

ỨNG DỤNG DUNG MÔI EUTECTIC SÂU CHỨA ASTAXANTHIN TRÍCH LY TỪ VỎ TÔM ĐỂ NÂNG CAO ĐẶC TÍNH MÀNG CHITOSAN

Trần Chí Hải¹, Bùi Thực Trinh¹, Đỗ Hào Nam¹, Phan Văn Mẫn², Lê Thị Hồng Anh^{1*}

¹Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

²Khoa Du lịch, Trường Cao đẳng Kỹ thuật Công nghệ Bà Rịa-Vũng Tàu

*Email: anhth@huit.edu.vn

Ngày nhận bài: 08/3/2025; Ngày chấp nhận đăng: 09/4/2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu đánh giá tác động của dung môi eutectic sâu (DES) chứa astaxanthin khi bổ sung vào màng chitosan, nhằm cải thiện tính chất vật liệu cho ứng dụng bảo quản thực phẩm. Kết quả cho thấy màng chitosan chứa DES và astaxanthin có độ bền kéo giảm từ 5,53 MPa xuống 4,13 MPa nhưng độ giãn dài khi đứt tăng từ 45,65% lên 54,45%, giúp màng linh hoạt hơn. Độ thấm hơi nước (WVP) tăng gấp đôi so với màng chitosan-glycerol, phù hợp cho bảo quản rau củ và trái cây tươi nhờ kiểm soát trao đổi khí, hạn chế đọng hơi nước và giảm nguy cơ hư hỏng. Phân tích FTIR xác nhận sự hình thành liên kết hydro bền vững giữa chitosan, DES và astaxanthin, góp phần ổn định cấu trúc màng; hình ảnh SEM cho thấy bề mặt đồng nhất hơn, trong khi AFM phản ánh sự thay đổi vi cấu trúc giúp tăng độ ổn định. Ngoài ra, màng chitosan – DES thể hiện khả năng kháng oxy hóa cao gấp 15 lần theo ABTS và 5 lần theo DPPH đối với màng chitosan hay màng chitosan – glycerol. Bên cạnh đó, màng chitosan – DES cũng có khả năng kháng khuẩn mạnh, ức chế *Staphylococcus aureus* và *Salmonella typhimurium*, có thể nhờ khả năng khuếch tán cao hơn của astaxanthin trong mạng lưới polymer. Những đặc tính này cho thấy tiềm năng lớn của DES – astaxanthin trong màng chitosan cho bao bì thông minh, giúp kéo dài thời gian bảo quản thực phẩm và kiểm soát vi sinh.

Từ khóa: Dung môi eutectic sâu, astaxanthin, màng chitosan, tính chất cơ lý, hoạt tính kháng khuẩn.

1. MỞ ĐẦU

Chitosan, một polysaccharide thu được từ quá trình khử acetyl của chitin có trong vỏ giáp xác, có cấu trúc polymer mạch dài với nhiều nhóm $-NH_2$ và $-OH$ [1, 2]. Do đó chitosan có thể tạo ra màng sinh học với độ bền cơ học cao, đặc tính bán thấm giúp kiểm soát quá trình trao đổi khí và hơi nước, đồng thời thể hiện khả năng kháng khuẩn tự nhiên [3, 4]. Chính những đặc tính này đã khiến chitosan trở thành một vật liệu tiềm năng trong lĩnh vực bảo quản thực phẩm, nhờ khả năng phân hủy sinh học và an toàn với môi trường. Tuy nhiên, màng chitosan nguyên chất có những hạn chế như giòn, dễ gãy và có độ thấm hơi nước cao, làm giảm tính ứng dụng thực tế [4, 5]. Để cải thiện tính chất cơ học và nâng cao độ linh hoạt, nhiều nghiên cứu đã đề xuất bổ sung các chất hóa dẻo (plasticizer) nhằm làm giảm liên kết nội phân tử quá chặt chẽ của chitosan, giúp màng trở nên dẻo dai hơn [4-6]. Trong số đó, glycerol là một trong những chất hóa dẻo phổ biến nhờ khả năng giữ ẩm tốt và cải thiện độ bền của màng.

Glycerol có khả năng tạo liên kết hydro với chuỗi polymer chitosan, giúp giảm lực tương tác nội phân tử, từ đó làm tăng độ linh hoạt của màng [3 - 6]. Các nghiên cứu cho thấy việc bổ sung glycerol giúp tăng đáng kể độ giãn dài khi đứt (EAB) của màng chitosan và cải thiện tính chất cơ học so với màng chitosan nguyên chất. Tuy nhiên, khi nồng độ glycerol tăng quá mức, độ bền kéo (TS) của màng giảm do cấu trúc polymer bị phá vỡ [5, 6]. Ngoài ra, màng chứa glycerol có độ thấm hơi nước cao hơn, khiến nó dễ hút ẩm và làm giảm hiệu quả bảo quản thực phẩm trong môi trường ẩm [6, 7].

Trước những thách thức này, dung môi eutectic sâu (DES) được quan tâm như một phương pháp tiềm năng giúp cải thiện cấu trúc màng sinh học [8, 9]. DES là một hệ dung môi xanh, thân thiện với môi trường, có khả năng hòa tan hiệu quả nhiều hợp chất kỵ nước, trong đó có astaxanthin. Astaxanthin là một carotenoid có hoạt tính chống oxy hóa mạnh, được tìm thấy nhiều trong vỏ tôm và các loài giáp

xác khác [10, 11]. Nghiên cứu chỉ ra rằng DES đã được chứng minh có khả năng trích ly astaxanthin hiệu quả hơn so với các dung môi hữu cơ truyền thống [12-14]. Tuy nhiên, ứng dụng của DES chứa astaxanthin trong việc cải thiện màng chitosan vẫn chưa được nghiên cứu rộng rãi.

Nghiên cứu này nhằm khai thác tiềm năng của DES trong việc trích ly astaxanthin từ vỏ tôm và kết hợp vào màng chitosan, từ đó nâng cao các tính chất cơ lý, khả năng chống thấm nước, tính kháng khuẩn và chống oxy hóa so với màng chitosan thông thường và màng chitosan chứa glycerol. Việc ứng dụng DES mang astaxanthin không chỉ mở ra hướng đi mới trong phát triển màng sinh học bảo quản thực phẩm mà còn tận dụng hiệu quả phụ phẩm từ ngành thủy sản, góp phần xây dựng một nền công nghiệp thực phẩm bền vững.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu thí nghiệm

Các hóa chất sử dụng trong thí nghiệm bao gồm glycerol ($\geq 99\%$), choline chloride ($\geq 98\%$), ABTS ($\geq 98\%$), DPPH ($\geq 97\%$), chitosan (trắng ngà, độ deacetyl hóa $\geq 85\%$) đều được cung cấp bởi Sigma-Aldrich (USA); acid citric ($\geq 99,5\%$) và acid acetic ($\geq 99,7\%$) được cung cấp bởi Merck (Germany). Vi sinh vật bao gồm *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) và *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) được cung cấp bởi Viện kiểm nghiệm và nghiên cứu vi sinh vật ATCC (American Type Culture Collection, USA).

2.2. Chuẩn bị màng

Màng chitosan được chuẩn bị theo phương pháp của Zhou và cộng sự với một số điều chỉnh cho phù hợp [15]. Cụ thể, dung dịch chitosan 2% (w/v) được tạo bằng cách hòa tan 2 g chitosan trong 100 mL acid acetic 1% và khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ để chitosan hòa tan hoàn toàn. Sau đó, 40 mL dung dịch chitosan được đổ vào đĩa Petri (đường kính 9 cm) và sấy khô trong tủ hút ở nhiệt độ phòng trong một tuần.

Đối với màng chitosan chứa glycerol, tỷ lệ glycerol bổ sung có vai trò quan trọng trong tạo màng chitosan giúp giảm độ cứng và tăng độ linh động của màng. Do đó, nghiên cứu này sử dụng tỷ lệ glycerol/chitosan là 1:5 (w/v) để tạo màng [15]. Dung dịch được đổ khuôn trên đĩa Petri và để khô tự nhiên, tạo ra màng mỏng, đồng đều để phân tích.

Với màng chitosan chứa DES, DES được tổng hợp bằng cách phối trộn choline chloride (chất nhận liên kết hydro - HBA) và acid lactic (chất cho liên kết hydro - HBD) theo tỷ lệ mol 1:2, theo nghiên cứu trước đó của nhóm về chiết xuất astaxanthin từ bột vỏ tôm [12]. Hỗn hợp được gia nhiệt đến $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ và khuấy liên tục với 15% nước bổ sung để thu được dung dịch đồng nhất, trong suốt. DES sau đó được sử dụng để chiết xuất astaxanthin từ bột vỏ tôm theo phương pháp của Tran và cộng sự [12], thu được dịch chiết DES giàu astaxanthin. Phần dịch này được trộn vào dung dịch chitosan với tỷ lệ DES/chitosan là 1:5, khuấy đều đảm bảo phân tán đồng đều. Quá trình tạo màng tương tự như các mẫu đối chứng, màng chitosan chứa DES được đánh giá về cấu trúc, tính chất vật lý và hoạt tính chống oxy hóa.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Đặc tính cơ học

Tính bền cơ học của màng được đánh giá thông qua các chỉ tiêu độ bền kéo (TS), độ giãn dài khi đứt (EAB), sử dụng máy phân tích kết cấu TA-XT2i (Stable Micro Systems, UK) với cảm biến tải trọng 5 kg. Các mẫu màng (kích thước 20 mm \times 50 mm) được kẹp với khoảng cách ban đầu 30 mm và kéo giãn với tốc độ không đổi 1 mm/s. Trong đó, TS được xác định bằng cách chia tải trọng tối đa (F_{max}) cho diện tích mặt cắt ngang (A) của màng, đơn vị MPa, phản ánh độ bền của màng trước khi đứt. EAB được tính theo tỷ lệ phần trăm giữa độ dài tăng thêm (ΔL) tại thời điểm đứt và chiều dài ban đầu (L), phản ánh độ dẻo và khả năng kéo giãn của màng.

2.3.2. Đánh giá tính chất vật lý và khả năng cản nước của màng

2.3.2.1. Độ thấm hơi nước (WVP)

WVP được xác định theo phương pháp của Zhou và cộng sự [15]. Mẫu màng được đặt lên miệng ống ly tâm 50 mL chứa 25 mL nước cất, đảm bảo bề mặt kín hoàn toàn. Các ống được đặt trong bình

hút ẩm có độ ẩm tương đối 0% và cân định kỳ mỗi 2 giờ trong 48 giờ để theo dõi sự thay đổi khối lượng do sự bốc hơi nước. WVP được tính theo công thức:

$$WVP (g/m.s.Pa) = (\Delta m \times h) / (T \times S \Delta p) \quad (1)$$

Trong đó, Δm là sự thay đổi khối lượng (g), h là độ dày màng (mm), T là thời gian thử nghiệm (s), S là diện tích truyền hơi nước hiệu dụng (m^2) và Δp là chênh lệch áp suất hơi nước (Pa) ở 30 °C.

2.3.2.2. Độ hòa tan trong nước

Màng được ngâm trong 50 mL nước cất ở 22 ± 1 °C trong 24 giờ. Sau đó, phần dung dịch hòa tan được loại bỏ, phần màng còn lại được sấy ở 105 °C đến khi khối lượng không đổi [15, 16]. Độ hòa tan (%) được tính bằng tỷ lệ giữa khối lượng hòa tan và khối lượng ban đầu của màng.

2.3.3. Phân tích phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR)

Phân tích FTIR được thực hiện bằng máy Shimadzu FTIR-8400S với dải quang phổ 4000 – 500 cm^{-1} , trung bình 64 lần quét/mẫu với độ phân giải 4 cm^{-1} .

2.3.4. Phân tích hình thái bề mặt màng

Hình thái bề mặt màng được phân tích bằng kính hiển vi điện tử quét XL 30 ESEM FEG (Thermo Fisher Scientific, USA), với điện áp gia tốc 20 kV và độ phóng đại 2.000 \times .

2.3.5. Phân tích độ nhám bề mặt

Đánh giá độ nhám bề mặt bằng kính hiển vi lực nguyên tử NanoScope MultiMode (Veeco Metrology, Inc.) ở chế độ tapping.

2.3.6. Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp ABTS và DPPH theo Lawal và cộng sự [16]. Dung dịch màng (50 μL) được hòa tan trong 1,5 mL nước ở 40 °C, sau đó trộn với dung dịch ABTS^{*+} hoặc DPPH và đo độ hấp thụ quang ở 734 nm (ABTS) hoặc 517 nm (DPPH). Trolox được sử dụng như chất chuẩn trong nghiên cứu này. Khả năng kháng oxy hóa được xác định qua đường chuẩn nồng độ Trolox và hoạt tính quét gốc tự do. Khả năng kháng oxy hóa được biểu diễn bằng μmol Trolox equivalent/mL (μmol TE/mL).

2.3.7. Thử nghiệm kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá theo phương pháp khuếch tán đĩa thạch, sử dụng *Staphylococcus aureus* (Gram dương) và *Salmonella typhimurium* (Gram âm) [15, 16]. Sau khi chiếu UV dung dịch màng trong 30 phút để khử khuẩn, 150 μL dịch màng được nhỏ vào giếng thạch trên môi trường Mueller-Hinton agar, ủ ở 37 °C trong 24 giờ. Hiệu quả kháng khuẩn được đánh giá dựa trên đường kính vùng ức chế khuẩn, đo bằng máy đếm khuẩn tự động Scan 1200-HD (Interscience, France).

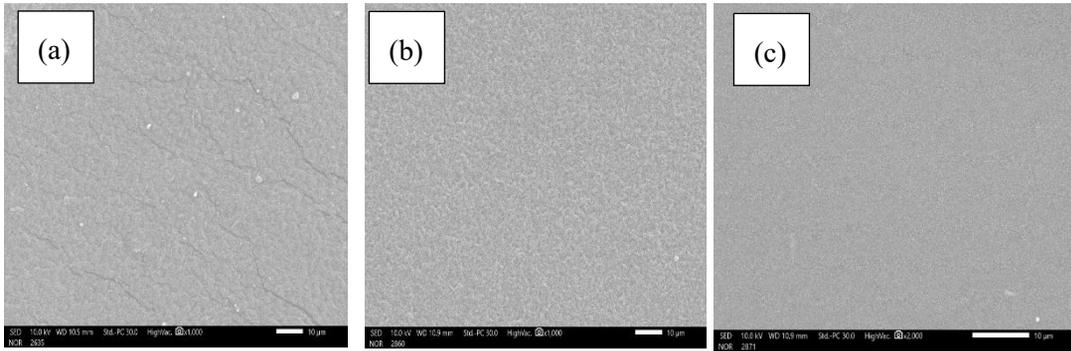
2.3.8. Phương pháp xử lý số liệu

Dữ liệu được phân tích bằng ANOVA một chiều với kiểm định hậu nghiệm Tukey, sử dụng phần mềm SPSS phiên bản 25 (IBM, Hoa Kỳ), với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

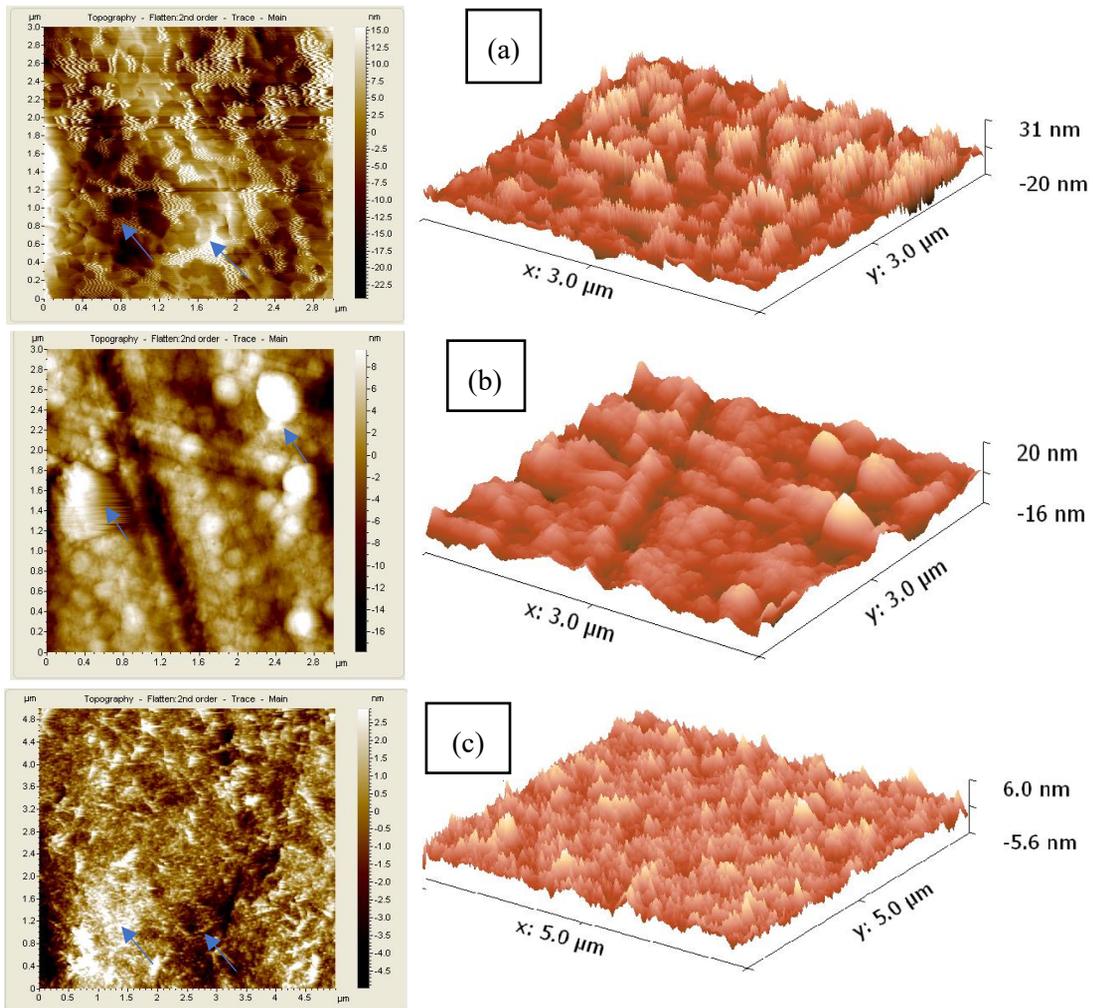
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cấu trúc màng chitosan

Việc sử dụng DES chứa astaxanthin kết hợp với chitosan đã dẫn đến những thay đổi đáng kể về cấu trúc màng chitosan - DES so với màng chitosan và màng chitosan - glycerol, được xác định thông qua các phân tích SEM, AFM và FTIR (Hình 1, Hình 2 và Hình 3).



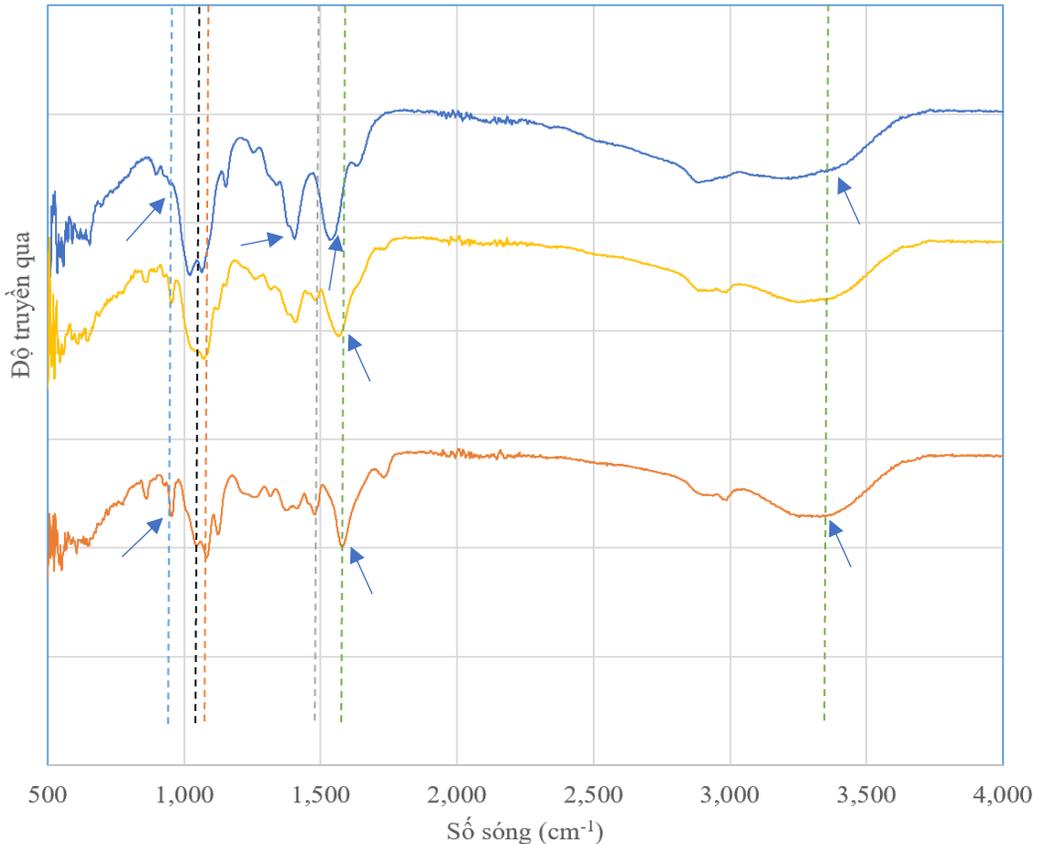
Hình 1. Bề mặt của màng chitosan (a), màng chitosan có bổ sung glycerol (b) và màng chitosan kết hợp astaxanthin dựa trên DES (c) được quan sát bằng kính hiển vi điện từ quét (SEM) với độ phóng đại 2.000×.



Hình 2. Bề mặt của màng chitosan (a), màng chitosan có bổ sung glycerol (b) và màng chitosan kết hợp astaxanthin dựa trên DES (c) quan sát bằng kính vi lực nguyên tử (AFM).

Kết quả chụp SEM cho thấy màng chitosan có bề mặt thô ráp, không đồng đều với các vết nứt vi mô, phản ánh đặc tính giòn dễ vỡ (Hình 1a). Việc bổ sung glycerol giúp cải thiện cấu trúc màng, làm cho bề mặt trở nên mịn và đặc hơn, phù hợp với vai trò của glycerol như một chất hóa dẻo (Hình 1b). Khi kết hợp với DES, bề mặt màng chitosan trở nên đồng nhất và mịn hơn (Hình 1c), cho thấy sự cải thiện về cấu trúc của màng. Điều này có thể được lý giải bởi hai cơ chế chính: (i) DES đóng vai trò như

một chất hóa dẻo, làm giảm sự tương tác mạnh giữa các chuỗi polymer, và (ii) DES tham gia vào mạng lưới liên kết hydro, tăng cường sự tương tác giữa chitosan và các thành phần eutectic [7, 14, 15]. Các liên kết hydro hình thành chủ yếu giữa nhóm hydroxyl và amin của chitosan với các nhóm chức có cực trong DES, góp phần cải thiện cấu trúc và độ bền cơ học của màng. Kết quả phân tích hiển vi lực nguyên tử (AFM) (Hình 2) cũng cố thêm những quan sát từ SEM, cho thấy sự khác biệt rõ rệt về đặc điểm bề mặt giữa màng chitosan nguyên chất, màng chitosan chứa glycerol và màng chitosan kết hợp DES có bổ sung astaxanthin. Những thay đổi này cho thấy vai trò của DES không chỉ như một chất hóa dẻo mà còn là yếu tố thúc đẩy tương tác phân tử, giúp tối ưu hóa cấu trúc màng chitosan.



Hình 3. Phổ FTIR của màng chitosan (—————), màng chitosan có bổ sung glycerol (—————) và màng chitosan bổ sung DES và astaxanthin (—————)

Phân tích AFM cho thấy màng chitosan nguyên chất có độ nhám bề mặt cao nhất, với biên độ dao động từ -20 nm đến 31 nm, chủ yếu do sự kết tụ của các chuỗi polymer, tạo ra các đỉnh và rãnh sâu, làm cho bề mặt trở nên không đồng nhất, điều này phù hợp với nghiên cứu được công bố trước đây về màng chitosan [7, 15]. Các nghiên cứu trước đây trong đó bề mặt chitosan nguyên chất có độ nhám lớn do sự kết tụ của các chuỗi polymer và sự hình thành mạng lưới hydrogel tự nhiên. Theo dữ liệu AFM trên hình, giá trị độ nhám cao nhất được ghi nhận, với sự chênh lệch độ cao dao động từ -20 nm đến 31 nm. Khi bổ sung glycerol, độ nhám bề mặt giảm đáng kể (khoảng -16 nm đến 20 nm), cho thấy vai trò của glycerol trong việc làm giảm sự kết tụ của polymer, giúp bề mặt trở nên phẳng hơn và đồng nhất hơn. Hiện tượng này đã được báo cáo trong nghiên cứu của Jakubowska và cộng sự [14], trong đó glycerol được chứng minh là một chất hóa dẻo hiệu quả, giúp giảm độ nhám của màng chitosan bằng cách tương tác với các nhóm hydroxyl, làm giảm lực liên kết nội bộ của polymer.

Màng chitosan kết hợp DES chứa astaxanthin có độ nhám thấp nhất (-5,6 nm đến 6,0 nm), phản ánh sự phân bố đồng đều của các thành phần trong màng. Điều này có thể là do DES đóng vai trò như một môi trường phân tán hiệu quả, giúp astaxanthin hòa tan tốt hơn trong cấu trúc chitosan. So với nghiên cứu của Jakubowska và cộng sự [14], kết quả này phù hợp khi nhóm tác giả cũng nhận thấy rằng việc kết hợp các hợp chất kỵ nước với DES giúp tăng cường tính đồng nhất của màng polymer, đồng

thời cải thiện các đặc tính vật lý của màng sinh học. Xu hướng này phù hợp với nghiên cứu của Suyatma và cộng sự, trong đó hỗn hợp acid lactic được chứng minh có khả năng cải thiện độ đồng nhất của màng chitosan [17]. Tương tự, Jakubowska và cộng sự cũng báo cáo rằng sự gia tăng tính đồng nhất và ổn định của màng chitosan có chứa DES bắt nguồn từ sự hình thành liên kết hydro mạnh giữa nhóm amino proton hóa của chitosan và nhóm carboxylate của các thành phần trong DES [14]. Kết quả này phù hợp với kết quả phân tích phổ FTIR được thể hiện ở Hình 3.

Kết quả phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) ở Hình 3 cho thấy cường độ phổ tăng lên đáng kể khi bổ sung glycerol hoặc DES vào chitosan, phản ánh sự hình thành các liên kết mới giữa các thành phần. Cụ thể, sự gia tăng cường độ đỉnh phổ tại vùng $1650 - 1660 \text{ cm}^{-1}$ (amide I) và 1550 cm^{-1} (amide II) cho thấy tương tác giữa nhóm amide của chitosan với DES và glycerol, phù hợp với các nghiên cứu trước đó của Cisse' và cộng sự [7] cũng như Jakubowska và cộng sự [14]. Ngoài ra, sự gia tăng hấp thụ trong vùng $1020 - 1080 \text{ cm}^{-1}$ được cho là do tương tác giữa các nhóm hydroxyl từ glycerol, DES và chitosan. Dải hấp thụ rộng trong khoảng $3000 - 3700 \text{ cm}^{-1}$, tập trung quanh 3200 cm^{-1} , tương ứng với dao động kéo dài của liên kết N-H và O-H từ chitosan và cấu trúc choline chloride, cho thấy sự hình thành tương tác mạnh giữa chitosan và các thành phần DES, phù hợp với báo cáo của Jakubowska và cộng sự [14] và Zhou và cộng sự [15].

Đáng chú ý, phổ FTIR còn ghi nhận sự xuất hiện của các đỉnh mới trong vùng $1725 - 1739 \text{ cm}^{-1}$, đặc trưng cho dao động kéo dài của liên kết C=O trong nhóm acid carboxylic. Việc không xuất hiện các đỉnh này trong màng chitosan và màng chitosan – glycerol khẳng định vai trò đặc biệt của DES trong việc thay đổi đặc tính hóa học và cấu trúc của màng chitosan.

3.2. Tính chất cơ học, chống oxy hóa và kháng khuẩn của màng

Việc bổ sung DES hoặc glycerol vào chitosan có ảnh hưởng đáng kể đến tính chất vật lý, cơ học cũng như hoạt tính sinh học của màng sinh học. Một trong những thay đổi đáng chú ý nhất là sự gia tăng độ dày của màng. Kết quả nghiên cứu cho thấy màng chitosan – DES có độ dày lớn nhất (0,18 mm), cao hơn khoảng 1,1 lần so với màng chitosan – glycerol và 1,2 lần so với màng chitosan nguyên chất. Nguyên nhân có thể là do khả năng tạo liên kết hydro mạnh của DES với chitosan, dẫn đến sự tái sắp xếp cấu trúc polymer và làm tăng độ dày màng. Hiện tượng này đã được ghi nhận trong nghiên cứu của Lawal và cộng sự [16], trong đó DES được chứng minh có vai trò điều chỉnh cấu trúc polymer, giúp tăng độ dày màng và cải thiện một số đặc tính như tính cản khí.

Bảng 1. Tính chất vật lý và cơ học của màng chitosan, chitosan – glycerol và chitosan – DES

Mẫu	Độ dày (mm)	Độ hòa tan (%)	Độ thấm hơi nước (WVP, $\times 10^{-10} \text{ g/m.s.Pa}$)	Độ giãn dài khi đứt (EBA, %)	Độ bền kéo (TS, Mpa)
Màng chitosan	0,15	59,52 ^c ±1,23	2,98 ^b ±0,75	39,17 ^c ±1,71	6,34 ^a ±0,82
Màng chitosan - glycerol	0,16	63,28 ^b ±1,15	3,10 ^b ±0,84	45,69 ^b ±1,45	5,74 ^b ±1,12
Màng chitosan – DES	0,18	68,59 ^a ±1,05	3,51 ^a ±0,65	52,37 ^a ±0,95	3,82 ^c ±0,45

Trong mỗi cột, các chữ cái ^{a, b, c} khác nhau đi kèm với các giá trị cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$.

Bên cạnh đó, sự thay đổi còn được ghi nhận ở tính chất cơ học của màng. Màng chitosan nguyên chất có độ bền kéo (TS) cao nhất (6,34 MPa) nhưng độ giãn dài khi đứt (EAB) thấp nhất (39,17%), cho thấy màng có độ cứng cao nhưng lại giòn và dễ gãy khi bị kéo căng. Khi bổ sung glycerol, màng trở nên linh hoạt hơn với EAB tăng lên 45,68% nhưng TS giảm nhẹ xuống 5,74 MPa. Điều này phù hợp với vai trò truyền thống của glycerol như một chất hóa dẻo, giúp làm gián đoạn các liên kết chặt chẽ giữa các chuỗi polymer chitosan, từ đó cải thiện tính mềm dẻo của màng [7, 18]. Tuy nhiên, khi sử dụng DES có chứa astaxanthin thay cho glycerol, sự thay đổi về tính chất cơ học của màng trở nên rõ rệt hơn. Cụ thể, TS giảm đáng kể từ 5,74 MPa (màng chitosan – glycerol) xuống còn 3,82 MPa, trong khi EAB lại tăng lên 52,37%. Sự suy giảm độ bền kéo khi bổ sung DES có thể được lý giải bởi sự hiện diện của acid lactic trong DES, hoạt động như một chất cho liên kết hydro. Acid lactic có khả năng làm gián đoạn các liên kết nội phân tử mạnh giữa các chuỗi chitosan, khiến cho cấu trúc polymer trở nên kém chặt chẽ hơn và gia tăng khả năng biến dạng khi chịu lực kéo [14, 16, 18]. Thay vì liên kết với nhau bằng các liên kết nội phân tử bền vững, các chuỗi polymer có xu hướng tương tác với các thành phần

trong DES bằng các liên kết yếu hơn, làm giảm độ cứng nhưng lại giúp màng trở nên linh hoạt hơn. Hiện tượng này tương đồng với các kết quả nghiên cứu của Jakubowska và cộng sự, Lawal và cộng sự, khi nghiên cứu về ảnh hưởng của DES đối với màng biopolymer [14, 16]. Hiện nay, đối với bao bì dùng để bảo quản thịt, cá, hải sản và rau củ quả đòi hỏi màng bao phải có khả năng co giãn tốt và ít bị nứt vỡ khi chịu tác động cơ học. Như vậy, việc giảm TS nhưng tăng EAB có thể được xem là một lợi thế của màng chitosan – DES giúp làm giảm ảnh hưởng đến cấu trúc của nguyên liệu thực phẩm. Hơn nữa, việc cải thiện độ linh hoạt của màng chitosan – DES còn giúp việc giải phóng các chất có hoạt tính sinh học trong màng được dễ dàng làm tăng cường tính kháng khuẩn của màng chitosan. Lawal và cộng sự [16] đã chứng minh màng bao có chỉ số TS thấp và chỉ số EAB cao, có nghĩa màng có tính mềm dẻo cao và khả năng giải phóng các hợp chất kháng khuẩn có trong màng bao cao, giúp hạn chế sự phát triển của vi sinh vật gây hư hỏng.

Kết quả nghiên cứu của về hoạt tính kháng oxy hóa và kháng khuẩn được thể hiện ở Bảng 2. Hoạt tính chống oxy hóa của màng được đánh giá thông qua phương pháp ABTS và DPPH. Kết quả trong Bảng 2 cho thấy màng chitosan và chitosan – glycerol có khả năng chống oxy hóa rất thấp, với giá trị ABTS và DPPH lần lượt đạt 0,18 – 0,20 $\mu\text{mol TE/g}$ và 0,99 – 1,01 mmol TE/g . Tuy nhiên, khi bổ sung DES – astaxanthin vào chitosan, hoạt tính chống oxy hóa tăng đáng kể, đạt 3,15 $\mu\text{mol TE/g}$ (ABTS) và 4,91 $\mu\text{mol TE/g}$ (DPPH).

Bảng 2. Hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn của màng chitosan, chitosan – glycerol và chitosan – DES

Mẫu	Hoạt tính chống oxy hóa		Đường kính vùng ức chế (mm)	
	ABTS ($\mu\text{mol TE/mL}$)	DPPH ($\mu\text{mol TE/mL}$)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028
Màng chitosan	0,20 ^b ±0,02	0,99 ^b ±0,03	-	-
Màng chitosan - glycerol	0,18 ^b ±0,01	1,01 ^b ±0,02	-	-
Màng chitosan - DES	3,15 ^a ±0,11	4,91 ^a ±0,21	9,43±0,29	15,41±1,07

(-) Không phát hiện hoạt tính. Trong mỗi cột, các chữ cái ^{a,b} khác nhau đi kèm với các giá trị cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$.

So với các nghiên cứu trước đây về chitosan kết hợp với các chất chống oxy hóa [11, 17, 18], màng chitosan - DES chứa astaxanthin thể hiện hoạt tính vượt trội, điều này có thể là do cấu trúc polyene liên hợp của astaxanthin giúp trung hòa các gốc tự do hiệu quả hơn. Các liên kết đôi liên hợp trong phân tử astaxanthin giúp hấp thụ và phân tán năng lượng từ các gốc tự do, từ đó làm giảm tác động oxy hóa [11]. Hơn nữa, DES không chỉ đóng vai trò là dung môi hòa tan mà còn có thể giúp ổn định astaxanthin trong màng chitosan. Các tương tác giữa astaxanthin với DES, đặc biệt là thông qua liên kết hydro giữa nhóm hydroxyl của DES và các nhóm chức của astaxanthin, có thể hạn chế sự phân hủy oxy hóa của hợp chất này [12, 13, 17, 18]. Ngoài ra, sự phân bố đồng đều của astaxanthin trong mạng lưới polymer của chitosan – DES cũng góp phần tăng khả năng chống oxy hóa và kháng khuẩn của màng. Kết quả kháng khuẩn của màng được thực hiện trên hai vi khuẩn gây bệnh thực phẩm là *Staphylococcus aureus* và *Salmonella typhimurium*. Các màng đối chứng (chitosan và chitosan – glycerol) không thể ức chế đáng kể sự phát triển của vi khuẩn, trong khi màng chứa DES – astaxanthin thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh (Bảng 2). Cơ chế kháng khuẩn của màng chitosan – DES có thể được giải thích bởi khả năng phá vỡ màng tế bào, ức chế tổng hợp acid nucleic và gián đoạn quá trình chuyển hóa năng lượng của vi sinh vật [19 - 21]. Các nghiên cứu trước đó cũng đã ghi nhận rằng màng sinh học chứa astaxanthin giúp giảm thiểu nhiễm khuẩn và cải thiện tính an toàn thực phẩm [19, 20].

Những kết quả trên cho thấy màng chitosan – DES bổ sung astaxanthin không chỉ có hoạt tính chống oxy hóa mà còn sở hữu hiệu quả kháng khuẩn, mở ra triển vọng ứng dụng trong bao bì thực phẩm sinh học nhằm nâng cao chất lượng và tính an toàn thực phẩm.

3.3. Tính chất vật lý của màng

Việc bổ sung DES vào màng chitosan ảnh hưởng đáng kể đến các tính chất vật lý của màng, bao gồm độ hòa tan và độ thấm hơi nước (WVP). Độ hòa tan và độ thấm hơi nước (WVP) là các chỉ số quan

trọng dùng để đánh giá khả năng tương tác với nước, độ bền trong môi trường ẩm và tính ứng dụng của màng trong bảo quản thực phẩm [14 - 16]. Việc bổ sung DES làm tăng đáng kể độ hòa tan ($p < 0,05$) so với màng chitosan và chitosan có bổ sung glycerol. Như thể hiện trong Bảng 1, giá trị độ hòa tan của màng chitosan và chitosan - glycerol lần lượt là 59,57% và 63,21%. Trong khi đó, màng chitosan – DES đạt giá trị cao nhất là 68,98%. Hiện tượng này được cho là do sự phá vỡ liên kết phức tạp của chitosan và hình thành liên kết hydro mới, làm tăng độ linh động của chuỗi polyme và tăng khả năng hấp thụ nước, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Lawal và cộng sự khi tạo màng chitosan có bổ sung DES [16].

Kết quả cũng cho thấy màng chitosan có bổ sung DES có WVP cao hơn so với màng chitosan. Tuy nhiên chỉ số này ít có sự khác biệt so với màng có bổ sung glycerol. Như thể hiện trong Bảng 1, màng chitosan có giá trị WVP là $2,98 \times 10^{-10} \text{ g.m}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$, trong khi màng chitosan – glycerol và chitosan – DES có giá trị cao hơn, lần lượt đạt $3,05 \times 10^{-10}$ và $4,95 \times 10^{-10} \text{ g.m}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$. Sự gia tăng WVP tương quan với kết quả SEM và AFM, cho thấy độ xốp bề mặt cao hơn ở các màng có glycerol và DES. Điều này minh chứng cho tác dụng hóa dẻo của glycerol và DES làm giảm sự kết dính của mạng lưới polyme, góp phần làm tăng tính thấm hơi nước [14, 16]. Những kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, cho thấy việc kết hợp các hợp chất DES như choline chloride và acid lactic vào màng polysaccharide, bao gồm chitosan và tinh bột, làm tăng WVP do tác dụng hóa dẻo [6, 16]. Do đó, những phát hiện này nhấn mạnh tác động sâu rộng của DES đối với cấu trúc và tính năng của màng phân hủy sinh học dựa trên chitosan.

Như vậy, việc bổ sung DES không chỉ giúp điều chỉnh tính chất cơ học của màng chitosan theo hướng tăng độ linh hoạt mà còn mang lại các lợi ích bổ sung về khả năng kháng khuẩn [16, 18 - 20]. Trong nghiên cứu này, DES được sử dụng để trích ly astaxanthin từ vỏ tôm và kết hợp với chitosan nhằm tạo ra màng sinh học có đặc tính cải thiện.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng của DES chứa astaxanthin lên đặc tính của màng chitosan, so sánh với màng chitosan thuần và màng chitosan chứa glycerol. Sự bổ sung DES không chỉ cải thiện tính linh hoạt và đồng nhất của cấu trúc màng mà còn tăng cường hiệu quả kháng khuẩn. Phân tích FTIR cho thấy sự hình thành mạnh mẽ của các liên kết hydro giữa DES và chitosan, góp phần nâng cao tính cơ lý của vật liệu. Hình ảnh SEM và AFM xác nhận bề mặt màng trở nên mịn hơn, ít lỗ xốp hơn, phản ánh sự phân bố đồng đều của các thành phần trong màng. Ngoài ra, sự hiện diện của astaxanthin trong DES đã tăng cường hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong bao bì thực phẩm sinh học. Những kết quả này nhấn mạnh vai trò của DES không chỉ như một dung môi mà còn như một tác nhân cải thiện đáng kể tính chất của màng chitosan. Tuy nhiên, cần có thêm các nghiên cứu để tối ưu hóa thành phần DES, đánh giá sự ổn định lâu dài và kiểm chứng hiệu quả bảo quản thực phẩm trong điều kiện thực tế, nhằm hướng đến ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực bao bì sinh học và y sinh.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Công Thương theo hợp đồng số 038.2023.ĐT.BO/HĐKHCN ngày 31/08/2023.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Libio C., Demori R., Ferrão M. F., Lionzo M. I. Z., da Silveira N. P. - Films based on neutralized chitosan citrate as innovative composition for cosmetic application. *Materials Science and Engineering C* **67** (2016) 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.009>.
2. Zhang W., Zhou W., Zhang Z., Zhang D., Guo Z., Ren P., Liu F. - Effect of nano-silica and sorbitol on the properties of chitosan-based composite films. *Polymers (Basel)* **15** (2023). <https://doi.org/10.3390/polym15194015>.
3. Zhu J., Chen X., Huang T., Tian D., Gao R. - Characterization and antioxidant properties of chitosan/ethyl-vanillin edible films produced via Schiff-base reaction. *Food Science and Biotechnology* **32** (2023) 157–167. <https://doi.org/10.1007/s10068-022-01178-w>.
4. Khubiev O. M., Egorov A. R., Kirichuk A. A., Khrustalev V. N., Tskhovrebov A. G., Kritchenkov A. S. - Chitosan-based antibacterial films for biomedical and food applications. *International Journal of Molecular Sciences* **24** (2023) 10738. <https://doi.org/10.3390/ijms241310738>.

5. Liu Y., Yuan Y., Duan S., Li C., Hu B., Liu A., Wu D., Cui H., Lin L., He J., Wu W. - Preparation and characterization of chitosan films with three kinds of molecular weight for food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules* **155** (2020) 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.217>.
6. Chillo S., Flores S., Mastromatteo M., Conte A., Gerschenson L., Del Nobile M. A. - Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering* **88** (2008) 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.002>.
7. Cissé M., Montet D., Loiseau G., Ducamp-Collin M. N. - Influence of the concentrations of chitosan and glycerol on edible film properties showed by response surface methodology. *Journal of Polymers and the Environment* **20** (2012) 830–837. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0437-2>.
8. Gierszewska M., Jakubowska E., Richert A. - The adenine-modified edible chitosan films containing choline chloride and citric acid mixture. *Scientific Reports* **13** (2023) 12629. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39870-4>.
9. Sadiq A. C., Rahim N. Y., Suah F. B. M. - Adsorption and desorption of malachite green by using chitosan-deep eutectic solvents beads. *International Journal of Biological Macromolecules* **164** (2020) 3965–3973. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.029>.
10. Higuera-Ciapara I., Félix-Valenzuela L., Goycoolea F. M. - Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **46** (2006) 185 - 196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>.
11. Johnson E. A., An G.-H. - Astaxanthin from Microbial Sources. *Critical Reviews in Biotechnology* **11** (1991) 297 – 326.
12. Tran C. H., Phan V. M., Le T. H. A. - Optimization of ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) shells using deep eutectic solvent and ethanol as a co-solvent. *LWT* **212** (2024) 116965. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116965>.
13. Lee Y. R., Row K. H. - Comparison of ionic liquids and deep eutectic solvents as additives for the ultrasonic extraction of astaxanthin from marine plants. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **39** (2016) 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.05.014>.
14. Jakubowska E., Gierszewska M., Nowaczyk J., Olewnik-Kruszkowska E. - Physicochemical and storage properties of chitosan-based films plasticized with deep eutectic solvent. *Food Hydrocolloids* **108** (2020) 106007. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106007>.
15. Zhou W., Yu J., Zhao L., Wang K., Hu Z., Wu J.-Y., Liu X. - Enhancement of chitosan-based film physicochemical and storage properties by interaction with proanthocyanidin and natural deep eutectic solvent. *International Journal of Biological Macromolecules* **278** (2024) 134611. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134611>.
16. Lawal K. G., Nazir A., Sundarakani B., Stathopoulos C., Maqsood S. - Unveiling the effect of natural deep eutectic solvents-based date seed polyphenolic extract on the properties of chitosan-PVA films and its application in shrimp packaging. *International Journal of Biological Macromolecules* **280** (2024) 135593. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135593>.
17. Suyatma N. E., Copinet A., Tighzert L., Coma V. - Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends. *Journal of Polymers and Environment* **12** (2004) 1- 6.
18. Rivero S., Damonte L., García M. A., Pinotti A. - An Insight into the role of glycerol in chitosan films. *Food Biophysics* **11** (2016) 117–127. <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9421-4>.
19. Inthamat P., Lee Y. S., Boonsiriwit A., Siripatrawan U. - Improving moisture barrier and functional properties of active film from genipin-crosslinked chitosan/astaxanthin film by heat curing. *International Journal of Food Science and Technology* **57** (2022) 137–144. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15396>.
20. Łupina K., Kowalczyk D., Lis M., Raszewska-Kaczor A., Drozłowska E. - Controlled release of water-soluble astaxanthin from carboxymethyl cellulose/gelatin and octenyl succinic anhydride starch/gelatin blend films. *Food Hydrocolloids* **123** (2022) 107179. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107179>.

21. Karpinski T. M., Ożarowski M., Alam R., Łochyńska M., Stasiewicz M. - What do we know about antimicrobial activity of astaxanthin and fucoxanthin?. *Marine Drugs* **20** (2021) 36. <https://doi.org/10.3390/md20010036>.

ABSTRACT

APPLICATION OF DEEP EUTECTIC SOLVENT CONTAINING ASTAXANTHIN EXTRACTED FROM SHRIMP SHELLS TO ENHANCE THE PROPERTIES OF CHITOSAN FILM

Tran Chi Hai¹, Bui Thuc Trinh¹, Do Hao Nam¹, Phan Van Man², Le Thi Hong Anh^{1*}

¹*Faculty of Food Science and Technology,*

Ho Chi Minh City University of Industry and Trade, Vietnam

²*Faculty of Tourism, Ba Ria–Vung Tau College of Technology, Vietnam*

*Email: anhhlth@huit.edu.vn

This study evaluates the impact of incorporating deep eutectic solvents (DES) containing astaxanthin into chitosan-based films to enhance material properties for food preservation applications. The results indicate that the addition of DES and astaxanthin reduces the tensile strength of chitosan films from 5.53 MPa to 4.13 MPa, while increasing the elongation at break from 45.65% to 54.45%, thereby improving film flexibility. The water vapor permeability (WVP) of the DES – astaxanthin films is approximately twice that of chitosan – glycerol films, making them well – suited for fresh fruit and vegetable packaging by regulating gas exchange, minimizing condensation, and reducing spoilage risk. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis confirms the formation of stable hydrogen bonding interactions among chitosan, DES, and astaxanthin, contributing to improved structural stability. Scanning electron microscopy (SEM) reveals a more homogeneous surface morphology, while atomic force microscopy (AFM) demonstrates microstructural changes that enhance film stability. Additionally, chitosan – DES films exhibit significantly enhanced antioxidant activity – 15 – fold higher based on ABTS and 5 – fold higher based on DPPH assays – compared to pure chitosan or chitosan – glycerol films. The films also show strong antibacterial activity, effectively inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*, potentially due to increased diffusion of astaxanthin within the polymer network. These properties highlight the promising potential of DES – astaxanthin enhanced chitosan films as intelligent packaging materials, capable of extending food shelf life and offering improved microbial control.

Keywords: Deep eutectic solvent, astaxanthin, chitosan film, mechanical properties, antibacterial activity.