm thu hoạch và có khả năng phục hồi sinh khối vi tảo đáp ứng nhu cầu sử dụng trong ngành nuôi trồng thủy sản.



Hình 2.4. Bố trí thí nghiệm tổng quát.

2.3. Phương pháp phân tích

Hàm lượng khoáng, ẩm được xác định theo phương pháp AOAC 1990. Hàm lượng protein của vỏ lột xác được xác định theo phương pháp Biuret, hàm lượng protein của chitin, chitosan được xác định theo phương pháp Micro-Biuret; hàm lượng protein có trong vi tảo được xác định theo phương pháp Biuret, xử lý theo phương pháp của Dorsey và cộng sự (1978). Hàm lượng chitin được xác định theo phương pháp của Black và Schwartz (1950). Hàm lượng carotenoid trong vỏ tôm nguyên liệu được xác định theo phương pháp của Sachindra và cộng sự (2006). Độ deacetyl của chitosan được xác định theo phương pháp của Wu và Zivanovic (2008). Độ trương nở của chitosan trong dung môi được xác định theo phương pháp của Minh và cộng sự (2017). Hàm lượng lipid trong vỏ tôm và vi tảo được xác định theo phương pháp của Bligh và Dyer (1959). Hàm lượng carbohydrate bằng phương pháp phenol-sulphuric acid (Nielsen, 2010). Hàm lượng chlorophyll-a và carotenoids trong vi tảo được xác định bằng phương pháp của Sumanta

và cộng sự (2014). Mật độ tế bào được xác định bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer improved. Hình ảnh soi kích thước vi tảo chụp trên kính hiển vi Olympus BX41.

Khối lượng phân tử của chitosan được xác định thông qua độ nhớt nội và công thức Mark-Houwink (2001). Độ hòa tan của chitosan và chitosan lactate được xác định theo phương pháp của Minh và cộng sự (2019). Độ nhớt biểu kiến được xác định bằng nhớt kế Brookfield. Hình ảnh soi vỏ lột xác, chitin, chitosan chụp trên kính hiển vi điện tử. Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier trong phạm vi $500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$. Xác định độ kết tinh tương đối (CrI) của các mẫu trên phổ nhiễu xạ tia X (XRD). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (^1H NMR) được đo trên thiết bị quang phổ AV300 MHz, Bruker, Hoa Kỳ.

2.4. Công thức tính

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:

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

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_O (kg) là lượng tôm thương phẩm thu hoạch được từ cùng một vụ nuôi thâm canh.

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

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

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) được xác định bằng cách đo mật độ quang học tế bào vi tảo trước và sau khi tiến hành keo tụ. Mật độ quang học (OD) được đo trên máy quang phổ UV-VIS (DR6000) ở 490 nm. Công thức tính hiệu suất lắng (1.3) (Şirin và cộng sự, 2012):

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

Trong đó, OD_d và OD_s là mật độ quang của dung dịch tảo trước và sau keo tụ.

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

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

$$RE_{Carotenoids} (\%) = \frac{Cs \cdot 100}{C_T} \quad (1.5)$$

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

2.5. Phương pháp 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 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.

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

Thực trạng khảo sát tại một số cơ sở nuôi tôm thâm canh nhận thấy, vỏ lột xác của tôm được tạo ra liên tục trong quá trình nuôi. 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, việc khảo sát sản lượng vỏ tôm lột xác theo chu kỳ sinh trưởng, từ đó đề xuất thu gom và sử dụng cho sản xuất các sản phẩm giá trị gia tăng là cần thiết.

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

Sản lượng vỏ lột xác của tôm có thể thu hồi từ quá trình nuôi thâm canh ở độ tuổi nuôi (≥ 40 ngày tuổi) đạt trung bình ~ 280 (kg/ao/vụ) đối với ao 1500 m^2 và mật độ thả là 200 con/m^2 . Nếu sản lượng tôm thương phẩm đạt $4.500 - 6.000 \text{ kg/ao/vụ}$ (trung bình 5.000 kg/ao/vụ) thì khả năng thu hồi vỏ lột xác là $0,056$. Điều đó có nghĩa là cứ 1 tấn sản lượng tôm thương phẩm thu hoạch thì có $\sim 56 \text{ kg}$ sản lượng vỏ lột xác khô thu được trong 1 vụ nuôi. Như vậy, sản lượng vỏ lột xác có thể thu được tương đương $\sim 5\%$ so với sản lượng tôm thương phẩm.

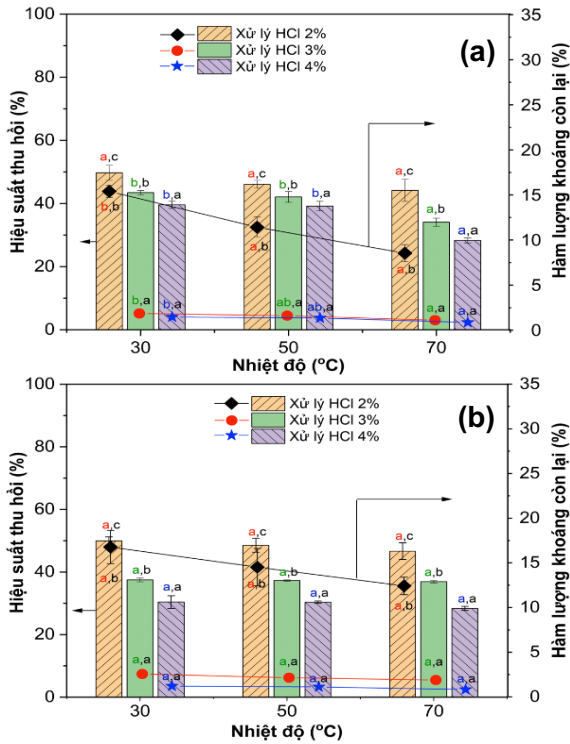
3.1.3. Thành phần hóa học của vỏ lột xác và thử nghiệm sản xuất chitin

Vỏ lột xác tôm ở các độ tuổi từ 40 ngày nuôi đến trên 90 ngày nuôi được xác định, chứa thành phần hóa học chính gồm chitin ($20 - 24\%$), khoáng ($52 - 61\%$) và protein ($10 - 13\%$). Thử nghiệm sản xuất chitin thông qua quy trình của Toan và cộng sự (2006): 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. Kết quả cho thấy khả năng thu hồi chitin phù hợp ở độ tuổi từ 60 ngày tuổi trở lên với hàm lượng chitin thu được $23 - 24\%$, hàm lượng khoáng và protein còn lại trong chitin thấp ($\leq 1\%$).

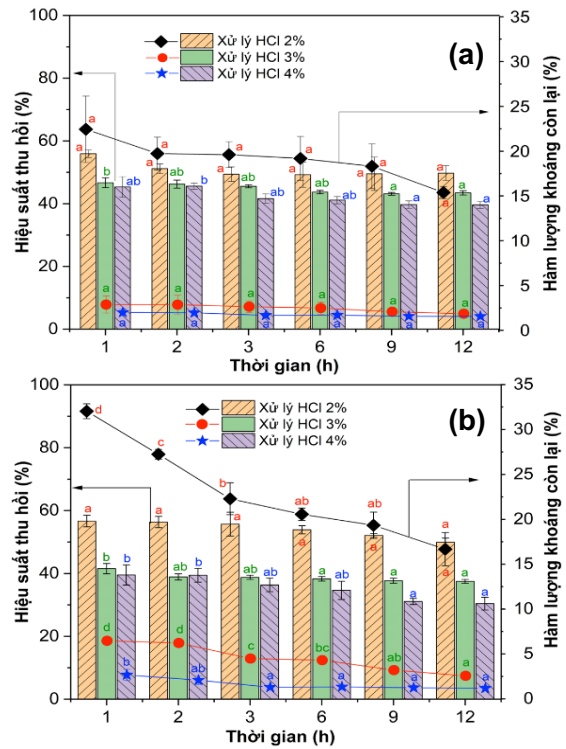
3.2. Sản xuất chitin từ vỏ lột xác tôm thẻ chân trắng

3.2.1. Quá trình khử khoáng

Vỏ lột xác tôm ở trạng thái khác nhau (khô và ướt) xử lý với dung dịch HCl có nồng độ khác nhau ở nhiệt độ $30-70^\circ\text{C}$ trong 1-12 giờ. Kết quả khảo sát trình bày trong Hình 3.5 và Hình 3.6. Theo đó, nồng độ HCl là yếu tố quan trọng quyết định đến hiệu quả khử khoáng, trong khi nhiệt độ và thời gian là hai yếu tố có ảnh hưởng không đáng kể. Để làm giảm chi phí sản xuất khi áp dụng ở quy mô lớn và 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% , luận án đề xuất điều kiện 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).



Hình 3.5. Ảnh hưởng của nồng độ HCl (%), nhiệt độ xử lý đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô.



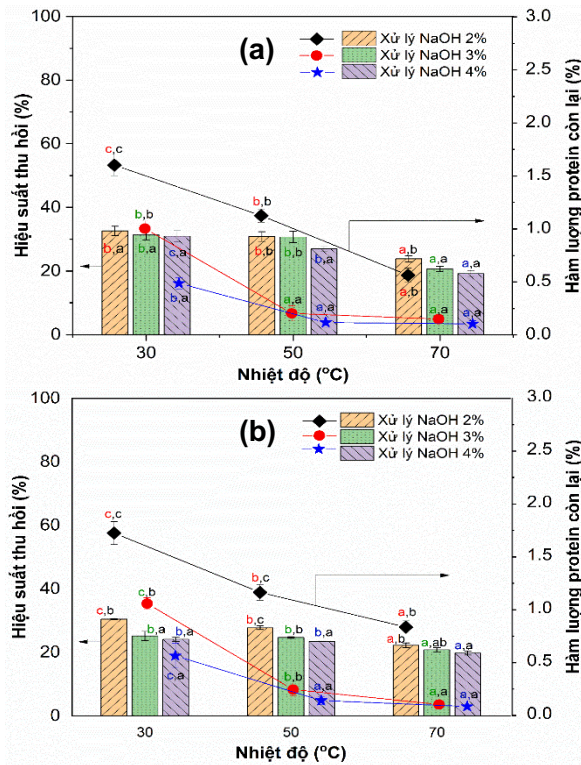
Hình 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ HCl (%), thời gian xử lý đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng khoáng còn lại trong chitin thô.

Ghi chú: Điều kiện chung của các phản ứng: Tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch HCl: 1:5 (nguyên liệu ướt: a), 1:15 (nguyên liệu khô: b).

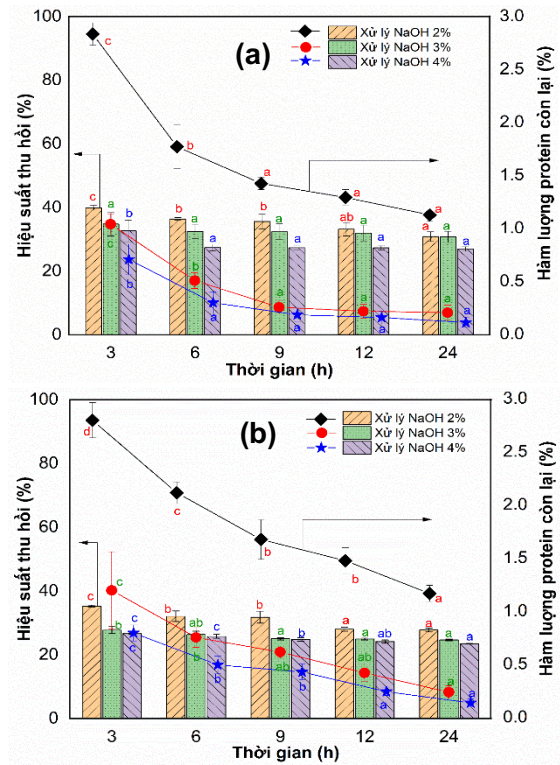
Các chữ cái khác nhau trên biểu đồ (màu sắc theo cột nồng độ (đỏ: HCl 2%, xanh lục: HCl 3%, xanh: HCl 4%), riêng màu đen theo nhiệt độ) thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.2.2. Quá trình khử protein

Sau khi mẫu vỏ lột xác được khử khoáng bằng HCl 4% ở 30°C trong 3 giờ đối với cả hai trạng thái mẫu ướt và khô thu chitin thô, tiếp tục tiến hành khử protein để thu chitin tinh sạch. Quá trình khử protein được thực hiện trong điều kiện: nồng độ NaOH (2%, 3%, 4%), nhiệt độ khử (30°C, 50°C, 70°C) trong thời gian (3, 6, 9, 12 và 24h). Kết quả khảo sát được trình bày trong Hình 3.7 và Hình 3.8. Theo đó, cả hai yếu tố nồng độ NaOH và nhiệt độ xử lý đều ảnh hưởng lớn đến hiệu quả khử protein. Khi nồng độ NaOH và nhiệt độ xử lý tăng sẽ làm tăng hiệu quả khử protein tăng. Tuy nhiên, nồng độ NaOH (%) sử dụng và nhiệt độ xử lý càng cao thì khả năng thu hồi chitin càng thấp mặc dù có độ tinh sạch cao. Để đạt được yêu cầu về hàm lượng protein còn lại thấp hơn 1% và có thể tiết kiệm được hóa chất, thì NaOH 3% là nồng độ phù hợp khi xử lý ở nhiệt độ 50°C với thời gian 6 giờ thì hiệu suất thu hồi chitin đạt 32,4% đối với nguyên liệu vỏ lột xác ướt và 26,3% đối với vỏ lột xác khô.



Hình 3.7. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH (%), nhiệt độ xử lý đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng protein còn lại trong chitin tinh sạch.



Hình 3.8. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH (%), thời gian xử lý đến hiệu suất thu hồi và hàm lượng protein còn lại trong chitin tinh sạch.

Ghi chú: Điều kiện chung của các phản ứng: Tỷ lệ chitin thô/dung dịch NaOH: 1:5 đối với cả hai trạng thái nguyên liệu ban đầu (ướt: a, khô: b).

Các chữ cái khác nhau trên biểu đồ (màu sắc theo cột nồng độ (đỏ: NaOH 2%, xanh lục: NaOH 3%, xanh: NaOH 4%), riêng màu đen theo nhiệt độ) thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.2.3. Quá trình deacetyl hóa

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

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giờ)	Độ deacetyl (%) [*]	Độ nhớt (cPs) [*]	Độ tan (%) [*]	Hiệu suất thu hồi chitosan (%) [*]	Khoáng (%) [*]	Protein (%) [*]
80°C	12h	83,5 ± 1,4 ^a	1.227 ± 38 ^c	97,0 ± 0,8 ^a	24,2 ± 2,5 ^a	0,5 ± 0,1 ^a	0,11 ± 0,0 ^b
	24h	86,7 ± 0,7 ^a	986 ± 24 ^b	99,0 ± 0,1 ^b	23,6 ± 2,9 ^a	0,5 ± 0,1 ^a	0,07 ± 0,0 ^{ab}
	36h	90,2 ± 1,7 ^b	639 ± 32 ^a	99,0 ± 0,2 ^b	23,3 ± 3,0 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,02 ± 0,0 ^a
90°C	12h	86,1 ± 0,1 ^a	558 ± 51 ^b	97,7 ± 0,7 ^a	24,2 ± 2,6 ^a	0,3 ± 0,2 ^a	0,15 ± 0,1 ^a
	24h	89,2 ± 1,6 ^b	479 ± 72 ^b	99,0 ± 0,2 ^b	23,0 ± 2,4 ^a	0,2 ± 0,1 ^a	0,10 ± 0,1 ^a
	36h	90,5 ± 1,3 ^b	342 ± 13 ^a	99,1 ± 0,2 ^b	22,1 ± 3,3 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,09 ± 0,0 ^a

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

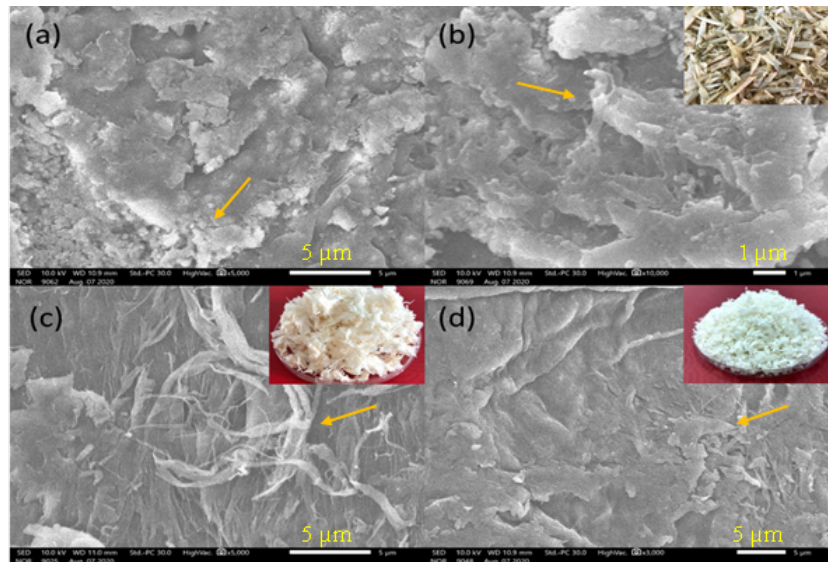
Chitin thu được từ vỏ lột xác của tôm được deacetyl bằng dung dịch NaOH 50% với điều kiện nhiệt độ (80, 90°C) và thời gian (12h, 24h, 36h) khác nhau để thu nhận chitosan. Kết quả khảo sát được trình bày trong Bảng 3.7. Theo đó, nhiệt độ xử lý càng cao, thời gian xử lý càng dài thì chitosan thu được có độ deacetyl và độ tan càng cao, độ

ting sạch tăng. Tuy nhiên, khi tiến hành deacetyl ở nhiệt độ cao và kéo dài thời gian thì độ nhớt giảm và hiệu suất thu hồi chitosan càng thấp.

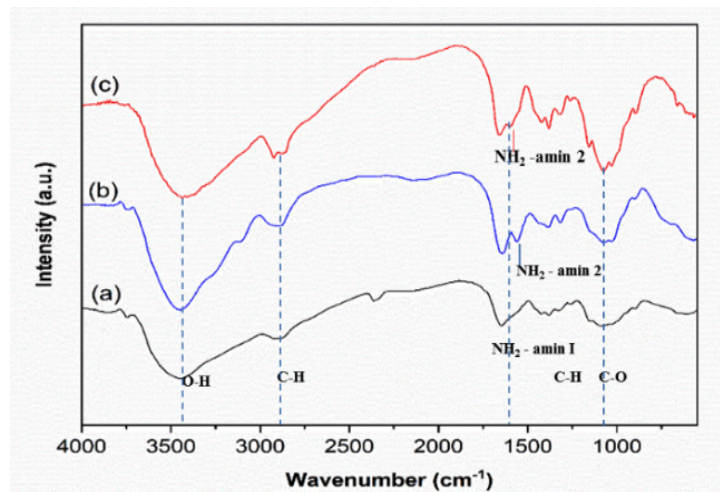
Để đạt được yêu cầu sản phẩm chitosan có DD ~ 90%, độ tan ~ 99% thì điều kiện deacetyl phù hợp là: dung dịch NaOH 50%, nhiệt độ 90°C trong 24 giờ, hiệu suất thu hồi là 23%, độ nhớt của chitosan 479 cPs và có độ tinh sạch cao.

3.2.4. Đề xuất quy trình sản xuất chitin, chitosan từ vỏ lột xác

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

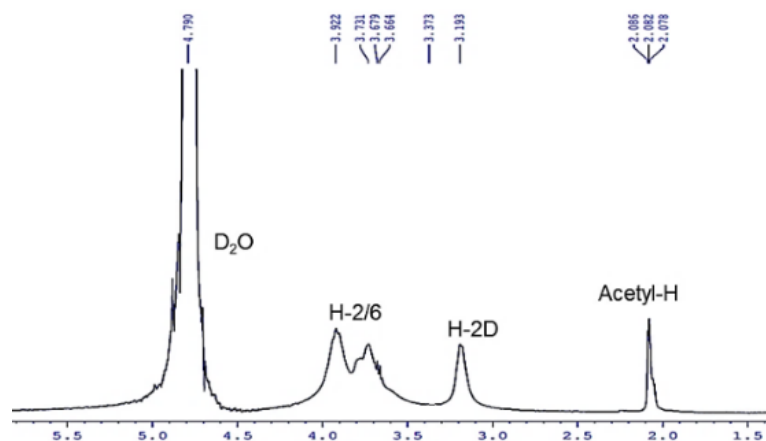


Hình 3.12. Hình ảnh SEM của vỏ lột xác (a,b) ở độ phóng đại khác nhau, (c) chitin và (d) chitosan sản xuất từ vỏ lột xác.

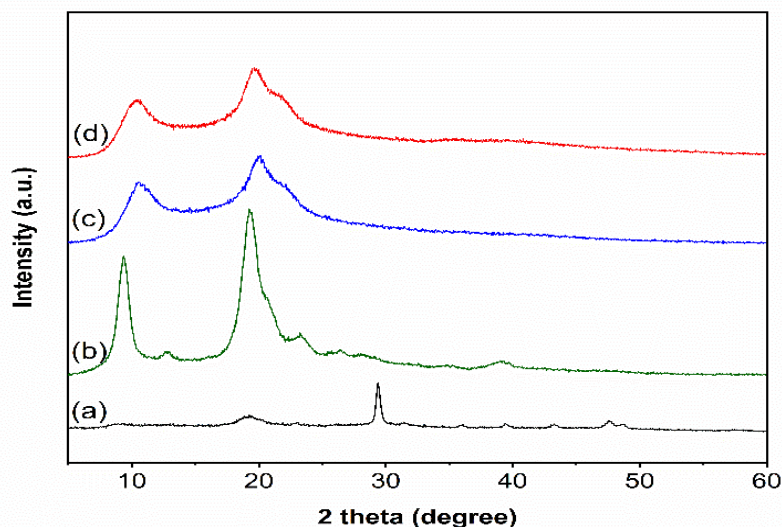


Hình 3.13. Phổ FTIR của chitin (a), chitosan (b) tách chiết từ vỏ lột xác của tôm và chitosan (c) tách chiết từ vỏ tôm chế biến.

Sản phẩm thu được đánh giá cao về độ tinh sạch, hàm lượng kim loại nặng (As, Hg, Cd, Pb) dưới mức cho phép. Trạng thái bề mặt của của sản phẩm chitin, chitosan được so sánh với lớp vỏ lột xác ở Hình 3.12, cho thấy sự tinh sạch của sản phẩm. Điều này cũng thấy rõ hơn ở phân tích XRD (Hình 3.15), tại tại 2θ trong $30^\circ - 50^\circ$, không thấy xuất hiện các đỉnh của CaCO_3 trong phổ của chitosan và không có đỉnh tạp chất trong phổ NMR (Hình 3.14). Chitosan thu được có độ kết tinh cao (65,72%). Khi so sánh với sản phẩm chitosan từ vỏ tôm chế biến thì cấu trúc hóa học và cấu trúc tinh thể chitosan từ vỏ lột xác không khác biệt thể hiện trong Hình 3.13 và 3.15.



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



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.

3.3. Điều chế chitosan lactate

Chitosan thu được từ vỏ tôm lột xác ở trên được sử dụng làm nguyên liệu để điều chế chitosan lactate trong điều kiện trương nở chitosan trong hỗn hợp dung môi ethanol/nước với tỷ lệ và thời gian ngâm khác nhau. Sau đó, chitosan trương nở phản ứng với acid lactic với nồng độ, nhiệt độ và thời gian khác nhau.

3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol (%v/v) đến độ trương nở

Sự 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 trình bày trong Bảng 3.11 và Hình 3.16. Theo đó, độ tan của các mẫu muối chitosan từ chitosan được

ngâm trương nở cao hơn hẳn so với mẫu chitosan không được trương (ĐC). Tuy nhiên, các nồng độ ethanol từ 10 đến 50% thì độ trương nở không đồng đều và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Ngoài ra, sau phản ứng với lactic acid, muối chitosan lactate này cũng bị tan nhiều nên hiệu quả thu hồi rất thấp và sản phẩm bị dẻo hoặc vón cục, màu vàng sậm sau khi được sấy khô.

Với 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. Do vậy, để tiết kiệm dung môi, tỷ lệ EtOH/H₂O nên được chọn để trương nở chitosan là 70%, thời gian ngâm 2 giờ, độ trương ~450%, hiệu suất thu muối ~ 152% và độ tan ~ 98%.

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 (%)*	Độ tan (%)*	Hiệu suất thu hồi (%)*
ĐC	-	83,7 ± 2,1 ^a	138,3 ± 3,3 ^b
0	506,0 ± 28,3 ^d	-	-
10	504,0 ± 27,9 ^d	-	-
20	501,2 ± 27,8 ^d	-	-
30	493,7 ± 26,9 ^{cd}	-	-
40	474,4 ± 23,3 ^{cd}	-	-
50	466,8 ± 14,4 ^{bcd}	98,2 ± 0,9 ^b	132,1 ± 1,2 ^a
60	452,3 ± 4,7 ^{bc}	98,3 ± 1,4 ^b	143,6 ± 2,7 ^{bc}
70	450,6 ± 6,5 ^{bc}	98,1 ± 0,3 ^b	151,0 ± 1,5 ^d
80	428,8 ± 2,0 ^{ab}	98,0 ± 0,8 ^b	151,6 ± 0,5 ^d
90	402,3 ± 3,4 ^a	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 giống nhau thì không 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. (a) Chitosan ngâm trương nở trong EtOH/H₂O ở các tỷ lệ dung môi khác nhau, (b) chitosan sau trương nở phản ứng với lactic acid và (c) chitosan lactate thu được.

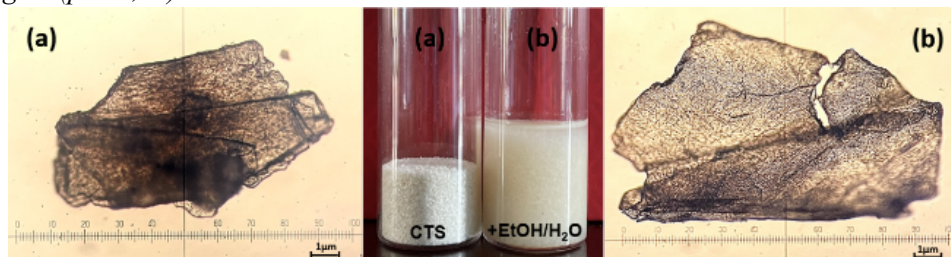
3.3.2. Ảnh hưởng của thời gian ngâm đến độ trương nở

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 thời gian từ 0,25 – 12 giờ.

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

Thời gian ngâm (giờ)	Độ trương 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 có ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



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).

Kết quả cho thấy độ trương nở của chitosan đạt cao nhất sau 0,5 giờ ngâm nhưng để đạt được độ tan và hiệu suất thu chitosan lactate thì sau 4 giờ ngâm (Hình 3.17) chitosan cho hiệu quả cao nhất lần lượt là 98,5% và 151%.

3.3.3. Ảnh hưởng của nồng độ lactic acid

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). Bảng 3.13 cho thấy khi nồng độ lactic acid tăng thì hiệu suất thu hồi và độ tan của chitosan lactate đều tăng. Sử dụng nồng độ lactic acid 1,0 M đạt giá trị cao nhất (độ tan đạt 98,5% và hiệu suất thu hồi đạt ~ 152%) và không khác biệt thống kê khi tiếp tục tăng nồng độ.

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 (%) [*]	Hiệu suất thu hồi (%) [*]
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 thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.3.4. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng

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. Theo đó, khi tăng thời gian

phản ứng thì độ tan và hiệu suất thu hồi sản phẩm tăng trong ~ 2,5 giờ đầu và gần như không đổi sau thời gian này (hiệu suất thu hồi ~ 152% và độ tan đạt trên 99%).

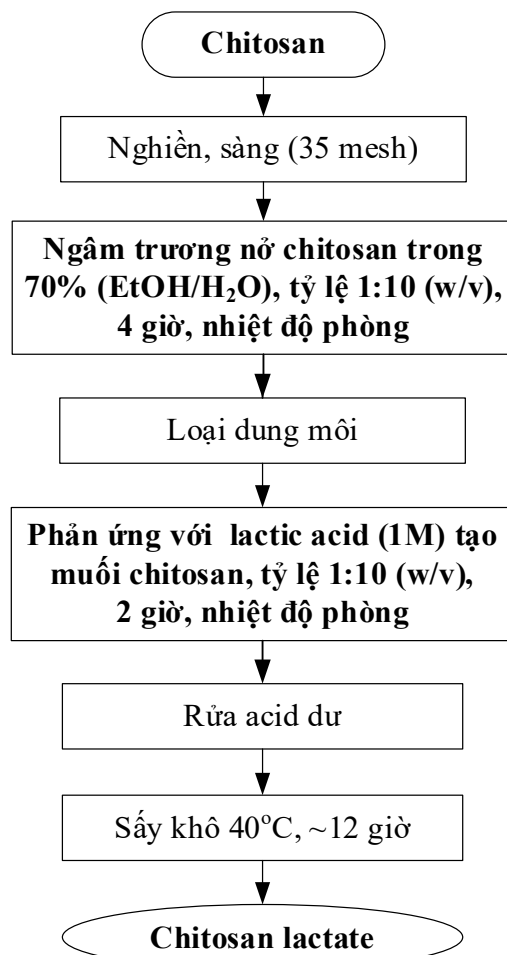
Bảng 3.14. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến độ hòa tan và hiệu suất thu hồi chitosan lactate

Thời gian phản ứng (giờ)	Độ tan (%) [*]	Hiệu suất thu hồi (%) [*]
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 thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.3.5. Đề xuất quy trình sản xuất chitosan lactate

Quy trình sản xuất chitosan lactate từ chitosan chiết từ vỏ lột xác tôm được mô tả tóm tắt trong Hình 3.18.



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

Sau khi nghiền nhỏ, chitosan được sàng có kích thước 35 mesh và ngâm trong hỗn hợp dung môi ethanol/nước với tỷ lệ EtOH 70% (tỷ lệ 1:10, chitosan/dung môi, w/v) trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi làm ráo, chitosan sau trương nở được phản ứng với lactic acid 1,0 M trong dung môi EtOH (1:10, v/v), khuấy đảo đều trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Loại acid dư bằng cách rửa phần rắn 2 lần bằng EtOH 85% (10

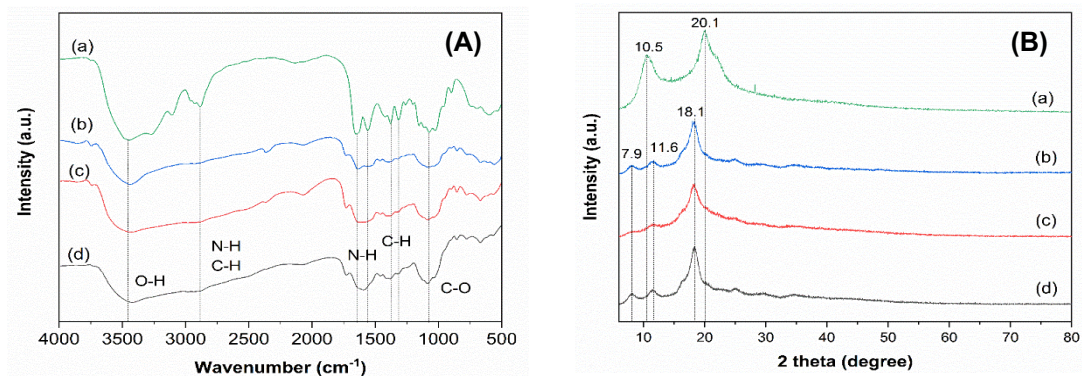
phút/lần) và ngâm trong EtOH 99,5% (30 phút). Sản phẩm thu được sau khi sấy ở 40°C đến khi đạt độ ẩm ~ 10%.

Sản phẩm chitosan lactate từ chitosan vỏ lột xác được so sánh với sản phẩm chitosan lactate được sản xuất từ chitosan (tương đương với chất lượng ban đầu) của công ty Vietnam Food (Việt Nam) và sản xuất trên cùng một quy trình ở Hình 3.18. Đồng thời hai sản phẩm này được so sánh với chitosan lactate thương mại của công ty MarkNature (Hoa Kỳ) (Bảng 3.16).

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	$36,3 \pm 5,2^a$
Độ tan 1% chitosan lactate trong nước (%)		$99,4 \pm 0,3^b$	$96,0 \pm 0,9^a$	$99,6 \pm 0,2^b$
Điện thế zeta (mV)		$99,3 \pm 1,6^b$	$91,7 \pm 2,9^a$	$99,1 \pm 1,9^b$
HSTH chitosan lactate (%)		$151,7 \pm 2,8$	$143,6 \pm 1,1$	-
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 (%)		$9,5 \pm 0,6^a$	$9,2 \pm 0,7^a$	$8,8 \pm 0,2^a$
pH của 1% chitosan lactate hòa tan trong nước		$4,7 \pm 0,2^a$	$4,7 \pm 0,3^a$	$4,7 \pm 0,2^a$

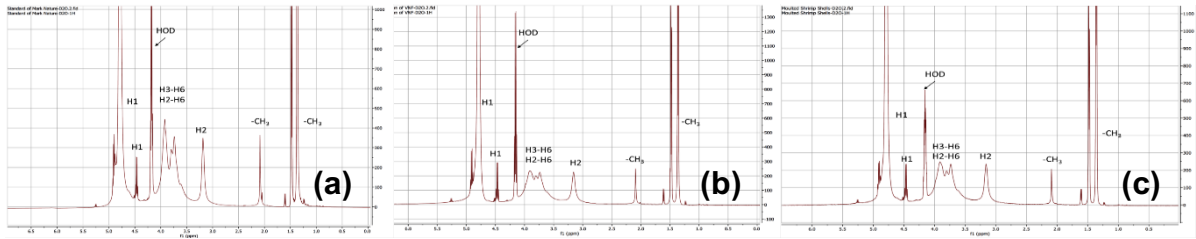
*Kết quả được tính trên trọng lượng khô tuyệt đối; (-) Không phân tích; Các giá trị trong bảng (theo hàng) có ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 3.20 (A) Phổ FTIR và Hình 3.21 (B) phổ XRD của (a) chitosan và (b) chitosan lactate từ vỏ lột xác của tôm và (c) vỏ tôm chế biến công ty Vietnam Food, (d) chitosan lactate thương mại từ công ty Mark Natural.

Bảng 3.16, Hình 3.20 và Hình 3.21 cho thấy chitosan lactate thu nhận từ nguồn vỏ tôm lột có các tính chất (độ deacetyl, thời gian hòa tan, màu sắc, độ ẩm, hàm lượng khoáng và protein, pH của 1% muối hòa tan trong nước, độ kết tinh, các nhóm chức trong cấu trúc) 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.

Kết quả phân tích phổ FTIR (Hình 2.20) xác nhận có sự tạo thành của muối chitosan lactate khi sử dụng chitosan từ vỏ tôm lột để điều chế. Khi so sánh với chitosan lactate thương mại và muối điều chế từ vỏ tôm chế biến, không thấy sự khác biệt đáng kể nào về số lượng, vị trí và cường độ các đỉnh.



Hình 3.22. Phổ ^1H -NMR của (a) chitosan lactate thương mại từ công ty Mark Nature, **Hình 3.23.** Phổ ^1H -NMR của (b) chitosan lactate được điều chế từ chitosan thu nhận từ vỏ tôm chế biến công ty Vietnam Food và **Hình 3.24.** Phổ ^1H -NMR của (c) chitosan lactate được điều chế từ chitosan thu nhận từ vỏ lột xác của tôm.

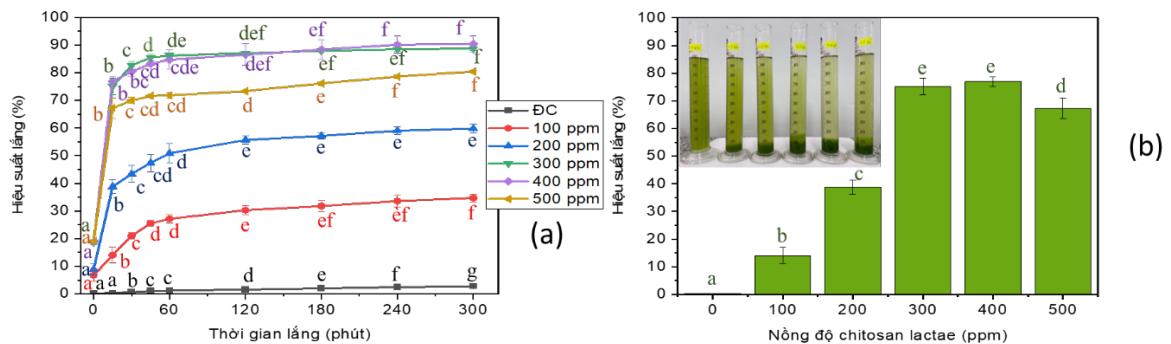
3.4. Thu nhận vi tảo *Nannochloropsis* sp. bằng chitosan lactate

3.4.1. Tính chất và thành phần của vi tảo *Nannochloropsis* sp.

Vi tảo *Nannochloropsis* sp. (kích thước 2 – 4 μm) 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. Mẫu dịch vi tảo đạt mật độ tế bào là $37,3 \times 10^6 \pm 2,6$ (tb/mL), màu xanh lục và thế zeta là $-6,1 \pm 1,5$ (mV) thể hiện tế bào vi tảo *Nannochloropsis* sp. có điện tích bề mặt âm. Vi tảo chứa hàm lượng carbohydrates với tỷ lệ cao ($\sim 32,3$ %) và hàm lượng protein, lipids, khoáng chất lần lượt có giá trị $\sim 26,9\%$, $\sim 16,2\%$ và $\sim 8,2\%$. Đặc biệt, hàm lượng đáng kể chlorophyll-a (10.369 ± 174 , $\mu\text{g/g}$) và carotenoids (7.368 ± 129 , $\mu\text{g/g}$) trong vi tảo.

3.4.2. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate

Đến nay, chưa có nghiên cứu nào ứng dụng chitosan lactate để thu hoạch vi tảo. Chitosan lactate được xem là an toàn và có thể hòa tan trực tiếp trong nước và được ứng dụng trong công nghệ keo tụ làm trong nước quả, rượu vang nước trà... Từ cơ sở đó, chitosan lactate (CTSs) được đề xuất làm chất keo tụ thu hoạch vi tảo, đặc biệt đối với vi tảo biển (*Nannochloropsis* sp.). Ảnh hưởng của nồng độ chitosan lactate đến hiệu suất lắng và hình thái của vi tảo thu được trình bày trong Hình 3.25.



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). ĐC: mẫu đối chứng.

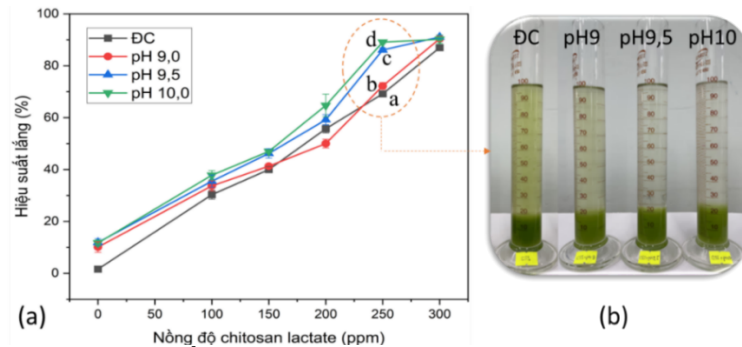
Các giá trị trên biểu đồ có ký tự (theo ký hiệu màu) khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Hình 3.25a cho thấy với nồng độ CTSs 300 – 400 ppm đạt hiệu suất lắng cao nhất (75 – 77%). Có khác biệt lớn so với hiệu quả lắng ở các nồng độ khác tại thời điểm sau 15 phút lắng (Hình 3.25b) và khác biệt không đáng kể khi kéo dài thời gian lắng (Hình 3.25a). Khi tăng nồng độ chitosan lactate trên 500 ppm thì hiệu suất lắng và mật độ tế bào thu được giảm xuống. Vì vậy, để tiết kiệm chitosan lactate, nồng độ

300 ppm được chọn để tiếp tục nghiên cứu phương pháp kết hợp điều chỉnh pH môi trường.

3.4.3. Ảnh hưởng của phương pháp kết hợp điều chỉnh pH

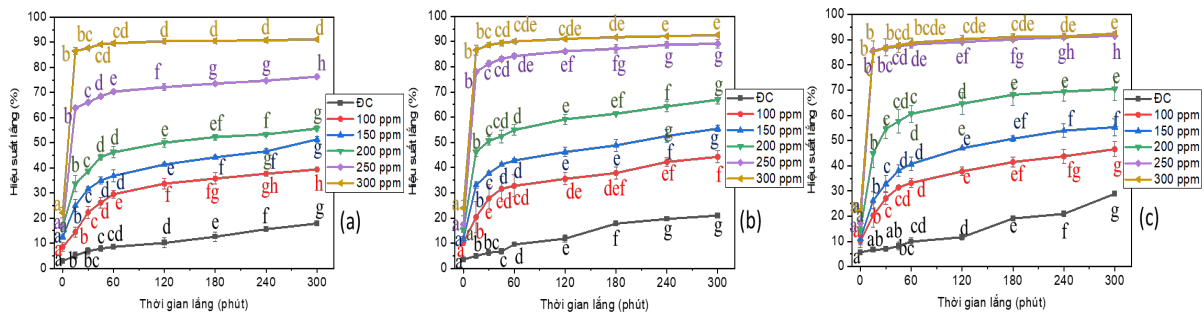
Việc kết hợp sử dụng chitosan lactate và điều chỉnh pH nhằm mục đích đạt hiệu quả thu cao và giảm được các nhược điểm so với sử dụng từng phương pháp riêng lẻ. Các nghiên cứu đã minh chứng điện tích bề mặt của vi tảo và phân tử chitosan thay đổi theo pH môi trường và tùy loài tảo sẽ có pH tối ưu khác nhau. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của sự điều chỉnh pH môi trường với nồng độ CTSs khác nhau 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 biểu đồ có ký tự (theo ký hiệu màu) giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Hình 3.26 cho thấy hiệu suất lắng các mẫu ở nồng độ CTSs tăng dần 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%). Như vậy, điều kiện phù hợp để thu nhận vi tảo *Nannochloropsis* sp. là nồng độ chitosan lactate 250 ppm kết hợp với điều chỉnh pH 10.



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 lắng theo thời gian thu hoạch. ĐC: mẫu đối chứng.

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

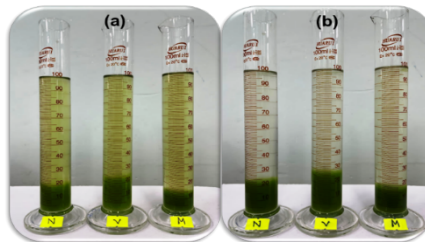
Hình 3.27 cho thấy hiệu quả keo tụ chịu ảnh hưởng của các nồng độ chitosan và độ pH khác nhau. Trong đó, hiệu suất lắng phụ thuộc rất lớn đến sự thay đổi nồng độ của chitosan lactate sử dụng. Nồng độ CTSs càng cao thì hiệu suất lắng vi tảo càng cao, đạt cao nhất là trên 90% sau 5 giờ lắng. Tuy nhiên, 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.

Tiến hành so sánh hiệu quả lắng vi tảo *Nannochloropsis* sp. khi sử dụng các loại CTSs khác nhau thể hiện trong Bảng 3.18 và Hình 3.29. Hiệu suất lắng vi tảo *Nannochloropsis* sp. khi dùng CTSs từ nguồn chitosan chế biến và được điều chế muối cùng quy trình với CTSs từ nguồn vỏ lột xác không khác biệt đáng kể ($p > 0,05$) nhưng hiệu quả cao hơn so với việc sử dụng muối CTSs thương mại (MarkNature).

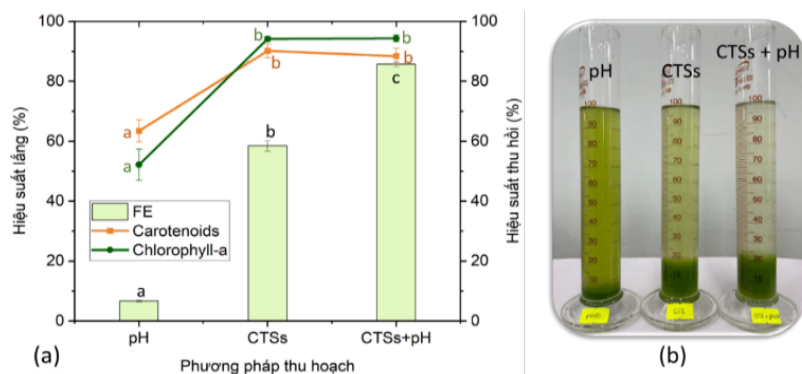
Bảng 3.18. So sánh hiệu quả thu hồi sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. bằng các loại chitosan lactate (250 ppm) khác nhau kết hợp điều chỉnh pH sau 15 phút lắng

Phương pháp thu	Hiệu suất lắng (%)		
	CTSs từ VLX (N)	CTSs từ VNF (V)	CTSs từ MarkNature (M)
CTSs	$58,8 \pm 1,9^b$	$58,2 \pm 2,4^b$	$52,5 \pm 1,7^a$
CTSs + pH10.0	$85,9 \pm 0,5^b$	$87,5 \pm 0,5^c$	$65,8 \pm 0,7^a$

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

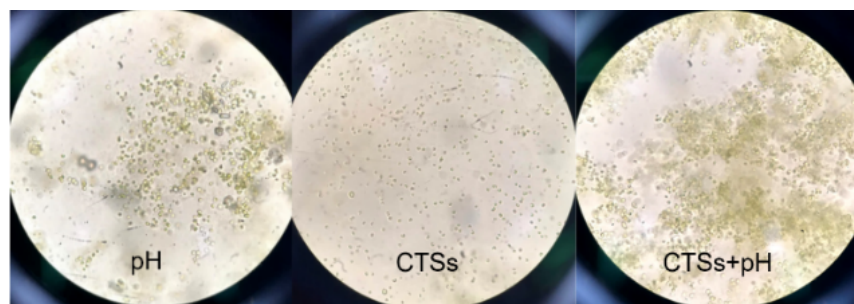


Hình 3.29. Hình ảnh sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. thu bằng các loại chitosan lactate khác nhau (a) và có kết hợp điều chỉnh pH 10,0 (b), tại thời điểm sau 15 phút lắng.



Hình 3.30. Ảnh hưởng của phương pháp thu hoạch vi tảo đến hiệu suất lắng (FE), hiệu suất thu hồi tương đối của chất màu (chlorophyll-a và carotenoids) (a) và sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. thu bằng các khác nhau (b) tại thời điểm sau 15 phút lắng.

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



Hình 3.31. Hình thái tế bào dưới kính hiển vi quang học sau 15 phút lắng.

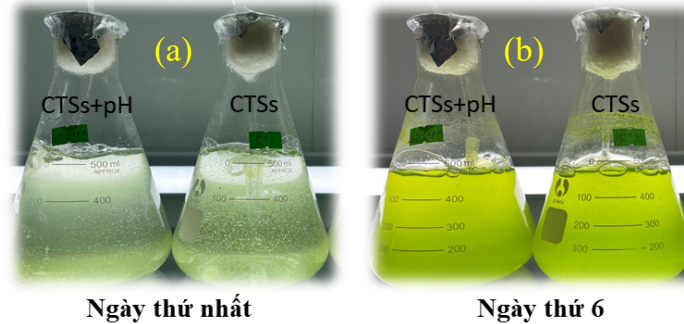
Hình 3.30a cho thấy hàm lượng chlorophyll-a và carotenoids trong tế bào vi tảo bị ảnh hưởng lớn bởi các phương pháp thu mặc dù không có sự thay đổi màu sắc tế bào (sắc

tổ lục lạp) đáng kể khi quan sát bằng mắt thường (Hình 3.30b) hoặc bằng kính hiển vi (Hình 3.31).

Bảng 3.19 và Hình 3.32 cho thấy sinh khối vi tảo *Nannochloropsis* sp. sau thu hoạch có khả năng sinh trưởng và phát triển sau 6 ngày nuôi.

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.

Như vậy, sản phẩm chitosan lactate của đề tài phù hợp để ứng dụng kết hợp điều chỉnh pH 10,0 để thu hoạch vi tảo biển *Nannochloropsis* sp. đạt hiệu quả cao (~ 90% sau 120 phút lắng), hiệu suất thu hồi được hàm lượng lớn chlorophyll-a (~94%) và carotenoids (~88 – 90%).

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 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.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN

- **Bài báo đăng trên tạp chí trong nước**

Phạm Thị Đan Phượng, Đỗ Quốc Dũng, Nguyễn Công Minh, Trang Sĩ Trung, Huỳnh Nguyễn Duy Bảo, Nguyễn Văn Hòa (2021), “Sản lượng vỏ tôm lột xác trong quá trình nuôi thâm canh và thử nghiệm sản xuất chitin”, *Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản*, 3, 51-57.

- **Bài báo đăng trên tạp chí quốc tế (ISI, Q2)**

Pham Thi Dan Phuong, Trang Si Trung, Willem F. Stevens, Nguyen Cong Minh, Huynh Nguyen Duy Bao, Nguyen Van Hoa (2022), “Valorization of heavy waste of modern intensive shrimp farming as a potential source for chitin and chitosan production”, *Waste and Biomass Valorization*, 13(2), 823-830.

- **Bài báo đang phản biện trên tạp chí quốc tế (ISI, Q1)**

Trang Sĩ Trung, **Pham Thi Dan Phuong**, Nguyen Cong Minh, Nguyen Thi Nhu Thuong, Witoon Prinyawiwatkul, Huynh Nguyen Duy Bao, Nguyen Van Hoa (2022), “Swollen-state preparation of chitosan lactate from moulded shrimp shells and its application for harvesting marine microalgae *Nannochloropsis* sp.”, *International Journal of Biological Macromolecules*, x(xx), xxx.