

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG ACID LACTIC ĐỂ KHỬ KHOÁNG TRONG QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT CHITIN TỪ PHẾ LIỆU TÔM

Đến tòa soạn 10-03-2021

Lê Thị Thanh Tâm, Dương Thị Bích Chi, Nguyễn Thị Kim Anh

Trung tâm ứng dụng kỹ thuật hạt nhân trong công nghiệp

SUMMARY

STUDY ON USING ACID LACTIC FOR DEMINERALIZATION OF SHRIMP WASTE IN CHITIN PRODUCTION

Chitin and its derivatives-Chitosan are abundant polysaccharides in nature after cellulose. Chitin is found in both animals and plants. The main source of chitin-chitosan production is crustacean shells such as shrimp, crab, etc. Demineralization is an important stage in the purification of chitin from crustacean shells. There are many demineralization methods in chitin production including chemical and biological methods. Chemical reagents can be inorganic acid (HCl) or organic acid (lactic acid, acetic acid, formic acid). The objective of this study was to investigate the factors affecting the demineralization process of shrimp waste with industrial lactic acid and lactic acid generated during molasses fermentation using Lactobacillus acidophilus. Demineralization with lactic acid had a longer demineralization time than HCl but less environmental pollution, saved costs, and chitin can be used in medicine and food.

Key words: chitin, acid lactic fermentation, demineralization, shrimp waste, Lactobacillus acidophilus.

1. MỞ ĐẦU

Việt Nam hiện đứng thứ 4 thế giới về xuất khẩu thủy sản (sau Na Uy, Trung Quốc và Nga), đứng số 1 Đông Nam Á và số 2 châu Á. Cùng với sự gia tăng khối lượng thịt tôm xuất khẩu thì cũng có một lượng lớn phế liệu đầu vỏ tôm được tạo thành. Trong đầu vỏ tôm thường chứa protein, astaxanthin, và đặc biệt là chitin - một polymer sinh học chiếm tỷ trọng lớn. Từ chitin, thực hiện quá trình deacetyl, người ta có thể sản xuất ra chitosan. Do vậy đầu vỏ tôm thường được tận dụng để sản xuất chitosan - một loại polymer có nhiều ứng dụng trong thực tế như: công nghiệp dệt nhuộm, giấy, sản xuất thực phẩm chức năng giúp tăng thải mỡ ngăn chặn béo phì, sản xuất glucosamine - chất hỗ trợ điều trị đau khớp, chất điều hòa sinh trưởng cho cây...[1]

Khử khoáng là công đoạn quan trọng trong quá trình tinh sạch chitin từ vỏ loài giáp xác. Có

nhiều phương pháp khử khoáng trong sản xuất chitin gồm phương pháp sử dụng hóa học và phương pháp sinh học. Tác nhân hóa học sử dụng có thể là acid vô cơ (HCl) hoặc acid hữu cơ (acid lactic, acid acetic, acid formic). Hiện nay, công nghệ sản xuất chitin và chitosan chủ yếu theo phương pháp hóa học dùng HCl, NaOH để khử khoáng và protein [2]. Quá trình khử khoáng bằng HCl gây ảnh hưởng đến đặc tính sinh hóa của chitin, ăn mòn thiết bị và gây ô nhiễm môi trường, chưa tận thu được các thành phần có giá trị như protein, chất màu từ phế liệu thủy sản. Trên thế giới đã có các nghiên cứu về khử khoáng bằng phương pháp sinh học lên men từ vi khuẩn tạo acid hữu cơ thu được chitin, các kết quả nghiên cứu cho thấy quá trình với quá trình khử khoáng của axit hữu cơ đạt khoảng 90% [3, 4, 5]. Trong nước, những năm qua có nhiều nghiên cứu sử dụng phương pháp sinh học là các vi khuẩn

của acid lactic trong giai đoạn khử khoáng vỏ đầu tôm [6, 7]. Các nghiên cứu trong nước cũng cho thấy chitin xử lý bằng phương pháp dùng acid hữu cơ có độ tinh sạch cao, phân tử lượng lớn và độ nhớt cao, có thể ứng dụng trong y dược, thực phẩm, đồng thời làm giảm ô nhiễm môi trường. Kết quả đã khử được trên 85% protein và khoáng trong đầu vỏ tôm. Bên cạnh đó, có nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm cải thiện quy trình, hạn chế nhược điểm, tăng hiệu suất thu hồi các thành phần có ích, trong đó sử dụng vi sinh vật hỗ trợ là một trong những giải pháp được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm. Mặc dù đã có một số nghiên cứu về việc sử dụng axit lactic để khử khoáng trong vỏ tôm, nhưng các nghiên cứu này chủ yếu đề cập đến việc chứng minh khả năng của phương pháp mà chưa quan tâm nhiều đến các công đoạn xử lý tiếp theo nhằm tạo ra chitin có chất lượng cũng như chưa quan tâm đến quy mô phát triển của quy trình theo hướng công nghiệp.

Acid lactic có thể được tạo thành bằng phương pháp tổng hợp hóa học hoặc lên men sinh học. Lên men sản xuất acid lactic là một phương pháp thân thiện với môi trường và acid tạo ra có độ tinh khiết cao. Nguyên liệu thường sử dụng của quá trình lên men là mật rỉ đường dùng chủng vi khuẩn *Lactobacillus* tạo acid lactic[8]. Từ đó nhóm nghiên cứu tiến hành khảo sát quy trình khử khoáng vỏ tôm tạo chitin bằng acid lactic được lên men từ mật rỉ đường, đồng thời so sánh với acid lactic công nghiệp, qua đó thiết lập được quy trình khử khoáng vỏ tôm nhằm hạn chế ô nhiễm môi trường trong sản xuất chitin-chitosan. Kết quả thu được từ nghiên cứu sẽ là cơ sở để thiết kế dây chuyền sản xuất trên quy mô pilot.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, nguyên liệu

Dịch lên men từ mật rỉ đường trong điều kiện lên men kỵ khí bằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* tạo thành acid lactic có nồng độ 16,7 g/L, hiệu suất lên men đạt 59%.

Nguyên liệu đầu vỏ tôm hay còn gọi phế liệu tôm (PLT) được phân tích các thành phần đặc trưng, kết quả thu được như bảng sau.

Bảng 1. Thành phần hóa học cơ bản của nguyên liệu đầu vỏ tôm tươi

STT	Chỉ tiêu phân tích	Hàm lượng
1	Độ ẩm (%)	76,1 ± 0,8
2	Hàm lượng khoáng tổng số (% theo trọng lượng chất khô)	27,4 ± 1,2
3	Canxi (%)	7,3 ± 0,31
4	Hàm lượng protein (% theo trọng lượng chất khô)	25,1 ± 0,4

- Cân kỹ thuật, Nồi hấp tiệt trùng, Tủ lạnh, Tủ mát, Máy ly tâm, Máy đo OD, Tủ sấy, Máy vortex, Lò vi sóng, Máy đo pH.

- Ống nghiệm, Đĩa petri, Pipette, Micropipette, Bình tam giác, Bình chứa 5L

2.2. Các phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xử lý mẫu

- Đầu vỏ tôm tươi sau khi thu mua được bảo quản riêng biệt trong thùng xốp vận chuyển về phòng thí nghiệm. Sau khi loại bỏ rác bẩn, đầu vỏ tôm được tách làm hai phần, một phần xay nhỏ kích thước khoảng 2mm, cân mỗi bịch 0.5kg và bảo quản tủ đông -200C, phần còn lại giữ nguyên bảo quản -200C.

- Các mẫu được rã đông trong thùng xốp và làm tươi trước khi thí nghiệm.

2.2.2. Phương pháp phân tích hóa học

- Xác định acid lactic tạo thành từ mật rỉ đường bằng phương pháp chuẩn độ với dung dịch NaOH 0,1N (phương pháp chuẩn độ Therner): Lấy 10 ml dịch nuôi lắc đã ly tâm cho vào ống nghiệm, bổ sung 20 ml nước cất và 1-2 giọt Phenolphthalein (nồng độ 1% trong cồn 90°). Chuẩn độ bằng NaOH 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 30 giây thì dừng lại. Ghi lại thể tích NaOH đã dùng để chuẩn độ.

- Độ acid được tính theo độ Therner:

$$^{\circ}T = V_{\text{NaOH}} \text{ tiêu tốn} \times 10$$

$$\% \text{ acid lactic} = ^{\circ}T \times 0,009$$

Trong đó: $^{\circ}T$ là độ Therner, 1 $^{\circ}T$ tương ứng với 9 mg acid lactic.

- Xác định độ ẩm theo phương pháp sấy ở 105°C của AOAC, 1990

- Xác định hàm lượng khoáng tổng số: theo phương pháp nung ở 5500C của AOAC, 1990

- Xác định hàm lượng protein còn lại: theo phương pháp Microbiuret của Hein và cộng sự, 2004.

Trộn đều 1g mẫu với 20ml dung dịch NaOH 3%, sau đó nâng nhiệt của hỗn hợp lên 80°C và giữ trong 6h, làm nguội hỗn hợp đến nhiệt độ phòng và lọc thu dịch lọc chứa protein. Ly tâm dịch lọc ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 15 phút, thu dịch trong. Khi sử dụng để định lượng protein thì pha loãng mẫu sao cho nồng độ protein nằm trong khoảng 0,05-0,5g/l. Lấy 4 ml trộn đều với 200µl thuốc thử Microbiuret và đo mật độ quang ở bước sóng 330nm.

Thuốc thử Microbiuret: Hòa tan 173g sodium citrate và 100g sodium carbonate trong nước ấm, tiếp đến hòa tan 17,3g sulphat đồng trong 100ml nước, trộn hai dung dịch lại với nhau và định mức đến 1000ml bằng nước cất.

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

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

Trong đó:

V: Tổng thể tích dịch lọc (ml).

C: nồng độ protein trong dịch lọc (mg/ml).

Nồng độ protein được xác định dựa vào kết quả đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 330nm và dựa vào đường chuẩn protein albumin để tính toán lượng protein.

m: Khối lượng mẫu ban đầu (g).

W: Độ ẩm của mẫu (%).

1000: hệ số chuyển đổi từ đơn vị mg sang g.

- Hiệu suất khử protein hoặc hiệu suất khử khoáng:

Hiệu suất khử protein (HSKP) hoặc hiệu suất khử khoáng (HSKK) là tỷ lệ phần trăm của lượng protein/khoáng chất tách ra khỏi vỏ đầu tôm so với lượng protein/khoáng có trong vỏ đầu tôm trước khi xử lý và được xác định theo công thức:

$$\text{HSKP (\%)} = (P_o - P_s) / P_o \times 100$$

Trong đó:

P_o: Hàm lượng protein ban đầu có trong vỏ đầu tôm (g).

P_s: Hàm lượng protein còn lại ở vỏ đầu tôm sau xử lý tách protein(g).

$$\text{HSKK (\%)} = (K_o - K_s) / K_o \times 100$$

Trong đó:

K_o: Hàm lượng khoáng ban đầu có trong vỏ đầu tôm (g).

K_s: Hàm lượng khoáng còn lại ở vỏ đầu tôm sau xử lý (g).

2.2.3. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Đầu vỏ tôm sau khi rửa sơ để loại rác và thịt thừa được xay nhỏ và tiến hành khử khoáng bằng acid lactic CN và acid lactic có trong dịch lên men ở các tỷ lệ nguyên liệu, thời gian, nhiệt độ khác nhau. Lọc, rửa thu phần rắn, phơi khô và kiểm tra hàm lượng khoáng còn lại, hàm lượng protein còn lại.

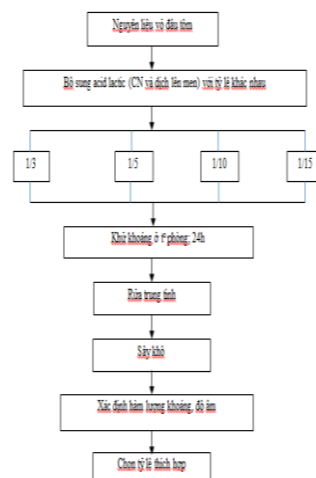
3. KẾT QUẢ, THẢO LUẬN

3.1. Các khảo sát của quá trình khử khoáng

Dịch lên men lactic có nồng độ acid khoáng 20g/L nên các thí nghiệm sau sẽ tiến hành trên acid lactic CN 2% để so sánh kết quả.

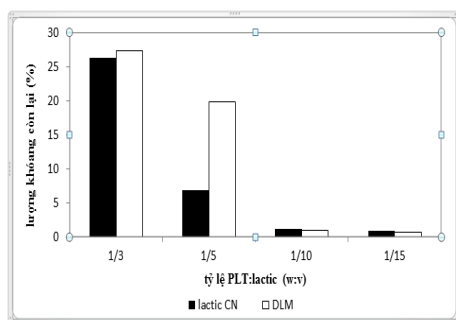
3.1.1. Xác định tỷ lệ nguyên liệu PLT (phế liệu tôm) : acid lactic

Tiến hành thí nghiệm khử khoáng PLT đã xử lý bằng acid lactic công nghiệp (CN) và lactic có trong dịch lên men mật rỉ đường bằng Lactobacillus acidophilus theo sơ đồ sau:



Hình 1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/acid đến quá trình khử khoáng Phế liệu tôm

Phế liệu tôm sau khi khử khoáng được sấy khô và xác định hàm lượng khoáng còn lại thu được kết quả như trong hình sau:

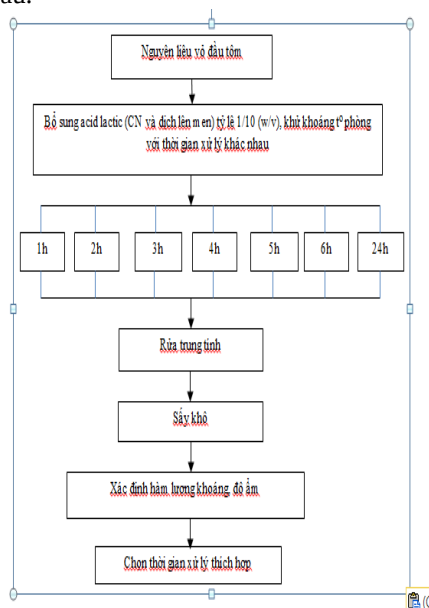


Hình 2. Ảnh hưởng tỷ lệ nguyên liệu/acid lactic đến hàm lượng khoáng còn lại

Ở tỷ lệ PLT:lactic 1/3 thì hàm lượng khoáng còn lại trên 25%, với tỷ lệ 1/5 có sự giảm đáng kể của acid lactic CN còn mật rỉ đường vẫn còn khoảng 20% chứng tỏ quá trình khử khoáng của dịch lên men chậm hơn so với lactic CN. Ứng với tỷ lệ 1/10 lượng khoáng còn lại khoảng 1% cho cả lactic CN và dịch lên men. Lúc này hàm lượng khoáng còn lại khi sử dụng dịch lên men đã có sự giảm mạnh chứng tỏ phải đủ hàm lượng acid lactic của dịch lên men thì quá trình khử khoáng mới xảy ra hoàn toàn. Kết quả thí nghiệm cho thấy lượng acid sử dụng càng nhiều thì hàm lượng khoáng còn lại càng thấp, HSKK đạt >95%. Hàm lượng khoáng còn lại giảm không đáng kể ở tỷ lệ 1/15 vì vậy chọn tỷ lệ 1/10 cho các nghiên cứu tiếp theo.

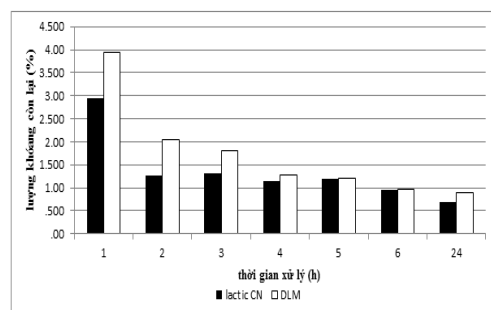
3.1.2. Xác định thời gian khử khoáng

Tiến hành thí nghiệm khử khoáng PLT như sơ đồ sau:



Hình 3. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của thời gian xử lý đến quá trình khử khoáng PLT

PLT sau khi khử khoáng được sấy khô và xác định hàm lượng khoáng còn lại thu được kết quả như trong hình sau:



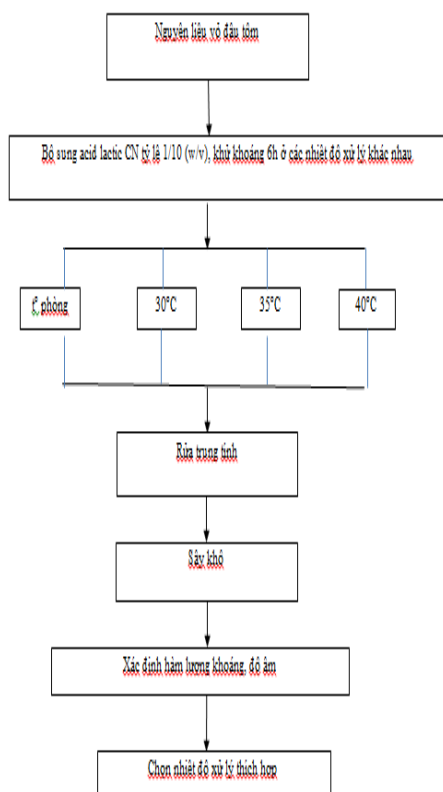
Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian xử lý đến hàm lượng khoáng còn lại

Kết quả cho thấy thời gian xử lý có quan hệ nghịch với lượng khoáng còn lại. Sau 2h xử lý thì hàm lượng khoáng giảm chậm, hàm lượng khoáng còn lại của dịch lên men lớn hơn so với lactic CN từ 1 đến 3 giờ, sau 4 giờ thì hàm lượng khoáng còn lại có sự tương đương đối với 2 loại acid, đến 6h thì hàm lượng khoáng còn khoảng 1%, HSKK đạt 96%. Cùng thời gian khử khoáng cho thấy hàm lượng khoáng còn lại khi sử dụng dịch lên men cao hơn so với sử dụng lactic CN, chứng tỏ dịch lên men cần mất thời gian tiếp xúc với phế liệu tôm hơn lactic CN.

Trong giới hạn nghiên cứu, càng tăng thời gian khử khoáng thì hàm lượng khoáng còn lại ở đầu vỏ tôm càng giảm. Nhưng càng về cuối, mức độ giảm của hàm lượng khoáng còn lại càng chậm. Sau 24h thì lượng khoáng còn lại giảm không đáng kể so với thời gian xử lý 6h, do đó để tiết kiệm thời gian mà vẫn đảm bảo hàm lượng khoáng dưới 1 % ta chọn thời gian để tách khoáng trong phế liệu tôm là 6h cho acid lactic CN và dịch lên men. So với nghiên cứu của Trần Thị Luyến, 2004 [2] quy trình sử dụng acid HCl 10% với thời gian khử khoáng là 5h thì việc sử dụng acid lactic giảm thiểu được vấn đề ô nhiễm môi trường.

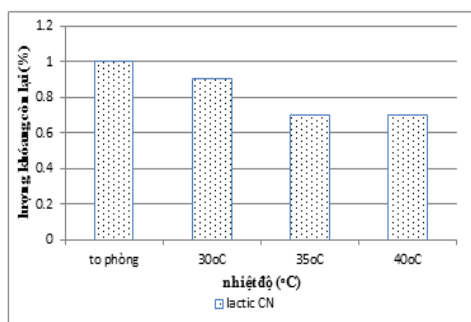
3.1.3. Xác định nhiệt độ khử khoáng

Bố trí thí nghiệm khử khoáng PLT như sơ đồ sau:



Hình 5. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nhiệt độ xử lý đến quá trình khử khoáng PLT

PLT sau khi khử khoáng được sấy khô và xác định hàm lượng khoáng còn lại thu được kết quả như trong hình sau:

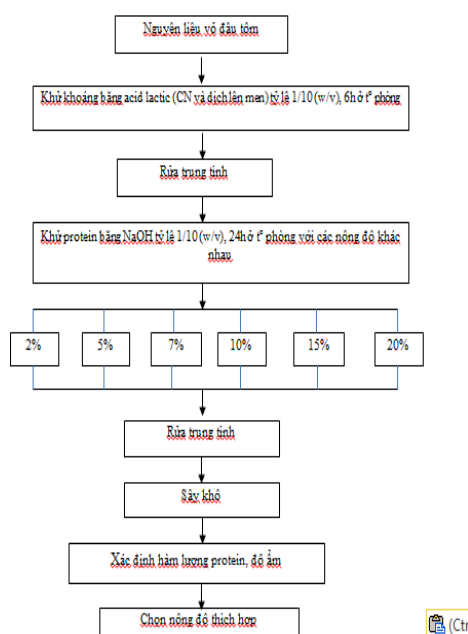


Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ xử lý đến hàm lượng khoáng còn lại

Thí nghiệm trên thực hiện với acid lactic CN, sau khi tối ưu các thông số về tỷ lệ acid, thời gian khử khoáng, khảo sát yếu tố nhiệt độ thì kết quả phân tích cho thấy nhiệt độ của quá trình khử khoáng tỷ lệ nghịch với lượng khoáng còn lại. Càng tăng nhiệt độ khử khoáng thì hàm lượng khoáng còn lại giảm. Ta thấy ở

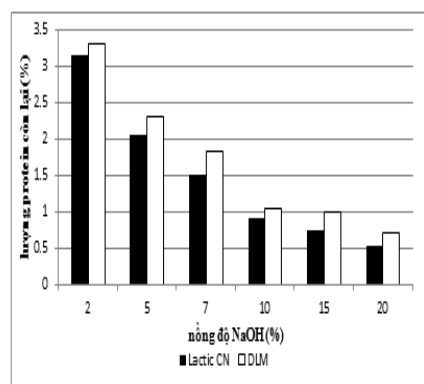
nhệt độ phòng (khoảng $25 \pm 2^\circ\text{C}$) lượng khoáng còn lại là 1%, giữa các nhiệt độ khảo sát lượng khoáng còn lại chênh lệch không nhiều. Do đó để đơn giản hóa cho quy trình phân tích chỉ cần lựa chọn khử khoáng ở nhiệt độ phòng nhằm tiết kiệm chi phí năng lượng duy trì nhiệt độ.

3.2. Xác định nồng độ NaOH để khử protein
PLT được khử khoáng bằng acid lactic tỷ lệ 1/10, thời gian 6h ở nhiệt độ phòng rồi được khử protein bằng dung dịch NaOH tỷ lệ 1/10, 24h với các nồng độ dung dịch xút khác nhau để xác định nồng độ NaOH thích hợp khử protein như sơ đồ sau:



Hình 7. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến quá trình khử protein PLT

Kết quả xác định hàm lượng protein trong mẫu PLT thể hiện như trong hình sau:



Hình 8. Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến hàm lượng protein còn lại

Kết quả thí nghiệm cho thấy khả năng khử protein khi sử dụng NaOH tăng tỷ lệ thuận với nồng độ dung dịch NaOH. Quá trình khử khoáng khi sử dụng dịch lên men xảy ra chậm hơn so với lactic CN do đó quá trình khử protein tiếp theo cũng xảy ra chậm hơn. Nồng độ NaOH sử dụng càng cao thì lượng protein bị khử càng nhiều. Để hàm lượng protein còn lại $\leq 1\%$, ta chọn nồng độ NaOH là 10% để khử protein, hiệu suất khử protein đạt 96% là phù hợp với nghiên cứu của Trần Thị Luyến (2004)

3.3. Đánh giá khả năng sử dụng acid lactic để khử khoáng đầu vỏ tôm trong quá trình chiết chitin

Bảng 2: So sánh chất lượng chitin sản xuất theo quy trình đã nghiên cứu và quy trình truyền thống

STT	Chỉ tiêu chất lượng	QT1	QT2	QT3
1	Màu sắc	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
2	Độ ẩm (%)	4,7	5,7	6,2
3	Hàm lượng tro (%)	0,2	0,5	1,0
4	Hàm lượng protein (%)	1,9	1,3	2,0
5	Chitin (%)	21,6	19,7	19,6

QT 1: Chitin sản xuất theo quy trình truyền thống sử dụng HCl

QT 2: Chitin sản xuất theo quy trình sử dụng acid lactic công nghiệp

QT 3: Chitin sản xuất theo quy trình sử dụng acid lactic lên men từ mật rỉ đường sử dụng vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus*

Kết quả phân tích cho thấy chitin tách chiết bằng quy trình sử dụng acid lactic từ dịch lên men vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* có hàm lượng khoáng là 1%, cao hơn so với quy trình chiết bằng HCl và acid lactic công nghiệp là 0,2 và 0,5%. Tuy nhiên do quy trình chỉ sử dụng dịch lên men acid lactic để khử khoáng chứ không dùng HCl loãng 3-4% để khử tiếp lượng khoáng còn lại như các nghiên cứu của Trần Thị Luyến, 2004, Trang Sĩ Trung, 2007 và Vũ Ngọc Bội, 2016. Thêm vào đó, lượng khoáng còn lại là khá thấp có thể chấp nhận vì chitin thô mua trên thị trường của VNF có hàm lượng khoáng là 2,3%. Điều này cho thấy khả năng sử dụng acid lactic (CN và dịch lên men) để khử khoáng đầu vỏ tôm trong quá trình sản xuất chitin là hoàn toàn phù hợp.

4. KẾT LUẬN

- Quy trình xử lý phế liệu tôm thành chitin bằng acid lactic lên men từ vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* như sau:

✓ Phế liệu tôm đã xử lý được bổ sung dịch lên men acid lactic theo tỷ lệ 1:10 (w/v), khử khoáng ở nhiệt độ phòng trong 6h.

✓ Phế liệu tôm sau khử khoáng được rửa bằng nước đến trung tính rồi khử protein bằng dung dịch NaOH 10% với tỷ lệ dung dịch NaOH/PLT: 10/1 ở nhiệt độ phòng trong 24h, hiệu suất khử protein đạt 96%.

- Chitin thu được từ quy trình khử khoáng sử dụng acid lactic có chất lượng tương tự quy trình chiết truyền thống sử dụng acid HCl: màu trắng hồng, độ ẩm $<10\%$, hàm lượng tro 1%, hàm lượng protein 2%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ngô Thị Phương Thảo, 2014. Nghiên cứu sử dụng phương pháp sinh học để khử protein và khoáng chất trong quy trình sản xuất chitin và chitosan từ phế liệu đầu vỏ tôm. Luận văn thạc sỹ kỹ thuật. Trường Đại học Nha Trang. Thành phố Nha Trang
- Trần Thị Luyến (2004), Sản xuất chitin-chitosan từ phế liệu thủy sản, Báo cáo tổng kết dự án sản xuất thử nghiệm cấp Bộ, Trường Đại học Thủy sản, Nha Trang
- Sunita Das and E. Anand Ganesh, 2010. Extraction of Chitin from Trash Crabs (*Podophthalmus vigil*) by an Eccentric Method. Current Research Journal of Biological Sciences.
- Kandra Premeela, Ch. Murali Mohan, P.V. Smitha, K.P.J. Hemalatha, 2010. Bioremediation of shrimp biowaste by using natural probiotic for chitin and carotenoid production an alternative method to hazardous chemical method. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. Volume: I: Issue-3: ISSN 0976-4550
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A., 2004. Isolation of adh mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for production of L(+) Lactic acid. Electronic Journal of Biotechnology. 15(7)-1
- Trang Sĩ Trung, 2008. Nghiên cứu kết hợp phương pháp sinh học để nâng cao hiệu quả quy trình sản xuất chitin -chitosan từ phế liệu vỏ đầu tôm. Báo cáo đề tài khoa học cấp Bộ, Trường Đại học Nha Trang
- TS. Vũ Ngọc Bội và cộng sự, 2014 "Nghiên cứu sử dụng vi khuẩn lactic để khử khoáng và protein trên đầu và vỏ tôm trong sản xuất chitosan"; Đề tài KC 07.02/11-15
- Hoàng Thị Bảo Yến, 2014. Nghiên cứu chọn loại vi khuẩn *Lactobacillus* thích hợp cho mục đích khử protein và khoáng trên đầu và vỏ tôm. Khóa luận tốt nghiệp, đại học Nha Trang