

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.040

## NGHIÊN CỨU CHIẾT RÚT VÀ KHẢO SÁT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA CHITOSAN TAN TRONG NƯỚC TỪ VỎ TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)

Phạm Văn Dũ<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Kim Thương<sup>2</sup>, Nguyễn Văn Thơm<sup>1</sup> và Lê Thị Minh Thủy<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Sinh viên ngành Công nghệ chế biến Thủy sản khóa 42, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm bài viết: Lê Thị Minh Thủy (email: ltmthuy@ctu.edu.vn)

### ABSTRACT

The aim of research was to produce water-soluble chitosan and inhibit bacterial growth from the white leg shrimp shell (*Litopenaeus vannamei*) through deacetylation of chitin in NaOH solution to obtain the crude chitosan. Next, crude chitosan was treated in acetic acid solution at various concentrations and different times to convert it into the water-soluble chitosan. The result showed that chitin was treated in NaOH at the concentration of 50% for 36 hours to collect chitosan with degree of deacetylation (93.1%), viscosity (20 mPas) and high recovery yield (46.8%). The crude chitosan was soaked in acetic acid 2% in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4% for 4 hours to collect the water-soluble chitosan. The solubility of water-soluble chitosan reached to 88.6% and FTIR spectrum showed that the functional groups were almost similar to crude chitosan. The antibacterial activity of water-soluble chitosan was lower than the crude chitosan with the concentration inhibited *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* of water-soluble chitosan was 8% while the concentration of crude chitosan was 2%. However, the water-soluble chitosan could be enhanced the application in food processing field.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm mục tiêu tạo ra chitosan có khả năng tan trong nước và kháng khuẩn từ vỏ tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) thông qua quá trình deacetyl hóa chitin trong dung dịch NaOH để thu chitosan thô. Tiếp theo, chitosan thô được xử lý trong dung dịch acetic acid với các nồng độ và thời gian khác nhau để chuyển thành dạng chitosan tan trong nước. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chitin được xử lý trong dung dịch NaOH nồng độ 50% trong 36 giờ cho chitosan có độ deacetyl (93,1%), độ nhớt (20 mPas) và hiệu suất thu hồi cao (46,8%). Chitosan thô khi xử lý trong dung dịch acetic acid có nồng độ 2%, cùng với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4% trong thời gian 4 giờ để thu chitosan tan trong nước. Độ hòa tan của chitosan tan trong nước đạt 88,6% và phổ FTIR cho thấy hầu như không có sự khác biệt về các nhóm chức năng khi so sánh với chitosan thô. Mẫu chitosan tan trong nước thể hiện tính kháng khuẩn thấp hơn mẫu chitosan thô khi nồng độ ức chế cả 3 chủng vi khuẩn *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* của chitosan tan trong nước là 8% trong khi chitosan thô là 2%. Tuy nhiên, chính tính chất của chitosan tan trong nước có thể nâng cao tính ứng dụng của loại chitosan này trong lĩnh vực chế biến thực phẩm.

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 05/11/2019

Ngày nhận bài sửa: 16/01/2020

Ngày duyệt đăng: 29/04/2020

### Title:

The extraction and antibacterial ability of water-soluble chitosan from white leg shrimp shell (*Litopenaeus vannamei*)

### Từ khóa:

Chitosan tan trong nước, độ hòa tan, phổ FTIR, tính kháng khuẩn, vỏ tôm thẻ chân trắng

### Keywords:

Antibacterial activity, FTIR spectrum, solubility, water-soluble chitosan, white leg shrimp shell

Trích dẫn: Phạm Văn Dũ, Nguyễn Thị Kim Thương, Nguyễn Văn Thơm và Lê Thị Minh Thủy, 2020. Nghiên cứu chiết rút và khảo sát tính kháng khuẩn của chitosan tan trong nước từ vỏ tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(2B): 136-145.

## 1 GIỚI THIỆU

Chitosan là một polymer sinh học có nguồn gốc từ vỏ của các loài giáp xác như tôm, cua (Kim *et al.*, 2011) và có nhiều tính năng quan trọng như khả năng tạo màng, hạn chế mất nước, tính tự phân hủy, kháng khuẩn và khả năng chống oxy hóa, không độc hại và nhiều chức năng quan trọng khác (Tharanathan and Kittur, 2003). Tuy nhiên, một trong những nhược điểm của chitosan là không hòa tan trong môi trường trung tính bởi vì chitosan có cấu trúc tinh thể phức tạp, sự hiện diện của nhóm amino (-NH<sub>2</sub>) và bị chi phối bởi độ deacetyl dẫn tới việc giảm tính ứng dụng của nó trong lĩnh vực công nghệ thực phẩm (Ma *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2010). Vì vậy, việc sử dụng các nhóm ưa nước để gắn vào nhóm amino ở vị trí carbon số 2 của phân tử chitosan bằng các liên kết cộng hóa trị nhằm cải thiện khả năng hòa tan trong nước của chitosan và nâng cao tính ứng dụng của nó trong lĩnh vực chế biến (Ma *et al.*, 2008) đã được đưa ra. Tuy nhiên, cấu tạo của phân tử chitosan và tính chất của chitosan sẽ biến đổi so với ban đầu, cũng như chức năng của nó cũng có thể bị ảnh hưởng đặc biệt là hoạt tính kháng khuẩn. Do đó, để đánh giá mức độ kháng khuẩn của chitosan tan trong nước, ba loại vi khuẩn gồm *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* đã được chọn để kiểm tra.

Tôm thẻ chân trắng là sản phẩm xuất khẩu chủ lực của nước ta chiếm tỷ trọng cao nhất (69,4%), đạt 1,7 tỷ USD trong cơ cấu sản phẩm tôm xuất khẩu trong chín tháng đầu năm 2019 (VASEP, 2019). Cùng với sự phát triển của ngành công nghiệp chế biến tôm, một lượng lớn phụ phẩm như đầu và vỏ tôm được tạo ra chiếm khoảng 40-50% - khối lượng tôm (Sachindra *et al.*, 2006). Nguồn phụ phẩm này đã và đang được tận dụng để sản xuất ra nhiều hợp chất sinh học có giá trị kinh tế, trong đó chitosan được tập trung sản xuất nhiều nhất, tuy nhiên các nghiên cứu tinh chế chitosan có khả năng tan trong nước còn khá hạn chế. Vì vậy, việc chiết rút và khảo sát tính kháng khuẩn của chitosan tan trong nước từ vỏ tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) đã được triển khai nhằm chọn được phương pháp sản xuất chitosan tan trong nước đạt chất lượng và kháng khuẩn tốt để ứng dụng trong lĩnh vực công nghệ thực phẩm.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu vỏ tôm thẻ chân trắng được thu tại công ty Cổ phần thủy sản Cổ Chiên, khu công nghiệp Trà Nóc, thành phố Cần Thơ, vỏ tôm được bảo quản trong các thùng xốp và giữ lạnh bằng nước đá trong suốt quá trình vận chuyển về phòng thí nghiệm, rửa sạch để loại bỏ tạp chất, cắt bỏ chân tôm, sau đó phơi ráo, cắt nhỏ cho vào túi PE với khối lượng mỗi gói là 200 g và được bảo quản trong tủ đông -20°C cho đến khi tiến hành thí nghiệm.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 *Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của quá trình deacetyl hóa đến chất lượng của chitosan từ vỏ tôm thẻ chân trắng*

Mục tiêu của thí nghiệm này là chọn ra chế độ deacetyl hóa thích hợp để thu được chitosan có chất lượng tốt

Chitin từ vỏ tôm thẻ chân trắng thu được bằng cách xử lý khử khoáng và khử protein lần lượt trong HCl và NaOH theo phương pháp của Lê Thị Minh Thủy và Nguyễn Văn Thơm (2019) với một vài điều chỉnh cho phù hợp với điều kiện bố trí thí nghiệm. Đầu tiên, vỏ tôm được ngâm trong HCl 6% với thời gian 12 giờ, tỷ lệ nguyên liệu và dung dịch HCl (w/v) là 1/10. Tiếp theo, mẫu được rửa trung tính và tiếp tục khử protein bằng NaOH nồng độ 8% với thời gian 36 giờ, tỷ lệ nguyên liệu và dung dịch NaOH (w/v) là 1/10 ở nhiệt độ phòng. Chitin thu được sau khi loại khoáng và protein được tiến hành deacetyl hóa trong dung dịch NaOH ở các nồng độ lần lượt là 40, 50 và 60% với thời gian xử lý lần lượt là 24, 36 và 48 giờ, nhiệt độ trong suốt quá trình deacetyl hóa dao động từ 65-70°C, tỷ lệ vỏ tôm với dung dịch NaOH (w/v) là 1/12. Sau đó, mẫu được rửa trung tính và sấy khô ở 60°C trong 4 giờ để thu được chitosan thô có độ ẩm < 10%. Chitosan được kiểm tra độ deacetyl hóa, tính hiệu suất thu hồi. Chọn mẫu chitosan có độ deacetyl hóa cao nhất để tiến hành phân tích phổ FTIR. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 2 nhân tố (nồng độ và thời gian ngâm NaOH) với 9 nghiệm thức và 3 lần lặp lại. Khối lượng mỗi mẫu là 100 g.

### 2.2.2 Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của chế độ xử lý trong dung dịch acetic acid đến khả năng tan trong nước và các tính chất hòa tan của chitosan

Mục tiêu của thí nghiệm này là nhằm xác định điều kiện xử lý bằng acetic acid thích hợp để chuyển đổi chitosan thành dạng tan trong nước mà vẫn giữ được các đặc tính của chitosan ban đầu

Mẫu chitosan thô (sau quá trình deacetyl hóa) được hòa tan trong dung dịch acetic acid với các nồng độ lần lượt là 1, 2 và 3%, tỷ lệ chitosan thô và dung dịch (w/v) là 1/20 và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> được thêm vào dung dịch với tỷ lệ 4% (v/v). Tiến hành khuấy trộn và lắc liên tục dung dịch trong thời gian lần lượt là 2, 4 và 6 giờ ở điều kiện nhiệt độ phòng. Cho tiếp ethanol (95%) vào gấp đôi thể tích dung dịch, mẫu được ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng và sấy ở 60°C trong 22 giờ để thu sản phẩm chitosan tan trong nước có độ ẩm < 10%. Tiến hành phân tích các chỉ tiêu độ nhớt, độ hòa tan và tính hiệu suất thu hồi để để chọn điều kiện xử lý bằng acetic acid tốt nhất, sau đó phân tích phổ FTIR của mẫu tối ưu. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 2 nhân tố (nồng độ và thời gian xử lý trong dung dịch CH<sub>3</sub>COOH) với 9 nghiệm thức và 3 lần lặp lại. Khối lượng mỗi mẫu là 100 g.

### 2.2.3 Thí nghiệm 3: Khảo sát khả năng kháng khuẩn của chitosan tan trong nước

Mục tiêu của thí nghiệm này là xác định khả năng kháng khuẩn của chitosan tan trong nước đối với các dòng vi sinh vật khác nhau

Khả năng kháng khuẩn của chitosan thô (kết quả thí nghiệm 1) và chitosan tan trong nước (kết quả thí nghiệm 2) được phân tích tham khảo theo phương pháp của Du *et al.* (2009) với một số điều chỉnh. Chuẩn bị dung dịch chitosan thô (nồng độ 2%) và chitosan tan trong nước có (nồng độ là 2,4,6 và 8% để chọn ra nồng độ chitosan thích hợp thể hiện được hoạt tính kháng khuẩn của chúng. Cây 50 µL dung dịch huyền phù của từng chủng vi khuẩn gây bệnh (*E. coli*, *S. aureus* và *Salmonella*) vào đĩa petri có chứa sẵn môi trường Luria-Betarni và dung dịch chitosan (2% đối với chitosan tan trong acid và 4, 6, 8% đối với chitosan tan trong nước). Sau đó ủ trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C và tiến hành đo đường kính vùng kháng khuẩn.

### 2.3 Phương pháp phân tích

Thành phần hóa học của nguyên liệu vỏ tôm thẻ chân trắng được xác định theo AOAC (2000), cụ thể độ ẩm được xác định bằng phương pháp sấy, hàm

lượng khoáng bằng phương pháp đốt và xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Kjehdal.

Độ deacetyl (DDA): Sử dụng phương pháp chuẩn độ axit-bazo (Domard and Rinaudo, 1983). Mẫu chitosan thô 0,1 g được hòa tan trong 30 mL HCl có nồng độ 0,1 M ở nhiệt độ phòng, tiếp tục cho thêm 5-6 giọt methyl đỏ. Sau đó dung dịch được chuẩn độ bằng NaOH 0,1 M, ngừng chuẩn độ khi dung dịch chuyển sang màu cam. DDA của chitosan thô được tính dựa trên số mL NaOH 0,1 M đã dùng trong suốt quá trình chuẩn độ. Độ deacetyl được tính theo công thức: DDA (%)

$$DDA (\%) = \frac{(C_1V_1 - C_2V_2) \times 0.016}{M \times 0.0994} \times 100$$

Trong đó: C<sub>1</sub>: nồng độ dung dịch HCl dùng hòa tan chitosan (M); C<sub>2</sub>: nồng độ dung dịch NaOH dùng để chuẩn độ (M); V<sub>1</sub>: thể tích dung dịch HCl; V<sub>2</sub>: thể tích dung dịch NaOH đã dùng trong chuẩn độ (mL); khối lượng của mẫu chitosan thô (g).

Đo độ nhớt: Sử dụng máy Brookfield DV, mẫu chitosan thô được pha trong dung dịch acetic acid 1%, còn đối với mẫu chitosan tan trong nước được hòa tan trong nước cất, khuấy mẫu cho tan hoàn toàn, nồng độ dung dịch chitosan cuối cùng là 0,1% (w/v) và quá trình đo được thực hiện ở nhiệt độ phòng (Kim *et al.*, 1994).

Xác định hiệu suất thu hồi bằng phương pháp cân: xác định khối lượng mẫu ban đầu và khối lượng sau khi sấy. Hiệu suất thu hồi tính theo công thức  $H = \frac{Y}{X} \times 100\%$ , trong đó, Y (g) là khối lượng sau khi sấy, X (g) là khối lượng mẫu trước khi sấy.

Phân tích phổ FTIR nhằm xác định các nhóm chức đặc trưng của chitosan thô và chitosan tan trong nước được mô tả bởi Benavente *et al.* (2015). Sử dụng máy quang phổ Bruker Optics ALPHA và đo ở bước sóng từ 500 đến 4000 cm<sup>-1</sup>.

Xác định độ hòa tan bằng phương pháp lọc (Hemung, 2013) với một vài hiệu chỉnh. Cho 0,1 g mẫu hòa tan vào nước cất đối với mẫu chitosan tan trong nước và hòa tan trong dung dịch acetic acid đối với chitosan thô, khuấy đảo trong 30 phút. Sau đó dung dịch được lọc qua giấy lọc và đem sấy ở nhiệt độ 60°C đến khi khối lượng không đổi (B), độ hòa tan của sản phẩm theo công thức  $T (\%) = (D - C) / D$ . Trong đó: T là độ hòa tan của chitosan, D (g) là khối lượng của chitosan tan trong nước ban đầu trước khi được hòa tan với nước cất, C (g) là khối lượng vật chất còn lại trên giấy lọc.

Phân tích khả năng kháng khuẩn của chitosan tan trong nước và chitosan thô được tham khảo theo phương pháp của Du *et al.* (2009) với một vài điều

chính cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. ba loại vi khuẩn thử nghiệm trong nghiên cứu này là (*E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella*).

**2.4 Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu thu thập được phân tích bằng phương pháp thống kê (trung bình, độ lệch chuẩn, sử dụng chương trình Microsoft Excel 2010). Sự khác biệt của các nhân tố giữa các nghiệm thức được phân tích bằng ANOVA hai nhân tố (thí nghiệm 1 và 2) với mức ý nghĩa 95% và phép thử Duncan ( $p < 0,05$ ) bằng chương trình SPSS 20.0.

**3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1 Thành phần hóa học của vỏ tôm thẻ chân trắng**

Sự hiện diện của hai thành phần khoáng và protein trong nguyên liệu sẽ gây cản trở quá trình deacetyl hóa và ảnh hưởng đến hiệu quả chiết rút và tính chất của chitin hay chitosan (Lê Thị Minh Thủy và ctv, 2019). Thông qua kết quả phân tích được thể hiện ở Bảng 1, hàm lượng protein trong vỏ tôm thẻ chân trắng khá cao (49,4%) và hàm lượng khoáng (25,3%), còn độ ẩm chiếm 29,04%, và tương đồng với công bố của Allwin *et al.* (2015). Do đó, trong

quá trình sản xuất chitin cần có các biện pháp xử lý phù hợp để khử các hợp chất phi chitin, điển hình là protein và khoáng là những chất liên kết chặt chẽ với chitin hiện diện trong nguyên liệu vỏ tôm (Ehrlich *et al.*, 2009) để thu nhận chitin có độ tinh khiết và chất lượng tốt.

**Bảng 1: Thành phần hóa học của vỏ tôm thẻ chân trắng (tính theo căn bản khô)**

Thành phần hóa học	Khoáng	Protein	Độ ẩm (%)
Hàm lượng	25,3±0,121	49,4±0,015	29,04±0,357

(Ghi chú: số liệu được biểu thị dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn với n=3).

**3.2 Ảnh hưởng của quá trình deacetyl hóa đến chất lượng của chitosan từ vỏ tôm thẻ chân trắng**

Quá trình deacetyl hóa là quá trình tách nhóm acetyl (-CO-CH<sub>3</sub>) ra khỏi phân tử chitin và tạo thành phân tử chitosan tương ứng. Thông thường, quá trình deacetyl được thực hiện bằng cách xử lý chitin trong dung dịch NaOH đậm đặc (Trang Sĩ Trung và ctv., 2018).

**Bảng 2: Sự thay đổi các tính chất của chitosan từ vỏ tôm thẻ chân trắng**

Nồng độ NaOH (%)	Thời gian (giờ)	Chitosan			
		Độ deacetyl (%)	Độ hòa tan (%)	Hiệu suất thu hồi (%)	Độ nhớt (mPas)
40	24	50,6±3,22 <sup>a</sup>	44,7±4,31 <sup>a</sup>	49,7±0,92 <sup>c</sup>	9,53±0,19 <sup>a</sup>
	36	64,3±3,23 <sup>b</sup>	47,4±2,97 <sup>a</sup>	48,9±0,67 <sup>bc</sup>	10,7±0,33 <sup>b</sup>
	48	76,0±3,12 <sup>c</sup>	46,7±1,79 <sup>a</sup>	48,5±1,65 <sup>bc</sup>	9,22±0,29 <sup>a</sup>
50	24	88,4±0,90 <sup>d</sup>	66,8±1,04 <sup>b</sup>	49,2±2,08 <sup>bc</sup>	17,2±0,47 <sup>e</sup>
	36	93,1±1,26 <sup>e</sup>	91,6±0,43 <sup>c</sup>	46,8±0,52 <sup>b</sup>	20,0±0,43 <sup>f</sup>
	48	95,3±1,92 <sup>e</sup>	96,9±1,85 <sup>c</sup>	40,0±0,48 <sup>a</sup>	15,0±1,15 <sup>c</sup>
60	24	88,0±1,64 <sup>d</sup>	94,9±0,26 <sup>bc</sup>	47,4±0,70 <sup>bc</sup>	15,6±0,32 <sup>d</sup>
	36	94,4±0,84 <sup>e</sup>	95,2±1,06 <sup>bc</sup>	46,5±1,43 <sup>b</sup>	20,9±0,65 <sup>e</sup>
	48	95,7±0,79 <sup>e</sup>	96,4±2,44 <sup>c</sup>	39,7±0,65 <sup>a</sup>	17,6±0,41 <sup>e</sup>

(Ghi chú: trong cùng một cột, các giá trị có những chữ cái (a, b, c) theo sau giống nhau thì không khác biệt. Số liệu được biểu thị dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn với n=3).

Bảng 2 cho thấy khả năng loại gốc acetyl phụ thuộc nhiều vào nồng độ NaOH sử dụng và thời gian xử lý (thể hiện kết quả thống kê). Khi tăng đồng thời nồng độ NaOH từ 40 lên 60% và tăng thời gian xử lý từ 24 đến 48 giờ DDA tăng từ 50,6 lên 95,7%. Nguyên nhân là do dưới tác dụng của nhiệt độ và NaOH đậm đặc, nhóm -NHCOCH<sub>3</sub> có trong chitin sẽ chuyển thành nhóm -NH<sub>2</sub> để tạo thành chitosan tương thích (Trần Thị Luyến, 2006). Độ deacetyl càng cao khi nồng độ NaOH càng cao và thời gian deacetyl càng dài. Tuy nhiên, càng về sau, nhóm acetyl càng ít và càng khó thực hiện nên DDA tăng

chậm lại. Điều này, phù hợp với nghiên cứu của Hossain and Iqbal (2014), khả năng khử nhóm acetyl trong dung dịch NaOH 60% với DDA đạt cao nhất (81,3%) và trong NaOH 50% là 79,6%, mặc dù độ deacetyl có tăng khi nồng độ dung dịch NaOH tăng cao nhưng rất chậm. Điều này được giải thích dựa trên nhóm acetyl của chitin còn liên kết với các hợp phần khác có trong vỏ tôm nên rất khó để tách ra, do đó cần sử dụng NaOH có nồng độ NaOH cao hơn và nhiệt độ cao hơn (Hargono and Djaeni, 2003). Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng nồng độ NaOH cao để deacetyl hóa chitin thành chitosan như



Abdulkarim *et al.* (2013) đã thực hiện khử gốc acetyl của nguyên liệu với dung dịch NaOH 25 M, ở nhiệt độ 75°C, 20 giờ tỷ lệ nguyên liệu và dung dịch (w/v) là 1/10 cho độ deacetyl đạt là 60,7%. Lê Thị Minh Thủy và Nguyễn Văn Thom (2019) cũng chọn dung dịch NaOH có nồng độ 50% để thực hiện quá trình deacetyl vỏ tôm thẻ tươi và đông lạnh trong 24 giờ ở 65°C với độ deacetyl lần lượt là 89,2% và 90,1%.

Độ hòa tan là một trong những thông số quan trọng phản ánh chất lượng của chitosan, độ hòa tan cao sẽ cho chitosan có chất lượng tốt (Hossain and Iqbal, 2014). Tuy nhiên, độ hòa tan cũng phụ thuộc vào độ deacetyl và được ước tính rằng độ deacetyl hóa phải đạt ít nhất 85% để chitosan độ hòa tan cao (No and Lee, 1995). Kết quả phân tích độ hòa tan của chitosan trong nghiên cứu này có xu hướng biến đổi giống với độ deacetyl theo sự gia tăng nồng độ NaOH. Cụ thể, độ hòa tan của chitosan thấp hơn 50% khi mẫu xử lý trong NaOH có nồng độ 40%. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ sử dụng NaOH lên 50% và 60%, hầu hết các mẫu chitosan đều có độ hòa tan trên 90% ở các mốc thời gian khảo sát (24, 36 và 48 giờ). Đồng thời, độ hòa tan cũng tăng khi tăng thời gian xử lý ở cùng điều kiện nồng độ NaOH. Điều này đã chứng minh có mối tương quan giữa độ deacetyl và độ hòa tan của chitosan hay nói cách khác là việc loại bỏ nhóm acetyl từ chitin sẽ quyết định đến độ hòa tan của chitosan (Brine and Austin, 1981). Theo Alimuniar and Zainuddin (1992) thì chitosan cũng có độ hòa tan rất cao từ 98,0 đến 99,0% khi chitin được tiến hành deacetyl trong dung dịch NaOH 55% với tỷ lệ (w/v) là 1/10, ở 25°C sau 50 giờ và 60 giờ xử lý, riêng mẫu có thời gian deacetyl hóa là 40 giờ có độ hòa tan thấp hơn (60,3%), còn với nghiên cứu của Nessaa *et al.* (2010), cả ba mẫu chitosan từ vỏ tôm có độ hòa tan tốt từ 96,0 đến 97,2%.

Ngoài ra, chất lượng của chitosan cũng phụ thuộc vào độ nhớt của chitosan, độ nhớt của chitosan càng được nâng cao khi việc khử khoáng và khử protein càng triệt để (Toan, 2009). Dựa vào kết quả phân tích từ Bảng 2, độ nhớt có xu hướng tăng dần khi nồng độ NaOH tăng ở giai đoạn từ 24 lên 36 giờ, và thời gian xử lý cao hơn 36 giờ, độ nhớt có xu hướng giảm ở cùng nồng độ. Sự thay đổi này là do cấu trúc bên trong phân tử chitosan bị biến tính bởi nhiệt độ trong thời gian dài, làm cho độ nhớt giảm (Toan và *ctv.*, 2006). Độ nhớt của chitosan trong nghiên cứu này đạt cao nhất trong điều kiện NaOH

có nồng độ 50 và 60% với thời gian xử lý giống nhau là 36 giờ lần lượt là 20,4 và 20,9 mPas. Đối với vỏ tôm tươi và vỏ tôm đông lạnh trong nghiên cứu của Lê Thị Minh Thủy và Nguyễn Văn Thom (2019), hai mẫu này được deacetyl ở nhiệt độ 65°C trong NaOH 50% và kéo dài 24 giờ cho độ nhớt lần lượt là 37,3 và 42,7 mPas. Nhìn chung, độ nhớt của nghiên cứu này tương đối thấp so với các nghiên cứu trước đây, tuy nhiên chitosan có độ nhớt thấp vẫn có lợi thế khi sử dụng trong thực phẩm và dược phẩm công nghiệp (Nessa *et al.*, 2010).

Hiệu suất thu hồi của chitosan được chiết rút từ vỏ tôm thẻ trong nghiên cứu này thay đổi từ 39,7 đến 49,7% tùy thuộc vào nồng độ NaOH sử dụng và thời gian xử lý. Nồng độ NaOH sử dụng càng cao và thời gian xử lý càng dài, hiệu suất thu hồi chitosan có xu hướng giảm. Bên cạnh đó, quá trình deacetyl diễn ra càng triệt để thì sản phẩm chitosan có độ tinh khiết càng cao, tuy nhiên chitosan cũng bị cắt mạch một phần gây tổn thất trong việc thu hồi khi xử lý với hóa chất có nồng độ cao và thời gian dài. Theo báo cáo của Wang *et al.* (2008), sau khi deacetyl hóa, sản lượng chitosan nằm trong khoảng 54,31% và một kết quả khác được công bố bởi Hossain and Iqbal (2014), nghiên cứu khử acetyl với NaOH 60% trong 24 giờ ở 60°C cho hiệu suất thu hồi chitosan đạt 15,4% và thấp hơn so với kết quả nghiên cứu trong thí nghiệm này.

Dựa vào Bảng 2, nồng độ NaOH 50% và thời gian ngâm trong NaOH là 36 giờ được chọn để deacetyl hóa vỏ tôm thẻ chân trắng và tiến hành thí nghiệm tiếp theo.

### 3.3 Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý trong dung dịch acetic acid đến khả năng tan trong nước của chitosan

Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý trong dung dịch acetic acid đến độ hòa tan, độ nhớt và hiệu suất thu hồi của chitosan tan trong nước được trình bày trong Bảng 3.

Chitosan thô sau khi được xử lý trong dung dịch acetic acid đã cải thiện tính tan trong nước của nó. Độ hòa tan của chitosan tan trong nước từ 68,2% và đạt cao nhất ở chế độ xử lý với acetic acid có nồng độ 2% trong 4 giờ là 88,6%. Độ hòa tan có xu hướng tăng dần khi tăng nồng độ acetic acid từ 1 lên 2%, nhưng lại có xu hướng giảm dần khi tăng nồng độ acetic acid lên 3% và càng tăng thời gian xử lý trong acid thì độ hòa tan càng giảm

**Bảng 3: Sự thay đổi các tính chất của chitosan tan trong nước sau khi xử lý trong dung dịch acetic acid**

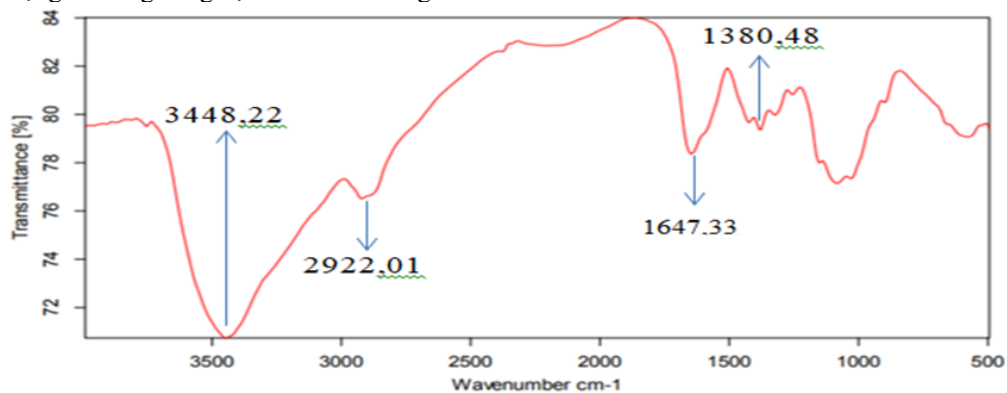
Nồng độ CH <sub>3</sub> COOH (%)	Thời gian (giờ)	Chitosan tan trong nước		
		Độ hòa tan (%)	Hiệu suất thu hồi (%)	Độ nhớt (mPas)
1	2	70,1±0,74 <sup>a</sup>	93,0±0,47 <sup>ab</sup>	1,11±0,06 <sup>a</sup>
	4	80,7±0,54 <sup>b</sup>	99,0±0,43 <sup>e</sup>	1,11±0,02 <sup>a</sup>
	6	68,2±0,26 <sup>a</sup>	94,3±0,47 <sup>bc</sup>	1,09±0,02 <sup>a</sup>
	2	72,6±3,14 <sup>ab</sup>	96,3±0,47 <sup>d</sup>	1,12±0,09 <sup>a</sup>
2	4	88,6±3,63 <sup>c</sup>	98,3±0,45 <sup>e</sup>	1,54±0,07 <sup>c</sup>
	6	71,8±0,62 <sup>a</sup>	91,3±0,94 <sup>a</sup>	1,10±0,03 <sup>a</sup>
	2	73,5±0,59 <sup>ab</sup>	96,0±0,95 <sup>cd</sup>	1,20±0,07 <sup>a</sup>
3	4	72,8±8,21 <sup>ab</sup>	98,3±1,41 <sup>e</sup>	1,10±0,03 <sup>b</sup>
	6	70,9±3,22 <sup>a</sup>	94,0±0,94 <sup>b</sup>	1,12±0,10 <sup>a</sup>

(Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị có những chữ cái (a, b, c) theo sau giống nhau thì không khác biệt. Số liệu được biểu thị dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn với n=3).

Độ nhớt của chitosan tan trong nước của nghiên cứu này có sự thay đổi không đáng kể, dao động từ 1,09 đến 1,54 mPas ở các nồng độ CH<sub>3</sub>COOH và các mốc thời gian khác nhau. Các gốc hydroxyl phản ứng bởi sự phân ly của hydro peroxide, các gốc hydroxyl có thể tấn công các liên kết glycoside của chitosan làm phá vỡ chuỗi (Wang *et al.*, 2005) và hình thành phân tử chitosan tan trong nước với nhiều nhóm hydroxyl nên nó dễ tan trong nước hơn. Đồng thời, sự giảm khối lượng phân tử của chitosan cũng cải thiện khả năng hòa tan trong nước vì độ kết tinh của chitosan giảm. Tuy nhiên, khi các liên kết glycoside của chitosan không được cắt đứt triệt để có thể dẫn đến độ hòa tan thấp (Lu *et al.*, 2004)

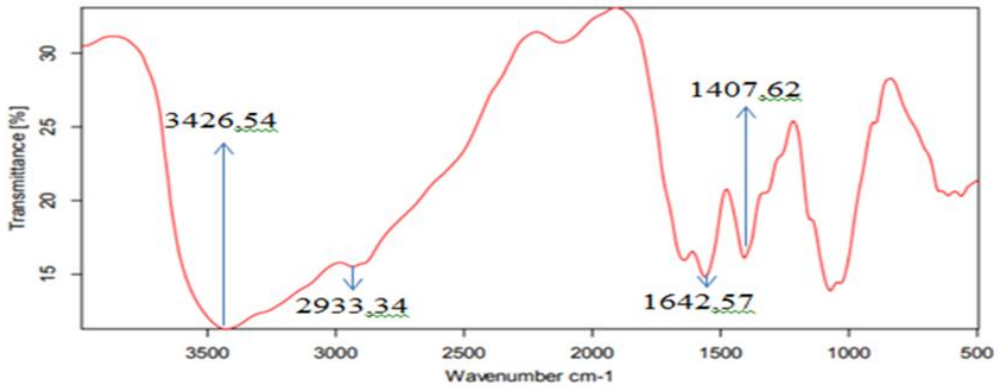
Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất thu hồi có sự biến động khi tăng nồng độ CH<sub>3</sub>COOH cũng như

thời gian xử lý. Với mốc thời gian 4 giờ, đây có thể xem là mốc thời gian thích hợp để xử lý mẫu khi hiệu suất thu hồi sản phẩm đều trên 98% ở cả 3 nồng độ CH<sub>3</sub>COOH lần lượt là 1, 2 và 3%. Hiệu suất thu hồi của nghiên cứu này cao hơn so với nghiên cứu của Du *et al.* (2009), tác giả cho biết điều kiện thích hợp để thu được chitosan hòa tan trong nước cao nhất là sử dụng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> có nồng độ 5,5% trong 3,5 giờ ở nhiệt độ 42,8°C cho hiệu suất thu hồi chitosan tan trong nước là 91,3%. Theo báo cáo của Kamala *et al.* (2013), hiệu suất thu hồi đạt 87,8% khi sử dụng dung dịch acetic acid có nồng độ 2%, tỷ lệ w/v là 1/20 và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nồng độ 4% trong 4 giờ ở 60°C và sản phẩm được sấy ở 60°C.



**Hình 1: Phổ FTIR của chitosan từ vỏ tôm thẻ chân trắng**

Trong đó, Transmittance (%) là hệ số dẫn truyền bức xạ và wavenumber (cm<sup>-1</sup>) là bước sóng



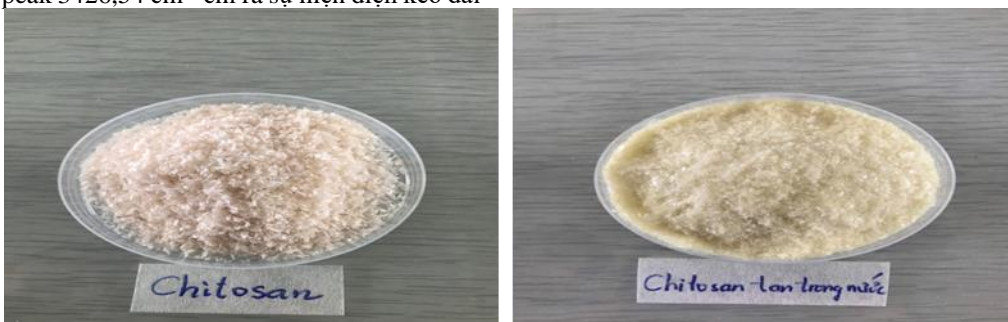
**Hình 2: Phổ FTIR của chitosan tan trong nước từ vỏ tôm thẻ chân trắng**

Sự thay đổi cấu trúc của chitosan thô ban đầu và chitosan tan trong nước được xác nhận bởi quang phổ FTIR (Hình 1 và 2), phổ FTIR của chitosan thô có các peak chuẩn như: peak 3448,22  $\text{cm}^{-1}$  là biểu hiện rõ ràng của nhóm -OH, nhóm -NH thể hiện ở peak 2922,01  $\text{cm}^{-1}$ , ở peak 1647,33 là nhóm -NH<sub>2</sub> và cuối cùng peak 1380,48  $\text{cm}^{-1}$  chỉ ra sự hiện diện của nhóm -PO<sub>3</sub><sup>4-</sup>. So với báo cáo của Jansirani *et al.* (2015), phổ FTIR của chitosan trong nghiên cứu này xác nhận sự hiện diện của -OH và nhóm -NH ở peak 3296,35  $\text{cm}^{-1}$ , nhóm C-H ở peak 1944,25  $\text{cm}^{-1}$ , rung động uốn cong -CH<sub>2</sub> và -CH<sub>3</sub> ở lần lượt 1575,84 và 1421,54  $\text{cm}^{-1}$ , trong khi rung động kéo dài của nhóm -C-N là 1263,37  $\text{cm}^{-1}$  và -CO ở 1155,36  $\text{cm}^{-1}$  đã được quan sát.

Còn đối với chitosan tan trong nước cho thấy đỉnh ở peak 3426,54  $\text{cm}^{-1}$  chỉ ra sự hiện diện kéo dài

của nhóm -OH và peak 2933,34  $\text{cm}^{-1}$  chỉ ra sự hiện diện của -NH, nhóm -NH<sub>2</sub> và PO<sub>3</sub><sup>4-</sup> thể hiện rõ ràng lần lượt ở peak 1642,57 và 1407,62  $\text{cm}^{-1}$ . Kết quả phân tích tương thích với báo cáo của Kamala *et al.* (2013), nghiên cứu cho thấy các đỉnh nổi bật của chitosan tan trong nước đầu tiên là nhóm -OH ở peak 3399  $\text{cm}^{-1}$ , nhóm -NH<sub>2</sub> (Amit II) ở peak 1654 và 1647  $\text{cm}^{-1}$ , -PO<sub>3</sub><sup>4-</sup> ở peak 1078  $\text{cm}^{-1}$  và -NH ra khỏi mặt phẳng uốn cong ở peak 644  $\text{cm}^{-1}$ .

Từ kết quả đo quang phổ FTIR, chitosan tan trong nước có thành phần các nhóm chức năng gần với chitosan từ vỏ tôm thẻ chân trắng. Thông qua các dữ liệu trên, nồng độ CH<sub>3</sub>COOH 2% và thời gian xử lý là 4 giờ được chọn để chuyển đổi chitosan thô thành chitosan tan trong nước và tiến hành thí nghiệm tiếp theo.



**Hình 3: Chitosan thô và chitosan tan trong nước từ vỏ tôm thẻ chân trắng**

**3.4 Hiệu quả khả năng kháng khuẩn của chitosan tan trong nước**

Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn và đường kính vùng vô khuẩn của chitosan thô và

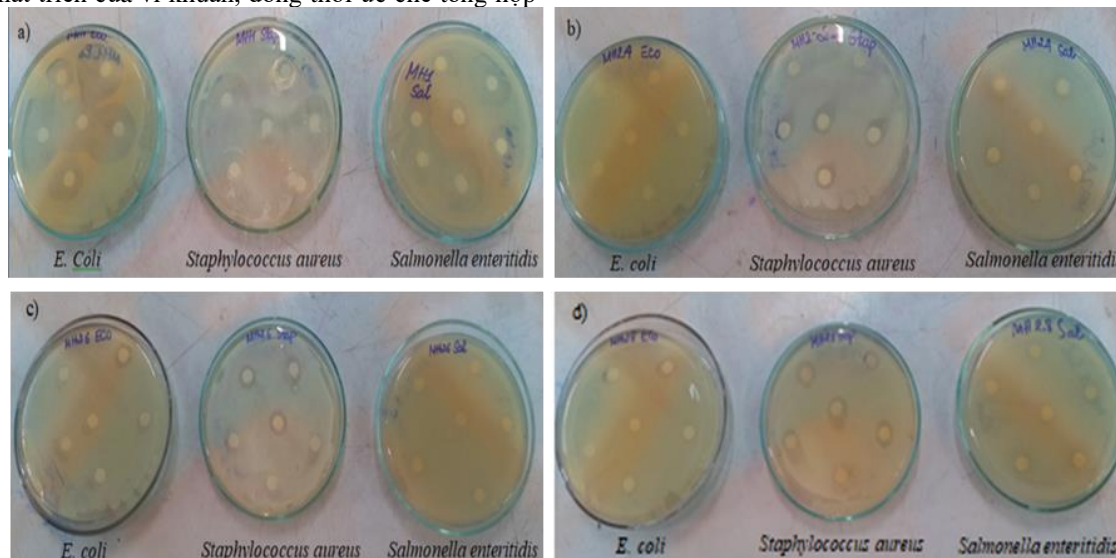
chitosan tan trong nước từ vỏ tôm thẻ chân trắng được thể hiện trong Bảng 4

**Bảng 4: Khả năng kháng khuẩn của chitosan thô và chitosan tan trong nước từ vỏ tôm thẻ chân trắng**

Chủng vi sinh vật	Đường kính vùng vô khuẩn (mm)				Mẫu đối chứng
	Chitosan		Chitosan tan trong nước		
	2%	4%	6%	8%	
<i>Escherichia coli</i>	20,0	9,00	11,0	12,0	Phát triển tốt
<i>Staphylococcus aureus</i>	25,0	11,0	12,0	14,0	Phát triển tốt
<i>Salmonella enteritidis</i>	26,0	9,00	10,0	12,0	Phát triển tốt

Bảng 4 cho thấy chitosan thô từ vỏ tôm thẻ chân trắng ở nồng độ 2% thể hiện khả năng kháng khuẩn tốt thông qua vùng ức chế với 3 chủng vi sinh vật lần lượt là *E. coli* (20 mm), *S. aureus* (25 mm) và *Salmonella* (26 mm). Cơ chế kháng khuẩn của chitosan được giải thích bởi Prabha and Sivakumar (2017), chitosan hình thành một hàng rào bên ngoài, chelat kim loại để bao bọc vi khuẩn và ức chế sự tổng hợp các chất dinh dưỡng thiết yếu đối với sự phát triển của vi khuẩn, đồng thời ức chế tổng hợp

mRNA và protein thông qua sự xâm nhập của chitosan vào nhân của vi sinh vật và lấy đi các ion quan trọng trong tế bào vi khuẩn dẫn đến vi sinh vật sẽ chết. Ngoài ra, sự tương tác tĩnh điện giữa nhóm  $-NH_3^+$  của phân tử chitosan và ion  $Ca^{2+}$  trên bề mặt tế bào vi sinh vật làm thay đổi tính thấm của thành tế bào, gây ra sự mất cân bằng thẩm thấu bên trong và do đó ức chế sự phát triển của vi sinh vật (Hadwiger *et al.*, 1981; Sudarshan *et al.*, 1992).



**Hình 4: Khả năng kháng khuẩn của chitosan thô 2% (a), chitosan tan trong nước 4%, 6% và 8% tương ứng với (b), (c) và (d)**

Trong khi đó, chitosan tan trong nước cũng được thử hoạt tính kháng khuẩn trên cùng đối tượng vi sinh vật ở các nồng độ 2, 4, 6 và 8%, theo đó ở nồng độ 2%, chitosan tan trong nước không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn. Nhưng ở nồng độ 8%, mẫu chitosan tan trong nước thể hiện hoạt tính kháng khuẩn rõ ràng nhất với đường kính vùng vô khuẩn đối với *E. coli*, *S. aureus* và *Salmonella* lần lượt là 12, 14 và 12 mm. Kết quả tương đồng với báo cáo của Kamala *et al.* (2013) khi nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của chitosan thô và chitosan tan trong nước ở 2 nồng độ với 7 chủng vi sinh vật khác nhau (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *S. aureus*, *Strep. pneumoniae*, *K pneumoniae*, and *Salmonella*).

Kamala *et al.* (2013) cũng đã khẳng định cả chitosan thô và chitosan tan trong nước đều cho thấy hoạt tính ức chế cao đối với *S. aureus*, so với các chủng vi sinh vật khác với vùng vô khuẩn của chitosan tan trong nước đối với chủng vi khuẩn *S. aureus* là 18,3 mm với nồng độ chitosan 1 mg/ mL. Li *et al.* (2007) cũng đã khẳng định rằng chitosan nói chung có hoạt tính ức chế *S. aureus* mạnh so với *E.coli*. Kết quả nghiên cứu của Du *et al.* (2009) cũng phù hợp với nghiên cứu này khi tác giả giải thích rằng thành tế bào của *S. aureus* là lớp peptidoglycan có nhiều lỗ nhỏ trên bề mặt. Bên cạnh đó thành tế bào của *S. aureus* có cấu trúc xốp nên các hợp chất có trong tế bào vi khuẩn dễ bị tác động bởi chitosan và ức chế



sinh trưởng. Đây cũng chính là nguyên nhân đường kính vùng kháng khuẩn của chitosan tan trong nước với *S. aureus* là lớn nhất. Qin *et al.* (2006) đã kết luận chitosan hòa tan trong nước có tác dụng kháng khuẩn nhưng không đáng kể. Các phân tử chitosan sẽ hình thành một lớp không thấm xung quanh tế bào và tham gia thủy phân thành peptidoglycans làm mất tính ổn định của thành tế bào, gây ra hiện tượng rò rỉ các chất điện giải nội bào và cuối cùng là chết tế bào (Devlieghere *et al.*, 2004). Tuy nhiên, lớp màng của chitosan tan trong nước không bền và dễ bị hòa tan trong môi trường có sự hiện diện của nước nên khả năng kháng khuẩn có phần hạn chế vì độ pH trong tế bào vi khuẩn là trung tính nên lớp màng trên bề mặt tế bào vi khuẩn dễ bị phân hủy và các quá trình sinh lý của vi khuẩn hoạt động bình thường.

#### 4 KẾT LUẬN

Chitin từ vỏ tôm thẻ chân trắng được deacetyl hóa bằng dung dịch NaOH nồng độ 50% trong vòng 36 giờ để thu hồi chitosan thô rồi tiếp tục hòa tan trong dung dịch acetic acid 2%, cùng với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4% trong 4 giờ thu được sản phẩm chitosan tan trong nước có độ hòa tan là 88,6%. Mẫu chitosan tan trong nước vẫn mang các đặc tính sinh học nổi bật giống như chitosan thô, đặc biệt là khả năng kháng khuẩn, trong 3 chủng vi sinh vật *E. coli*, *S. aureus* và *Salmonella* thì chitosan tan trong nước có hoạt tính ức chế đối với *S. aureus* là tốt nhất. Đồng thời, với tính dễ tan trong nước đã góp phần nâng cao tính ứng dụng của chitosan tan trong nước trong nhiều lĩnh vực khác nhau đặc biệt là trong lĩnh vực công nghệ thực phẩm.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện trên khuôn khổ đề tài nghiên cứu khoa học sinh viên (TSV2019-122) của Trường Đại học Cần Thơ.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abdulkarim, A., Isa, M. T., Abdulsalam, S., Muhammad, A. J. and Ameh, A. O., 2013. Extraction and characterisation of chitin and chitosan from mussel shell. *Civil and Environmental Research*. 3(2):108-114.

Alimuniar, A and Zainuddin, R., 1992. An economical technique for producing chitosan. *In: Advances in Chitin and Chitosan*. Brine, C. J., Sanford, P. A. and Zikakis, J. P. (Eds), Elsevier Applied Science, Essex, UK, pp. 627.

Allwin, S. I. J., Jeyasanta, K. I. and Patterson J., 2015. Extraction of chitosan from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste and examination of its bioactive potentials. *Advances in Biological Research*. 9(6): 389-396.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2000. Official methods of analysis of AOAC International, 17th Edition, Horwitz W, Volume II.

Benavente, M., Arias, S., Moreno, L. and Martínez, J., 2015. Production of glucosamine hydrochloride from crustacean shell. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 3(1): 20-26.

Brine, C. J. and Austin, P. R., 1981. Chitin variability with species and method of preparation. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 69B: 283-286.

Devlieghere, F., Vermeulen, A. and Debevere, J., 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*. 21(6): 703-714

Domard, A. and Rinaudo, M., 1983. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 5: 49-50.

Du, Y., Zhao, Y., Dai, S. and Yang, B., 2009. Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10(1): 103-107.

Ehrlich, H., Koutsoukos, P. G., Demadis, K. D. and Pokrovsky, O. S., 2009. Principles of demineralization: Modern strategies for the isolation of organic frameworks Part II. Decalcification. *Micron*. 40: 169-193.

Fernandes, S. C. M., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Desbrières, J., Gandini, A. and Neto, C. P., 2010. Production of coated papers with improved properties by using a water-soluble chitosan derivative. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 49(14): 6432-6438.

Hadwiger, L. A., Beckman, J. M. and Adams, M. J., 1981. Localization of fungal components in the pea-*Fusarium* interaction detected immunochemically with anti-chitosan and anti-fungal cell wall antisera. *Plant Physiology*. 67(1):170-175.

Hargono, H. and Djaeni, M., 2003. Utilization of chitosan prepared from shrimp shell as fat diluent. *Journal of Coastal Development*. 7(1): 31-37.

Hemung, B. O., 2013. Properties of Tilapia Bone Powder and Its Calcium Bioavailability Based on Transglutaminase Assay. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioninformatics*. 3(4): 306-309.

Hossain, M. S and Iqbal, A., 2014. Production and characterization of chitosan from shrimp waste. *Journal Bangladesh Agricultural University*. 12(1): 153-160.

- Jansirani, D., Jasmine Pretty, A. and Minu, M., 2015. Extraction and Characterization of Chitosan from white leg shrimp (*Litopenous vannamei*) and its Applications on Match Industry Waste Water. *Indian Journal of Engineering, Science and Technology*. 9: 54-58.
- Kamala, K., Sivaperumal, P. and Rajaram, R., 2013. Extraction and characterization of water soluble chitosan from parapeneopsis stylifera shrimp shell waste and its antibacterial activity. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 3(4): 1-8.
- Kim, K. W., Min, B. J., Kim, Y. T., Kimmel, R. M., Cooksey, K. and Park, S. I., 2011. Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. *LWT-Food Science and Technology*. 44(2): 565-569.
- Kim, S. K., Byun, H. G. and Lee, E. H., 1994. Optimum Extraction Conditions of Gelatin from Fish Skins and its Physical Properties. *Journal of Korean Industrial and Engineering Chemistry*. 5(3): 547-559.
- Lê Thị Minh Thủy và Nguyễn Văn Thơm, 2019. Ảnh Hưởng Của Thời Gian Bảo Quản Nguyên Liệu Đến Chất Lượng Của Chitosan Từ Vỏ Tôm Thẻ Chân Trắng (*Litopenaeus Vannamei*). *Tạp Chí Khoa Học & Công Nghệ Nông Nghiệp*. 3(2): 1227-1234.
- Lê Thị Minh Thủy, Nguyễn Văn Thơm và Trần Thanh Trúc, 2019. Ảnh hưởng của phương pháp loại khoáng và protein đến chất lượng chitosan từ nang mực nang (*Sepia esculenta*). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*. 358: 43-48.
- Li, Y., Chen, X. G., Liu, N., Liu, C. S., Liu, C. G., Meng, X. H., Yu, L. J. and Kenedy, J. F., 2007. Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. *Carbohydrate Polymers*. 67(2): 227-232.
- Lu, S. J., Song, X. F., Cao, D. Y., Chen, Y. P. and Yao, K. D. J., 2004. Preparation of water-soluble chitosan. *Applied Polymer Science*. 91(6): 3497-3503
- Ma, G., Yang, D., Zhou, Y., Xiao, M., Kennedy, J. F. and Nie, J., 2008. Preparation and characterization of water-soluble N-alkylated chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 74(1): 121-126.
- Nessaa, F., Masum, S. M., Asaduzzaman, M., Roy, S., Hossain, M. and Jahan, M., 2010. A Process for the Preparation of Chitin and Chitosan from Prawn Shell Waste. *Bangladesh Journal Science*. 45(4): 323-330
- No, H. K., Lee, M. Y., 1995. Isolation of Chitin from Crab Shell Waste. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 24(1):105-113.
- Prabha, A. R. and Sivakumar, K., 2017. Antimicrobial Activity of Chitosan Extracted from Prawn Shell. *Indian Journal of Applied Microbiology*. 20(1): 1-7.
- Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J. and Du, Y., 2006. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*. 63(3): 367-374.
- Sachindra, N. M., Bhaskar, N. and Mahendrakar, N. S., 2006. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*. 26(10): 1092-1098.
- Sudarshan, N. R., Hoover, D. G. and Knorr, D., 1992. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*. 6(3): 257-272.
- Tharanathan, R. N. and Kittur, F., 2003. Chitin-the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science*. 43(1): 61-87.
- Toan, N. V., 2009. Production of Chitin and Chitosan from Partially Autolyzed Shrimp Shell Materials. *The Open Biomaterials Journal*. 1: 21-24.
- Toan, N. V., C. H. Ng., Aye, K. N., Trang, T. S. and Stevens, W. F., 2006. Production of high-quality chitin and chitosan from preconditioned shrimp shells. *Chemical Technology Biotechnology*. 81(7): 1113-1118.
- Trần Thị Luyến, 2006. Sản xuất các chế phẩm kỹ thuật và y dược từ phế liệu thủy sản: Nhà xuất bản Nông Nghiệp. Thành phố Hồ Chí Minh.
- Trang Sĩ Trung, Trần Thị Luyến, Nguyễn Anh Tuấn, Nguyễn Văn Hòa và Nguyễn Thị Hằng Phương, 2018. Giáo trình chitin-chitosan từ phế liệu thủy sản và ứng dụng. Tái bản lần 1. Nhà xuất bản Nông Nghiệp. 112 trang.
- VASEP (Vietnam Association of Seafood Exporters and Producers), 2019. Xuất khẩu tôm tiếp tục chững trong tháng 8 và 9. Ngày truy cập 24/10/2019, địa chỉ: [http://vasep.com.vn/Tin-Tuc/1203\\_58127/Xuat-khau-tom-tiep-tuc-chung-trong-thang-8-va-9.htm](http://vasep.com.vn/Tin-Tuc/1203_58127/Xuat-khau-tom-tiep-tuc-chung-trong-thang-8-va-9.htm).
- Wang, H., Zhao, Y., Yang, M. M., Jiang, B. Y. M. and Rao, G. H., 2008. Identification of polyphenols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chemistry*. 107(4): 1399-1406.
- Wang, S. M., Huang, Q. Z. and Wang, Q. S., 2005. Study on the synergetic degradation of chitosan with ultraviolet light and hydrogen peroxide. *Carbohydrate Research*. 340(6): 1143-1147.