

SẢN XUẤT CHITIN TỪ VỎ TÔM SÚ (*Penaeus monodon*) SỬ DỤNG VI KHUẨN *Bacillus* sp. TV11 VÀ *Lactobacillus* sp. T432

Huỳnh Xuân Phong*, Lợi Đức Linh, Phạm Hoàng Nam,
Nguyễn Ngọc Thanh, Bùi Hoàng Đăng Long
Trường Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Chitin là một polysaccharide tự nhiên rất phong phú và được ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực, đặc biệt là trong bảo quản thực phẩm và y dược. Mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định điều kiện khử khoáng và khử protein trong quy trình sản xuất chitin bằng phương pháp sinh học từ vỏ tôm sú (*Penaeus monodon*), nguồn nguyên liệu phong phú ở Đồng bằng Sông Cửu Long. Nghiên cứu sử dụng 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. TV11 và *Lactobacillus* sp. T432 để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ và tỷ lệ của hai chủng này đến quá trình lên men, đồng thời khảo sát ảnh hưởng của nồng độ ri đường và muối NaCl bổ sung đến quá trình lên men. Kết quả cho thấy nồng độ giống vi khuẩn bổ sung là 20% (v/w), tỷ lệ giữa vi khuẩn *Bacillus* sp. TV11 và *Lactobacillus* sp. T432 là 1:1 (lên men với vi khuẩn *Bacillus* sp. TV11 trong 3 ngày sau đó bổ sung vi khuẩn *Lactobacillus* sp. T432) cho kết quả tốt nhất trong quá trình lên men sản xuất chitin. Nồng độ ri đường 15% (w/w) và NaCl 3% (w/w) thích hợp cho quá trình lên men sản xuất chitin. Sản phẩm chitin thô thu được có hàm lượng protein và tro còn lại lần lượt là 8,0% và 3,51% (khử được 79,64% protein và 83,02% tro) sau 9 ngày lên men.

Từ khóa: *Bacillus* sp. TV11; chitin; *Lactobacillus* sp. T432; lên men; vỏ tôm sú

Ngày nhận bài: 01/4/2020; Ngày hoàn thiện: 12/6/2020; Ngày đăng: 10/7/2020

PRODUCTION OF CHITIN FROM SHRIMP SHELLS (*Penaeus monodon*) USING *Bacillus* sp. TV11 AND *Lactobacillus* sp. T342

Huynh Xuan Phong*, Loi Duc Linh, Pham Hoang Nam,
Nguyen Ngoc Thanh, Bui Hoang Dang Long
Can Tho University

ABSTRACT

Chitin is one of abundant polysaccharides in nature and popularly applied in many fields, especially in food preservation and medicine. The study aimed to produce high quality chitin by biological method from shrimp shells (tiger prawn, *Penaeus monodon*) which are the plentiful source of raw materials in Mekong Delta. This study used two strains of *Bacillus* sp. TV11 and *Lactobacillus* sp. T432 to investigate the effects of initial inoculum concentrations of *Bacillus* sp. TV11 and *Lactobacillus* sp. T432 and their ratios to the fermentation processes; to study the effect of molasses and salt concentrations supplemented into the fermentation process. The results show that 20% (v/w) of bacteria concentrations, ratio 1:1 of *Bacillus* sp. TV11 and *Lactobacillus* sp. T432 (fermented with *Bacillus* sp. TV11 in three days then inoculated *Lactobacillus* sp. T432) for the best result to chitin production. Concentrations of molasses at 15% (w/w) and 3% (w/w) of NaCl were suitable for the production of chitin. The crude product of chitin was obtained with protein and ash remaining only 8.00% and 3.51%, respectively (79.64% protein and 83.02% ash were removed) after 9 days of fermentation.

Keywords: *Bacillus* sp. TV11; chitin; fermentation; *Lactobacillus* sp. T432; shrimp shells

Received: 01/4/2020; Revised: 12/6/2020; Published: 10/7/2020

* Corresponding author. Email: hxphong@ctu.edu.vn

1. Giới thiệu

Chitin là vật liệu hiện đại, linh hoạt và thân thiện với môi trường hiện diện phổ biến thứ hai trong tự nhiên, chỉ sau cellulose [1], [2]. Chúng đã được sử dụng hầu hết trong các lĩnh vực như xử lý nước thải, công nghiệp giấy và bột giấy, y dược, mỹ phẩm, công nghệ sinh học, nông nghiệp, khoa học thực phẩm và công nghệ màng [3], [4].

Theo phương pháp hóa học, để tinh sạch chitin thì vỏ đầu tôm được xử lý với các acid mạnh như HCl để khử khoáng và NaOH để khử protein. Một hạn chế trong phương pháp này là gây ô nhiễm môi trường do nước thải có nồng độ BOD (Biological Oxy Demand) cao, ảnh hưởng đặc tính lý hóa, giảm chất lượng, giảm giá thành sản xuất chitin - chitosan và gây hao mòn thiết bị [5], [6]. Lên men vỏ đầu tôm có tác dụng bảo quản và thu hồi một số sản phẩm có giá trị như: chitin, protein, khoáng hữu cơ, lipid, chất màu (astaxanthin). Lên men acid lactic kết hợp với xử lý hóa chất đã được nghiên cứu nhằm thay thế phương pháp hóa học, giảm lượng hóa chất sử dụng [7]-[9]. Xu hướng sử dụng vi khuẩn để loại bỏ protein khỏi phần vỏ giáp xác hiện tại được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm [10], [11]. Tuy nhiên, quá trình lên men sản xuất chitin bằng vi sinh vật cũng có thể phát sinh mùi hôi thối nên cũng cần được quan tâm xử lý trong quá trình sản xuất.

Chitin hiện diện trong tự nhiên ở dạng liên kết với protein và các chất khoáng (chủ yếu là calcium carbonate). Khử protein và khử khoáng là hai bước rất quan trọng vì ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng và hiệu suất thu hồi chitin [12]. Quá trình lên men acid lactic giúp khử khoáng do chúng bị kết tủa (hình thành calcium lactate) và khử protein ở điều kiện pH thấp nhờ hoạt động của các enzyme thủy phân protein từ acid lactic, ví dụ như *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *Lactococcus* sp... [10], [13], [14]. Vi khuẩn *Bacillus* spp. được xem là nhóm có hoạt tính enzyme thủy phân protein rất hiệu quả nên cũng được ứng dụng trong nhiều nghiên cứu

để khử protein trong quá trình thu hồi chitin, một số loài *Bacillus* spp. được sử dụng như *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*,... [15]-[17]. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy kết quả khả quan khi thực hiện quá trình lên men thu hồi chitin với hỗn hợp các chủng vi khuẩn như *L. plantarum* và *Lactococcus* sp. [13], *L. paracasei* và *Serratia marcescens* [18],...

Nghiên cứu của Loi và cộng sự đã phân lập và tuyển chọn được hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. TV11 và *Lactobacillus* sp. T432 có khả năng lên men tốt [19]. Nghiên cứu tiếp theo này được thực hiện với mục tiêu khảo sát khả năng lên men và các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men của vi khuẩn *Bacillus* sp. TV11 và *Lactobacillus* sp. T432 để góp phần nâng cao hiệu quả khử protein và khử khoáng trong quy trình tách chiết chitin bằng phương pháp sinh học.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

Vỏ và vỏ đầu tôm sú được thu thập ở nhà máy chế biến tôm ở TP. Cần Thơ. Mẫu được trữ lạnh trong quá trình thu thập và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Sau khi được rửa với nước, mẫu sẽ được trữ đông ở -20°C đến khi sử dụng. Hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. TV11 và *Lactococcus* sp. T432 được phân lập, tuyển chọn và lưu trữ tại Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ. Hoá chất: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CHO})_2$,... ở dạng tinh khiết do hãng Sigma-Aldrich và Ajax Finechem cung cấp. Các môi trường nuôi cấy vi khuẩn như MRS agar (De Man, Rogosa and Sharpe), MRS broth, NA (Nutrient Agar), NB (Nutrient Broth) được mua từ sản phẩm thương mại của Merck (Đức) và HiMedia Laboratories (Ấn Độ).

2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn *Bacillus* sp. TV11 và *Lactobacillus* sp. T432 đến quá trình lên men

Lên men vỏ tôm sú trong bình nhựa dung tích 3 lít, mỗi bình được chuẩn bị sẵn 1 lít dung dịch gồm muối NaCl 3% (w/w) và ri đường 15% (w/w) [20]. Sau đó bổ sung 300 g vỏ

tôm sú và vi khuẩn (*Bacillus* sp. TV11 và *Lactobacillus* sp. T432) đã được nuôi ủ tương ứng trong môi trường Nutrient broth và MRS broth ở 37°C trong 24 giờ, nồng độ đạt 10^8 tế bào/ml với nồng độ lần lượt là 0; 10; 20; 30; 40 và 50%, tỷ lệ 1:1 tương ứng với các nghiệm thức N1, N2, N3, N4, N5 và N6 để xác định nồng độ vi khuẩn thích hợp nhất cho quá trình lên men vỏ đầu tôm. Thí nghiệm được bố trí trong điều kiện lên men tĩnh ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (30-32°C).

2.3. Khảo sát sự ảnh hưởng của tỷ lệ vi khuẩn đến quá trình lên men

Lên men vỏ tôm sú với nồng độ vi khuẩn đã chọn từ thí nghiệm trên và bổ sung vi khuẩn lần lượt theo các tỷ lệ như sau: P₀: không bổ sung vi khuẩn; P_{TV11}: chỉ bổ sung *Bacillus* sp. TV11; P_{T432}: chỉ bổ sung *Lactobacillus* sp. T432; P_{B:L}: bổ sung cùng lúc cả 2 dòng *Bacillus* sp. TV11 và *Lactobacillus* sp. T432 theo 3 mức độ tỷ lệ chủng vi khuẩn (P_{3:1} tỷ lệ 3:1, P_{1:1} tỷ lệ 1:1 và P_{1:3} tỷ lệ 1:3 của *Bacillus* sp. TV11 và *Lactobacillus* sp. T432); P_(T432+TV11): lên men với *Lactobacillus* sp. T432 trong 3 ngày rồi bổ sung *Bacillus* sp. TV11; P_(TV11+T432): lên men với *Bacillus* sp. TV11 trong 3 ngày và sau đó bổ sung *Lactobacillus* sp. T432 để tìm ra tỷ lệ vi khuẩn thích hợp từ 8 tổ hợp cho quá trình lên men vỏ đầu tôm. Điều kiện lên men được thực hiện tương tự như nội dung 2.2.

2.4. Ảnh hưởng của nồng độ rỉ đường và muối NaCl đến quá trình lên men

Thí nghiệm được thực hiện với các điều kiện chọn từ hai thí nghiệm trên. Bổ sung rỉ đường ở các nồng độ lần lượt là 0; 10; 15 và 20% (w/w) và nồng độ muối ở các mức 0; 3; 5 và 7% (w/w) để tìm ra nồng độ rỉ đường và muối tốt nhất cho quá trình lên men vỏ đầu tôm. Điều kiện lên men được thực hiện tương tự như nội dung 2.2.

2.5. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần và được xử lý thống kê bằng chương trình Stargraphics Plus v5.0. Ở các thí nghiệm khảo sát nồng độ,

tỷ lệ vi khuẩn, nồng độ rỉ đường và muối; các nghiệm thức được xác định giá trị pH (đo bằng pH kế), hàm lượng acid lactic (phương pháp chuẩn độ acid [21]), đạm tổng số (thực hiện theo phương pháp Kjeldahl [21]), đạm amin trong dịch lên men (phương pháp OPA, sử dụng ortho-phthalaldehyde [22]), hàm lượng tro (phương pháp đốt ở nhiệt độ 550-600°C [23]) của bán thành phẩm ở các thời điểm 0; 3; 6; 9; 12 và 15 ngày lên men. Mức độ khử protein và khử khoáng được thực hiện theo mô tả của Rao và Stevens (2005) [24].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn *Bacillus* sp. TV11 và *Lactobacillus* sp. T432

Kết quả phân tích hàm lượng acid lactic trong dịch lên men cho thấy sau 3 ngày lên men, hàm lượng acid lactic của nghiệm thức N5 (bổ sung 40% hai chủng *Bacillus* sp. TV11 và *Lactobacillus* sp. T432 với tỷ lệ 1:1) đạt giá trị cao nhất là 0,96 g/l khác biệt so với nghiệm thức N3 (0,92 g/l), nghiệm thức N2 (0,89 g/l) và nghiệm thức N1 (0,81 g/l) nhưng không khác biệt so với nghiệm thức N4 (0,94 g/l) (Hình 1A). Kết quả cho thấy hàm lượng acid lactic của nghiệm thức N3 (bổ sung 20% *Bacillus* sp. TV11 và *Lactobacillus* sp. T432 với tỷ lệ 1:1) đạt cao nhất 1,71 g/l (ngày 9) khác biệt so với nghiệm thức N1 (1,23 g/l) và N2 (1,42 g/l) nhưng không khác biệt so với nghiệm thức N4 (1,57 g/l) và N5 (1,62 g/l). Ở các ngày 12 và 15, nghiệm thức N3 cũng đạt giá trị cao nhất, lần lượt là 1,89 g/l và 1,98 g/l, khác biệt so với tất cả các nghiệm thức còn lại. Như vậy nghiệm thức N3 có hàm lượng acid cao nhất tương ứng với 20% *Bacillus* sp. TV11 và *Lactobacillus* sp. T432 với tỷ lệ 1:1.

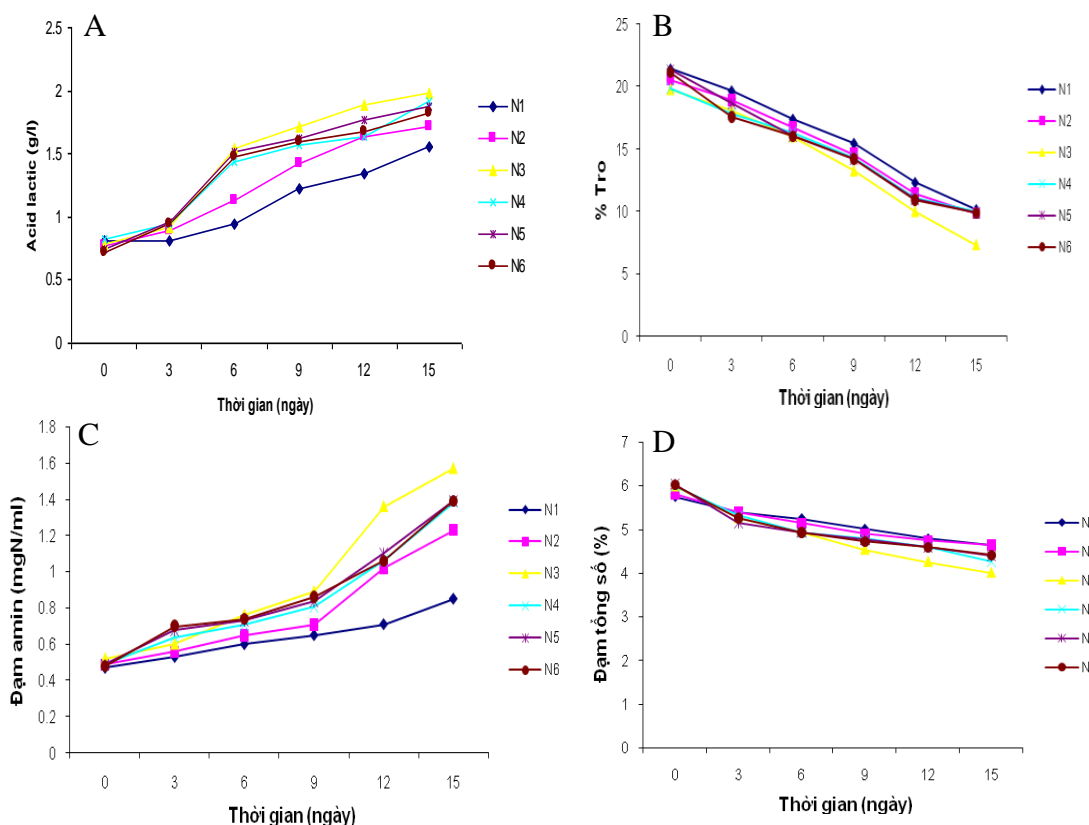
Hàm lượng tro còn lại ở các nghiệm thức đều giảm theo thời gian lên men, giảm mạnh từ ngày 0 đến ngày 12, sau đó giảm không đáng kể từ ngày 12 đến ngày 15 (Hình 1B). Tuy nhiên, nghiệm thức N3 có sự giảm nhiều nhất, từ 10,01% (ngày 12) xuống còn 7,34% (ngày 15). Ở ngày lên men thứ 3, nghiệm thức N4

đạt giá trị thấp nhất là 17,81, thấp hơn so với nghiệm thức N1 (19,68%), N2 (18,92%) và N5 (18,66%), nhưng không khác biệt so với nghiệm thức N3 (18,44%). Ngày 9, nghiệm thức N3 đạt giá trị thấp nhất là 13,29% khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% so với các nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức 3 có hàm lượng tro còn lại thấp nhất, giảm từ 19,82% (ngày 0) xuống còn 7,34% (ngày 15).

Kết quả ở hình 1C cho thấy hàm lượng đạm amin trong dịch lên men của các nghiệm thức tăng chậm đến ngày thứ 9, sau đó tăng nhanh đến ngày thứ 15. Hàm lượng đạm amin của nghiệm thức N3 đạt giá trị cao nhất tăng từ 0,52 mgN/ml (ngày 0) lên 1,57 mgN/ml (ngày 15). Nghiệm thức N5 đạt giá trị cao nhất 0,68 mgN/ml (ngày 3), cao hơn so với nghiệm thức N1 (0,53 mgN/ml), N2 (0,56 mgN/ml)

và N3 (0,6 mgN/ml), không khác biệt so với nghiệm thức N4 (0,64 mgN/ml). Hàm lượng đạm amin thể hiện rõ ở nghiệm thức N3, đạt giá trị cao nhất ở các ngày lên men thứ 9 (0,89 mgN/ml), ngày 12 (1,36 mgN/ml) và ngày 15 (1,57 mgN/ml) khác biệt so với các nghiệm thức còn lại.

Hàm lượng đạm tổng số ở các nghiệm thức đều giảm dần. Sau 3 ngày lên men, nghiệm thức N5 giảm mạnh nhất từ 6,04% (ngày 0) xuống còn 5,15% (ngày 3) (Hình 1D). Tuy nhiên, ở ngày lên men thứ 9; 12 và 15 thì nghiệm thức N3 luôn đạt giá trị thấp nhất 4,54% (ngày 9); 4,26% (ngày 12) và 4,01% (ngày 15), thấp hơn so với các nghiệm thức còn lại. Như vậy, nghiệm thức N3 cho kết quả tốt nhất và được chọn cho thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn đến hàm lượng acid lactic (A), hàm lượng tro (B), đạm amin (C) và đạm tổng số (D)

3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ vi khuẩn đến quá trình lên men

Kết quả cho thấy hàm lượng acid lactic đều tăng theo thời gian lên men và tăng nhanh ở ngày lên men thứ 6 đến ngày thứ 9 (Hình 2A). Các nghiệm thức không có hoặc chỉ bổ sung vi khuẩn *Bacillus* sp. TV11 hàm

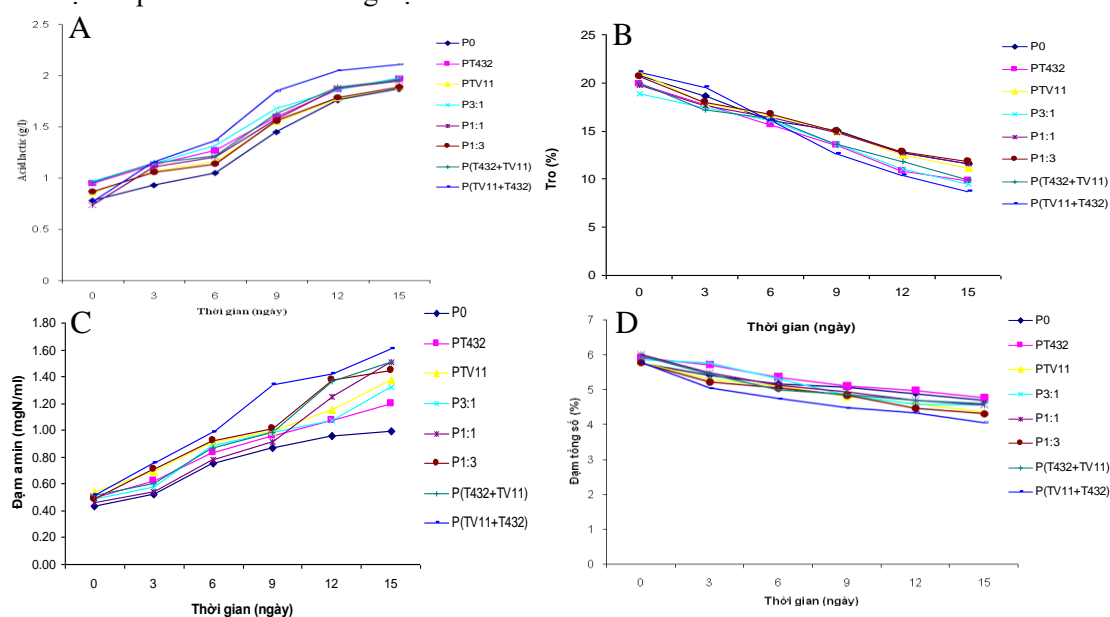
lượng acid lactic luôn thấp hơn các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *Lactobacillus* sp. T432. Ở ngày lên men thứ 3, hàm lượng acid lactic của nghiệm thức 8 cao nhất là 1,16 g/l và giá trị này cao hơn so với nghiệm thức P₀ (0,93 g/l), P_{TV11} (1,07 g/l) và P_{P1:3} (1,06 g/l). Ở các ngày 9, 12 và 15, nghiệm thức P_{P1:3} đạt giá trị cao nhất lần lượt là 1,85; 2,05; và 2,11 g/l; các giá trị này đều khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại với độ tin cậy 95%. Như vậy, nghiệm thức P_{P1:3} cho hàm lượng acid lactic cao nhất so với các nghiệm thức còn lại.

Ở ngày lên men thứ 3, hàm lượng tro còn lại của nghiệm thức P_(T432+TV11) đạt thấp nhất là 17,15%, tương đương với P_{P3:1} (17,37%) nhưng thấp hơn so với các nghiệm thức còn lại (Hình 2B). Tiếp tục lên men ở các ngày 9, 12 và 15, hàm lượng tro còn lại của nghiệm thức P_(TV11+T432) lần lượt là 12,56%; 10,34% và 8,69%. Các giá trị này chỉ không khác biệt với nghiệm thức P_{T432} (10,82%) ở ngày lên men thứ 12. Nghiệm thức P_{P3:1} có hàm lượng tro còn lại thấp nhất, kết quả này phù hợp với hàm lượng acid lactic cao nhất.

Hàm lượng đạm tăng dần theo thời gian lên men, các nghiệm thức P₀, P_{T432} và P_{TV11} (không hoặc chỉ bổ sung một dòng vi khuẩn) luôn đạt thấp hơn so với các nghiệm thức bổ

sung cùng lúc 2 dòng vi khuẩn (Hình 2C). Ở ngày 3, nghiệm thức P_(TV11+T432) có hàm lượng đạm amin cao nhất là 0,75 mgN/ml không khác biệt so với P_{P1:3} (0,71 mgN/ml), nhưng khác biệt so với P_{T432} (0,62 mgN/ml), P_{TV11} (0,69 mgN/ml), P_{P3:1} (0,57 mgN/ml) và P_{P1:1} (0,54 mgN/ml) và P_(T432+TV11) (0,60 mgN/ml). Sau 9, 12 và 15 ngày lên men, nghiệm thức P_(TV11+T432) lần lượt đạt các giá trị cao nhất là 1,34; 1,42 và 1,60 mgN/ml. Các giá trị này đều khác biệt so với các nghiệm thức còn lại (trừ ngày 12 (đạt 1,42 mgN/ml) không khác biệt với nghiệm thức P_{P1:3} và P_(T432+TV11)), đều đạt 1,37 mgN/ml).

Hàm lượng đạm tổng số giảm dần theo thời gian lên men, trong đó nghiệm thức P_(TV11+T432) giảm mạnh nhất từ 5,78% (ngày 0) xuống còn 4,06% (ngày 15), giảm 1,72% (Hình 2D). Nghiệm thức P_{P1:3} luôn đạt giá trị thấp nhất ở các ngày lên men 3 (5,05%); 9 (4,48%) và 15 (4,16%), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 95% so với các nghiệm thức còn lại. Như vậy nghiệm thức P_(TV11+T432) (lên men với vi khuẩn *Bacillus* sp. TV11 trong 3 ngày sau đó bổ sung vi khuẩn *Lactobacillus* sp. T432, tỷ lệ là 1:1 (20% vi khuẩn *Bacillus* sp. TV11 và 20% vi khuẩn *Lactobacillus* sp. T432 (mật số ban đầu 10⁸ tb/ml) cho kết quả tốt nhất và được chọn để bố trí tiếp theo.



Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ vi khuẩn đến hàm lượng acid lactic (A), tro (B), đạm amin (C) và đạm tổng số (D)

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ rỉ đường và muối đến quá trình lên men

Kết quả phân tích ở bảng 1 cho thấy hàm lượng tro còn lại ở các nghiệm thức giảm dần theo thời gian lên men. Tốc độ giảm nhanh nhất từ ngày 0 đến ngày 9, sau đó chậm dần đến ngày 15. Hàm lượng tro còn lại thấp nhất ở nghiệm thức 10 từ 20,67% (ngày 0) xuống còn 2,64% (ngày 15). Giá trị này đều khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ở độ tin cậy 95% (trừ ngày 3, không khác biệt với nghiệm thức 16 (15,41%). Hàm lượng tro còn lại ở nghiệm thức 10 giảm nhanh từ ngày 0 (20,67%) đến ngày 3 (15,25%), ngày 6 (8,15%) và ngày 9 (3,51%), sau đó tốc độ giảm hàm lượng tro còn lại rất chậm đạt 3,42% (ngày 12) và 2,64% (ngày 15). Kết quả cũng cho thấy, hàm lượng tro còn lại từ nghiệm thức 4 đến 9 (có bổ sung rỉ đường 15% và 20%) đều thấp hơn và khác biệt so với các nghiệm thức 1 đến 8 (không có hoặc bổ sung 7% rỉ đường). Như vậy, kết quả phân tích ảnh hưởng của nồng độ

rỉ đường và nồng độ muối đến hàm lượng tro còn lại thì nghiệm thức 10 tốt nhất ứng với bổ sung 15% rỉ đường và 3% muối, tốc độ giảm hàm lượng tro nhanh nhất từ ngày 0 đến ngày 9, sau đó giảm dần đến ngày 15.

Ảnh hưởng của nồng độ rỉ đường và muối đến hàm lượng protein được thể hiện ở bảng 2, tốc độ giảm hàm lượng protein nhanh nhất từ 0 đến 9 ngày, sau đó giảm chậm đến ngày 15. Hàm lượng protein còn lại thấp nhất ở nghiệm thức 10 từ ngày 0 là 39,30% giảm xuống ngày 3 (28,58%), ngày 6 (12,82%) và ngày 9 (8,00%), sau đó chậm lại đến ngày 12 (7,24%) và ngày 15 (6,59%). Kết quả này khác biệt so với các nghiệm thức còn lại vào các ngày 9, 12 và 15. Từ kết quả phân tích cho thấy hiệu quả khử protein cao khi lên men đầu vỏ tôm sú với 15% tỷ lệ vi khuẩn có bổ sung 15% rỉ đường và 3% muối, tương ứng với nghiệm thức 10. Tốc độ khử protein diễn ra nhanh nhất từ 0 đến 9 ngày, sau đó chậm dần đến ngày 12 và ngày 15.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ rỉ đường và muối đến hàm lượng tro

STT	Nghiệm thức		Hàm lượng tro còn lại (%)					
	Rỉ đường (% w/w)	NaCl (% w/w)	Ngày 0	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 12	Ngày 15
1	0	0	21,14 ^d	19,02 ^a	13,75 ^a	11,54 ^b	10,69 ^b	9,73 ^a
2	0	3	20,84 ^{fg}	18,73 ^b	12,64 ^d	11,48 ^b	10,70 ^b	9,34 ^b
3	0	5	21,93 ^b	18,96 ^a	13,49 ^b	11,94 ^a	10,86 ^a	9,29 ^b
4	0	7	20,76 ^{gh}	18,92 ^a	13,58 ^b	11,48 ^b	10,02 ^c	8,89 ^c
5	10	0	20,53 ⁱ	18,46 ^c	13,32 ^c	10,73 ^c	9,91 ^c	8,56 ^d
6	10	3	20,97 ^e	15,98 ^g	10,18 ^h	7,11 ^d	5,96 ^d	5,39 ^e
7	10	5	22,21 ^a	16,95 ^d	10,57 ^f	6,67 ^f	5,81 ^e	5,47 ^e
8	10	7	20,93 ^{ef}	16,30 ^{fg}	10,34 ^g	5,42 ⁱ	5,03 ^g	4,44 ^f
9	15	0	21,57 ^c	16,67 ^e	9,71 ^j	5,45 ⁱ	4,77 ^h	4,02 ^g
10	15	3	20,67 ^h	15,25 ^h	8,15 ^k	3,51 ^k	3,42 ^l	2,64 ^k
11	15	5	20,69 ^h	16,15	9,94 ⁱ	5,53 ^{hi}	4,05 ^{ij}	3,08 ^j
12	15	7	20,35 ^j	16,20	10,07 ^h	6,04 ^g	4,73 ^h	3,52 ^h
13	20	0	21,22 ^d	16,40 ^f	10,71 ^e	6,94 ^e	5,32 ^f	4,17 ^g
14	20	3	21,67 ^c	16,40 ^f	9,68 ⁱ	5,97 ^g	4,07 ⁱ	3,29 ⁱ
15	20	5	21,56 ^c	17,12 ^d	9,92 ⁱ	5,65 ^h	3,94 ^{jk}	3,32 ⁱ
16	20	7	19,95 ^k	15,41 ^h	9,92 ⁱ	4,82 ^j	3,85 ^k	3,44 ^{hi}

Ghi chú: Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các giá trị có mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

So sánh kết quả nghiên cứu với một số kết quả có liên quan đến sản xuất chitin được trình bày ở bảng 3. Tran và Bui (2006) đã sản xuất chitin thô với hàm lượng protein còn lại tương ứng là 13,83% và 10,53% khi lên men đầu vỏ tôm sú với tỉ lệ vi khuẩn *L. plantarum* là 15% (v/w), bổ sung 15% (w/w) rỉ đường và 3% (w/w) NaCl, lên men ở nhiệt độ phòng trong 8 ngày, hàm lượng protein và hàm lượng tro còn lại là 8,00% và 3,51% [20]. Kết quả nghiên cứu khử được 79,64% protein và 83,02% tro, thấp hơn so với kết quả của Rao và Stevens (2004) khi sản xuất chitin

bằng cách lên men vỏ tôm với vi khuẩn *L. plantarum* 541 (khử được 83,0% protein và 88,0% khoáng) [24]. Kết quả đạt được cao hơn khi thực hiện với 10% chủng *L. plantarum* A6 có hoạt tính phân giải tinh bột, bổ sung 5% đường glucose và 2% muối, khả năng khử protein và khử khoáng chỉ đạt được 59,8% và 81,4% [25]. Kết quả nghiên cứu của Nguyen [26] khi lên men vỏ đầu tôm sú với 15% tỉ lệ vi khuẩn *Bacillus* spp. B₈ và vi

khẩn *Lactobacillus* spp. L₅ là 1:1 (lên men với vi khuẩn *Bacillus* spp. B₈ trong 3 ngày sau đó bổ sung chủng *Lactobacillus* spp. L₅ tiếp tục lên men), bổ sung 14% ri đường và 3% muối, kết quả khử protein và khoáng đạt cao nhất ở ngày 9 là 79,19% và 82,54%. Kết quả nghiên cứu của Khorrami và cộng sự (2012) chỉ khử được khoáng và protein lần lượt là 54,0% và 45,0% khi lên men với loài vi khuẩn *L. plantarum* trong 6 ngày [27].

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ ri đường và muối bổ sung đến hàm lượng protein

STT	Nghiệm thức		Hàm lượng protein còn lại (%)					
	Ri đường (% w/w)	NaCl (% w/w)	Ngày 0	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 12	Ngày 15
1	0	0	39,25 ^a	26,44 ^k	13,20 ^{hi}	8,93 ^g	8,57 ^{gh}	8,29 ^{fg}
2	0	3	36,06 ^b	25,82 ^l	13,79 ^{gh}	9,12 ^f	8,85 ^{de}	8,57 ^c
3	0	5	38,53 ^a	27,37 ⁱ	14,51 ^{efg}	8,99 ^g	8,52 ^h	8,30 ^f
4	0	7	38,54 ^a	24,15 ^m	14,35 ^{efg}	9,35 ^{de}	8,95 ^{cd}	8,55 ^{cd}
5	10	0	39,51 ^a	26,93 ^j	14,08 ^{fg}	9,58 ^c	9,05 ^{bc}	8,56 ^{cd}
6	10	3	39,42 ^a	27,67 ^h	15,76 ^c	9,55 ^c	9,10 ^b	8,80 ^b
7	10	5	39,42 ^a	27,86 ^g	17,28 ^a	10,03 ^a	9,61 ^a	9,32 ^a
8	10	7	38,38 ^a	27,28 ⁱ	16,04 ^{bc}	8,66 ^h	8,30 ⁱ	7,94 ⁱ
9	15	0	38,93 ^a	28,47 ^f	14,93 ^{de}	9,15 ^f	8,14 ^j	7,82 ^j
10	15	3	39,30 ^a	28,58 ^f	12,82 ⁱ	8,00 ⁱ	7,24 ^k	6,59 ^k
11	15	5	39,87 ^a	29,56 ^c	14,66 ^{ef}	9,44 ^d	8,34 ⁱ	8,05 ^h
12	15	7	38,57 ^a	29,29 ^d	15,45 ^{cd}	9,37 ^d	8,25 ^{ij}	7,96 ^{hi}
13	20	0	38,30 ^a	28,77 ^e	15,59 ^{cd}	9,76 ^b	8,49 ^h	8,20 ^g
14	20	3	38,87 ^a	30,72 ^a	16,21 ^{bc}	9,74 ^b	8,65 ^g	8,37 ^{ef}
15	20	5	39,78 ^a	30,08 ^b	16,67 ^{ab}	9,55 ^c	8,69 ^{fg}	8,36 ^f
16	20	7	39,27 ^a	30,00 ^b	16,57 ^{ab}	9,27 ^c	8,78 ^{ef}	8,46 ^{de}

Ghi chú: Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các giá trị có mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Bảng 3. So sánh kết quả một số nghiên cứu về chitin

Chỉ tiêu chất lượng chitin	Sản phẩm nghiên cứu	Kết quả tham khảo				
		Tran và Bui [20]	Rao và Stevens [24]	Rao và Stevens [25]	Nguyen [26]	Khorrami và cộng sự [27]
Protein còn lại (%)	8,00	13,83	13,9	4,86	8,18	28,8
Tro còn lại (%)	3,51	10,53	11,9	2,86	3,60	16,4
Protein khử được (%)	79,64	-	83,0	59,8	79,19	45,0
Tro khử được (%)	83,02	-	88,0	81,4	82,54	54,0
Thời gian (ngày)	9	-	-	6	9	6

4. Kết luận

Kết quả sản xuất chitin từ vỏ tôm sú được thực hiện thành công với các điều kiện được xác định bao gồm nồng độ của vi khuẩn *Bacillus* sp. TV11 và vi khuẩn *Lactobacillus* sp. T432 là 20% với tỷ lệ chủng giống là 1:1 (nồng độ 108 tế bào/ml), môi trường bổ sung ri đường 15% (w/w) và NaCl 3% (w/w), lên men với vi khuẩn *Bacillus* sp. TV11 trong 3 ngày và sau đó bổ sung vi khuẩn *Lactobacillus* sp. T432, tiếp tục ủ đến 9 ngày. Sản phẩm chitin thu được với hàm lượng protein và tro còn lại lần lượt là 8,00% và 3,51%, tương đương với tỷ lệ khử protein và khoáng lần lượt là 79,64% và 83,02%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. O. Aytekin, and M. Elibol, "Cocultivation of *Lactococcus lactis* and *Teredinobacter turnirae* for biological chitin extraction from prawn waste," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 33, no. 3, pp. 393-399, 2009.
- [2]. M. V. Tzoumaki, T. Moschakis, E. Scholten, and C. G. Biliaderis, "In vitro lipid digestion of chitin nanocrystal stabilized o/w emulsions," *Food & Function*, vol. 4, no. 1, pp. 121-129, 2013.
- [3]. S. A. M. El-Aidie, "A review on chitosan: Ecofriendly multiple potential applications in the food industry," *International Journal of Advancement in Life Sciences Research*, vol. 1, no. 1, pp. 1-14, 2018.
- [4]. M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Progress in Polymer Science*, vol. 31, no. 7, pp. 603-632, 2006.
- [5]. S. Kaur, and G. S. Dhillon, "Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: A review," *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 35, no. 1, pp. 44-61, 2013.
- [6]. X. Mao, N. Guo, J. Sun, and C. Xue, "Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review," *Journal of Cleaner Production*, vol. 143, no. 1, pp. 814-823, 2017.
- [7]. Y. Kim, and R. D. Park, "Progress in bioextraction processes of chitin from crustacean biowastes," *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, vol. 58, no. 4, pp. 545-554, 2015.
- [8]. W. J. Jung, and R. D. Park, "Bioproduction of chitooligosaccharides: Present and Perspectives," *Marine Drugs*, vol. 12, no. 11, pp. 5328-5356, 2014.
- [9]. J. Synowiecki, and N. A. A. Q. Al-Khateeb, "The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards," *Food Chemistry*, vol. 68, no. 2, pp. 147-152, 2000.
- [10]. S. Duan, L. Li, Z. Zhuang, W. Wu, S. Hong, and J. Zhou, "Improved production of chitin from shrimp waste by fermentation with epiphytic lactic acid bacteria," *Carbohydrate Polymers*, vol. 89, no. 4, pp. 1283-1288, 2012.
- [11]. R. Castroa, I. Guerrero-Legarretab, and R. Bórquez, "Chitin extraction from *Allopetrolisthes punctatus* crab using lactic fermentation," *Biotechnology Reports*, vol. 20, p. e00287, 2018.
- [12]. T. Philibert, B. H. Lee, and N. Fabien, "Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 181, no. 4, pp. 1314-1337, 2017.
- [13]. F. C. Francisco, R. M. C. Simora, and S. N. Nuñal, "Deproteination and demineralization of shrimp waste using lactic acid bacteria for the production of crude chitin and chitosan," *AACL Bioflux*, vol. 8, no. 1, pp. 107-115, 2015.
- [14]. Y. Xu, C. Gallert, and J. Winter, "Chitin purification from shrimp wastes by microbialdeproteination and decalcification," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 79, no. 4, pp. 687-697, 2008.
- [15]. O. Ghorbel-Bellaaj, S. Hajji, I. Younes, M. Chaabouni, M. Nasri, and K. Jellouli, "Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A1 using response surface methodology," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 61, pp. 243-250, 2013.
- [16]. B. A. Chebaabc, T. I. Zaghoulc, and A. R. El-Mahdy, "Demineralized crab and shrimp shell powder: Cost effective medium for *Bacillus* sp. R2 growth and chitinase production," *Procedia Manufacturing*, vol. 22, pp. 413-419, 2018.
- [17]. T. K. Sini, S. Santhosh, and P. T. Mathew, "Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation," *Carbohydrate Research*, vol. 342, no. 16, pp. 2423-2429, 2007.
- [18]. W. J. Jung, G. H. Jo, J. H. Kuk, Y. J. Kim, K. T. Oh, and R. D. Park, "Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3," *Carbohydrate Polymers*, vol. 68, no. 4, pp. 746-750, 2007.
- [19]. D. L. Loi, H. N. Pham, and X. P. Huynh, "Isolation and selection of *Bacillus* spp. and *Lactobacillus* spp. producing chitin," (in Vietnamese), *Proceedings of The 6th Young Scientist Conference of Universities and Colleges in Agricultures, Forestries, Fisheries and Water Resources, Tay Nguyen University, Vietnam*, 2014, pp. 532-536.
- [20]. T. L. Tran, and V. T. Bui, "Study on the application of *Lactobacillus plantarum* in fermentation of shrimp waste (*Penaeus monodon*) for chitin recovery," (in Vietnamese), *Journal of Fisheries Science and Technology, Nha Trang University*, vol. 3, pp. 24-28, 2006.
- [21]. T. M. Le, T. H. Nguyen, T. T. Pham, T. H. Nguyen, and T. L. C. Le, *Analytical Methods*

- in Fermentation Technology*. Science and Technology Publishing House, Vietnam, (in Vietnamese), 2005.
- [22]. T. B. T. Phan, "Study on the proteases from earthworm *Perionyx excavatus* in the autolysis process and their potential application," PhD. Dissertation, VNUHCM-University of Science, (in Vietnamese), 2010.
- [23]. D. N. Le, *Chemical Analytical Methods in Plants and Animals*. Hue University, (in Vietnamese), 2002.
- [24]. M. S. Rao and W. F. Stevens, "Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 80, no. 9, pp. 1080-1087, 2005.
- [25]. M. S. Rao, and W. F. Stevens, "Fermentation of shrimp biowaste under different salt concentrations with amylolytic and non-amylolytic *Lactobacillus* strains for chitin production," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 44, no. 1, pp. 83-87, 2005.
- [26]. V. Q. Nguyen, "Isolation and applicatin of *Bacillus* sp. and *Lactobacillus* sp. in preliminary production of chitin," Master Thesis, Can Tho University, (in Vietnamese), 2011.
- [27]. M. Khorrami, G. D. Najafpour, H. Younesi, and M. N. Hosseinpour, "Production of chitin and chitosan from shrimp chell in batch culture of *Lactobacillus plantarum*," *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, vol. 26, no. 3, pp. 217-223, 2012.