

HIỆU QUẢ THU NHẬN GLUCOSAMINE HYDROCHLORUA TỪ VỎ CUA BIỂN (*Scylla paramamosain*), VỎ GHE (*Portulus pelagicus*) VÀ VỎ TÔM TÍT (*Oratosquilla interrupta*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP HÓA SINH

Lê Thị Minh Thủy^{1*}, Nguyễn Văn Thom¹

TÓM TẮT

Chiết xuất glucosamine hydrochlorua từ vỏ của 3 loài động vật giáp xác là vỏ cua biển, vỏ ghe và vỏ tôm tit được thực hiện thông qua các bước: khử khoáng và khử protein để thu chitin, sau đó chitin được thủy phân để thu nhận glucosamine hydrochlorua. Kết quả cho thấy, hàm lượng khoáng còn lại trong cả 3 loại nguyên liệu này đều thấp hơn 1% khi được xử lý trong dung dịch HCl 4% (vỏ tôm tit) và HCl 6% (vỏ cua biển và vỏ ghe). Điều kiện khử protein bằng enzyme alcalase thích hợp cho vỏ tôm tit là 6 giờ, nồng độ enzyme 0,1%, và nồng độ Alcalase 0,3%, 4 giờ được áp dụng cho 2 loại nguyên liệu còn lại. Chitin từ 3 loại này có cùng chế độ thủy phân (HCl 10M, 6 giờ) để chuyển đổi thành glucosamine hydrochlorua, độ hòa tan đều trên 80%, hiệu suất thu hồi glucosamine hydrochlorua đạt cao nhất 53,88% đối với chitin từ vỏ tôm tit và 52,67% từ chitin vỏ cua biển, vỏ ghe cho hiệu suất thu hồi thấp nhất 49,63%. Dựa vào kết quả phân tích phổ FTIR, cấu trúc glucosamine hydrochlorua được tinh chế từ vỏ cua biển, vỏ ghe và vỏ tôm tit tương tự như mẫu thương mại. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khả năng tận dụng vỏ tôm tit, vỏ cua và vỏ ghe làm nguồn nguyên liệu phù hợp cho sản xuất glucosamine hydrochlorua.

Từ khóa: *Enzyme alcalase, phổ FTIR, glucosamine, hiệu suất thu hồi, vỏ giáp xác.*

1. GIỚI THIỆU

Glucosamine được xem là một hợp chất sinh học đa chức năng, được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực y học do có tác dụng trong điều trị các bệnh liên quan đến xương khớp (Haupt *et al.*, 1999), kháng khuẩn, kháng viêm và chống ung thư (Nagaoka *et al.*, 2011; Sibi *et al.*, 2013), những lý do này đã làm gia tăng nhu cầu tiêu thụ glucosamine một cách rộng rãi (White và Stegemann, 2001). Glucosamine là một monosaccharide được chiết xuất từ quá trình thủy phân chitin hoặc chitosan và vỏ của các loài động vật giáp xác là một trong những nguồn nguyên liệu lý tưởng để chiết xuất những thành phần này (Kumari *et al.*, 2017). Vỏ của động vật giáp xác chiếm tỉ lệ khoảng 50% khối lượng cơ thể, trong đó hàm lượng chitin chiếm khoảng 20%-30% (Bolat *et al.*, 2010). Quá trình chiết xuất chitin thông thường sẽ trải qua 2 bước, xử lý acid để khử khoáng và xử lý kiềm để khử thành phần protein. Tuy nhiên, nhận thức về phương thức sản xuất thân thiện môi trường ngày càng được nâng cao, do đó phương pháp sử dụng enzyme để xử lý khử protein trong nguyên liệu thay thế hóa chất đã

được đề xuất (De Holanda và Netto, 2006; Jegannathan và Nielsen, 2013; Younes và Rinaudo, 2015; Thuy *et al.*, 2021). Bên cạnh hai mặt hàng thủy sản chủ lực của Việt Nam là tôm và cá tra, một số đối tượng thủy sản khác cũng có sản lượng nuôi và nguồn lợi khai thác cao như cua biển, ghe và tôm tit (Nguyễn Văn Thường và Phạm Minh Đức, 2014), các đánh giá về khả năng thu nhận chitin và các dẫn xuất của nó từ nguồn phụ phẩm vỏ của ba loài này còn bị giới hạn. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu là chiết xuất glucosamine từ vỏ cua biển, vỏ ghe và vỏ tôm tit, góp phần đa dạng các nguồn tinh chế glucosamine và khai thác tối đa các giá trị tiềm năng của nguồn phụ phẩm này.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chuẩn bị mẫu

Nguyên liệu vỏ cua biển được thu nhận trên địa bàn thị xã Giá Rai, Bạc Liêu, vỏ ghe được thu mua tại các cơ sở chế biến thịt ghe tại thị trấn Sông Đốc, Trần Văn Thời, Cà Mau và nguyên liệu vỏ tôm tit được thu mua từ Hòn Chông, Kiên Giang. Các nguyên liệu này được bảo quản bằng nước đá, vận chuyển nhanh chóng về phòng thí nghiệm Bộ môn Chế biến thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ và tiến hành các bước xử lý. Vỏ cua biển, vỏ ghe và vỏ tôm tit được loại bỏ các phần không cần

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Email: ltmthuy@ctu.edu.vn

thiết (thịt, gạch, chân, ngà) và rửa sạch, phơi khô (ẩm độ khoảng 20%), cắt nhỏ vỏ cua biển, vỏ ghẹ có kích thước 2 x 3 cm và bảo quản các loại vỏ đã xử lý này trong tủ đông ($-20 \pm 2^\circ\text{C}$).

2.2. Hóa chất

Các hóa chất được sử dụng chủ yếu trong các thí nghiệm là enzyme alcalase 2.5L (Novozyme, Đan Mạch), nhiệt độ hoạt động thích hợp từ $50-70^\circ\text{C}$, HCl (Trung Quốc) và một số hóa chất thường dùng trong phòng thí nghiệm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ HCl đến khả năng khử khoáng trong vỏ cua biển, vỏ ghẹ và vỏ tôm tít

Vỏ từ 3 loài động vật giáp xác (vỏ cua biển, vỏ ghẹ và vỏ tôm tít) được rửa đông và tiến hành thí nghiệm khử khoáng, sử dụng dung dịch HCl để xử lý nguyên liệu theo mô tả của Seghir và Benhamza (2017) với một vài điều chỉnh. Dung dịch HCl với ba nồng độ khác nhau là 2%, 4% và 6% được dùng để khảo sát mức độ khử khoáng có trong ba nguồn nguyên liệu vỏ này ở điều kiện nhiệt độ phòng, thời gian xử lý được cố định trong 24 giờ, tỷ lệ vỏ: dung dịch HCl (w : v) là 1 : 10. Kết thúc quá trình khử khoáng, vỏ cua biển, vỏ ghẹ và vỏ tôm tít được rửa sạch dưới vòi nước chảy cho đến khi đạt pH trung tính và phơi ráo. Các loại vỏ đã khử khoáng này được phân tích chỉ tiêu hàm lượng khoáng còn lại trong vỏ để xác định nồng độ HCl thích hợp. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, khối lượng mỗi mẫu là 250 g.

2.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme alcalase và thời gian thủy phân đến hiệu quả khử protein trong vỏ cua biển, vỏ ghẹ và vỏ tôm tít

Các nguyên liệu vỏ cua biển, vỏ ghẹ và vỏ tôm tít sau khi khử khoáng tiếp tục được xử lý bằng enzyme alcalase để loại protein. Nồng độ enzyme alcalase là 0,1% và 0,3% (v/w) so với từng loại nguyên liệu, thời gian thủy phân lần lượt là 4 và 6 giờ ở nhiệt độ khoảng 50°C - 55°C , bổ sung thêm 10% nước cất so với khối lượng vỏ nhằm tạo thuận lợi cho enzyme hoạt động, thường xuyên khuấy đảo hỗn hợp (30 phút/ lần) để quá trình thủy phân xảy ra đồng đều. Sau đó, hỗn hợp được gia nhiệt ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút để bất hoạt enzyme và rửa sạch, phơi ráo. Nguyên liệu đã xử lý enzyme được kiểm tra hàm lượng protein còn lại để chọn chế độ thủy phân thích hợp và làm cơ sở cho thí nghiệm tiếp theo. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, khối lượng mỗi mẫu là 250 g.

2.3.3. Khảo sát điều kiện thủy phân chuyển đổi chitin từ 3 loại vỏ giáp xác thành glucosamine hydrochlorua

Vỏ cua biển, vỏ ghẹ và vỏ tôm tít (đã khử khoáng và khử protein) được sấy ở nhiệt độ 60°C khoảng 4 giờ để thu nhận chitin thô (ẩm độ từ 7% -10%). Tiến hành thủy phân chitin trong dung dịch HCl theo phương pháp của Mojarrad *et al.* (2007) với một vài sửa đổi, hai mốc thời gian và hai nồng độ HCl khác nhau lần lượt là 4 giờ và 6 giờ, 10M và 12M được bố trí để chuyển chitin thành glucosamine hydrochlorua. Tỷ lệ chitin: dung dịch (w : v) là 1 : 20, nhiệt độ thủy phân $85 \pm 1^\circ\text{C}$, sử dụng máy khuấy từ để khuấy đều hỗn hợp. Hỗn hợp dung dịch sau thủy phân được lọc để loại bỏ các tạp chất không tan và thu dung dịch lọc. Thêm dung dịch ethanol (95%) vào dung dịch lọc và khuấy đều với tỷ lệ 1:15 (tức 1g chitin ban đầu tương ứng với 15 mL ethanol). Bước tiếp theo, dung dịch được ủ trong thời gian 15 ngày ở nhiệt độ $5 \pm 1^\circ\text{C}$ để tạo kết tủa. Sau 15 ngày, dung dịch được lọc lại để thu hồi phần kết tủa và rửa lại phần kết tủa bằng ethanol (95%). Tiến hành sấy lượng kết tủa này ở nhiệt độ 60°C khoảng 9 giờ để thu nhận glucosamine hydrochlorua (độ ẩm khoảng 4%-5% theo Li *et al.*, 1992). Sản phẩm được kiểm tra độ hòa tan, hiệu suất thu hồi và mẫu có chế độ thủy phân thích hợp được phân tích phổ FTIR. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, khối lượng mỗi mẫu là 250 g.

2.4. Phương pháp phân tích

Các chỉ tiêu về thành phần cấu tạo của nguyên liệu vỏ cua biển, vỏ ghẹ và vỏ tôm tít và chất lượng sản phẩm glucosamine hydrochlorua tương ứng được xác định bằng các phương pháp:

Kiểm tra hàm lượng ẩm bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi (AOAC, 2000 số 934.01), phân tích hàm lượng khoáng bằng phương pháp nung mẫu ở nhiệt độ 600°C và tính khối lượng mẫu còn lại (AOAC, 2000 số 942.05), phân tích hàm lượng protein bằng phương pháp Kjeldahl (AOAC, 2000 số 954.01).

Xác định cấu trúc glucosamine hydrochlorua từ 3 loại vỏ giáp xác bằng phổ FTIR với bước sóng $4000-400\text{ cm}^{-1}$ bằng phần mềm Omnic 6.0 (Thermo-Nicolet, Madison, Wisconsin) theo Bruker Optics ALPHA.

Xác định độ hòa tan bằng phương pháp lọc theo mô tả của Hemung (2013) bởi công thức:

$$T = \frac{D-C}{D} \times 100.$$

Trong đó: T là độ hòa tan của

glucosamine hydrochlorua; D (g) là khối lượng glucosamine hydrochlorua ban đầu; C (g) là khối lượng glucosamine hydrochlorua không tan. Khối lượng glucosamine hydrochlorua không tan được tính như sau: glucosamine hydrochlorua hòa tan với 10 mL nước cất và khuấy 15 phút, tiến hành lọc bằng giấy lọc, những phần không tan được giữ lại trên giấy lọc, sấy giấy lọc ở 105°C cho đến khi khối lượng giấy lọc không đổi, từ đó tính được lượng glucosamine hydrochlorua không tan.

Xác định hiệu suất thu hồi (H) bằng phương pháp cân: $H (\%) = Y/X$, cân khối lượng ban đầu của chitin X (g) và khối lượng glucosamine hydrochlorua Y (g).

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý trên phần mềm Microsoft Excel 2013 để tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Xử lý thống kê ANOVA với mức ý nghĩa 95% bằng phần mềm SPSS 16.0, so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức bằng phương pháp Duncan.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần hóa học

Kết quả phân tích thành phần hóa học của ba loại vỏ giáp xác là vỏ cua biển, vỏ ghẹ và vỏ tôm tít thông qua các chỉ tiêu ẩm độ, khoáng và protein được trình bày ở bảng 1. Thành phần có tỉ lệ cao nhất, chiếm khoảng 50% trong cấu tạo của cả ba loại nguyên liệu này là chất khoáng. Cụ thể, hàm lượng khoáng có trong vỏ cua biển chiếm cao nhất là 55,84%, vỏ ghẹ là 53,24% và vỏ tôm tít chiếm tỉ lệ khoáng thấp nhất (49,74%).

Bảng 1. Thành phần hóa học của vỏ cua biển, vỏ ghẹ và vỏ tôm tít

Hàm lượng (%)	Vỏ cua biển	Vỏ ghẹ	Vỏ tôm tít
	19,92±0,02	18,48±0,42	21,12±0,39
Khoáng ^a	55,84±0,39	53,24±0,28	49,74±0,12
Protein ^a	22,32±0,21	18,17±1,31	18,77±0,09

Ghi chú: Số liệu thống kê được mô tả dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n=3). ^aDựa trên cân bản khô.

Thành phần phổ biến thứ hai sau chất khoáng là protein, vỏ cua biển, vỏ ghẹ và vỏ tôm tít có hàm lượng protein dao động trong khoảng 18,17% - 22,32%. Các số liệu này tương tự như công bố của Hajji *et al.* (2014) về thành phần vỏ tôm (*Penaeus kerathurus*) và vỏ cua (*Carcinus mediterraneus*), hàm lượng chất khoáng lần lượt là 48,8% và 59,8% và protein chiếm khoảng 13%. Các thành phần hóa học

của nguyên liệu thủy sản khác nhau và phụ thuộc vào giống loài, mùa vụ (Cho *et al.*, 1998). Để sản xuất chitin có độ tinh khiết cao hay chất lượng tốt, làm chất nền để tinh chế các hợp chất sinh học khác, điển hình là chitosan hay glucosamine thì nguồn nguyên liệu ban đầu cần được xử lý để loại bỏ các chất khoáng và protein (Synowiecki và Al-Khateeb, 2000; Tolaimate *et al.*, 2003).

3.2. Hiệu quả khử khoáng trong vỏ cua biển, vỏ ghẹ và vỏ tôm tít bằng dung dịch HCl

Một trong những nhân tố xác định chất lượng của chitin là hàm lượng khoáng (Tolaimate *et al.*, 2003). Hơn nữa, chitin rất nhạy cảm với acid và dễ dàng bị cắt mạch polymer, deacetyl hóa và phân hủy nhiệt làm thay đổi các tính chất hóa lý (Percot *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2016) khi điều kiện xử lý là acid có nồng độ cao. Mức độ khử khoáng trong vỏ cua biển, vỏ ghẹ và vỏ tôm tít sau khi được xử lý trong acid HCl ở các nồng độ khác nhau được ghi nhận ở bảng 2.

Bảng 2. Sự thay đổi hàm lượng khoáng (%) của vỏ cua biển, vỏ ghẹ và vỏ tôm tít (cân bản khô)

Nồng độ HCl (%)	Vỏ cua biển	Vỏ ghẹ	Vỏ tôm tít
2	19,46±0,42 ^c	12,04±0,97 ^c	10,93±0,19 ^b
4	7,91±1,26 ^b	2,86±0,01 ^b	0,48±0,09 ^a
6	0,54±0,11 ^a	0,45±0,05 ^a	0,23±0,07 ^a

Ghi chú: những chữ cái a, b, c khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn, n=3.

Tất cả các nguyên liệu có hàm lượng khoáng giảm khi xử lý bằng dung dịch HCl có nồng độ tăng dần (2%-6%) ở các mức khảo sát. Thành phần chất khoáng (tồn tại chủ yếu ở dạng muối calcium) có trong nguyên liệu sẽ tác dụng với dung dịch HCl, phản ứng xảy ra nhanh và hiệu quả khi nồng độ acid cao, tạo thành các muối hòa tan và dễ dàng tách ra khỏi nguyên liệu trong công đoạn rửa, vì thế tỉ lệ chất khoáng trong nguyên liệu giảm (Trần Thị Luyện, 2006; Ahmad *et al.*, 2016).

Hàm lượng khoáng còn lại trong vỏ tôm tít là 0,48% tương ứng với điều kiện xử lý trong dung dịch HCl có nồng độ 4% và khác biệt nhưng không có ý nghĩa thống kê so với xử lý HCl 6% (0,23%). Nhiều nghiên cứu cũng đồng ý rằng, nồng độ HCl 4% là thích hợp để xử lý loại khoáng cho vỏ tôm sú (Prameela *et al.*, 2010), vỏ tôm thẻ chân trắng (Phạm Thị Đan Phượng và Trang Sĩ Trung, 2012) và nhiều

loại vỏ tôm khác (Gildberg và Stenberg, 2001; Seghir và Benhamza, 2017). Đối với vỏ cua biển và vỏ ghe, tốc độ giảm khoáng chậm hơn so với vỏ tôm tít có thể là do tính chất nguyên liệu vỏ khác nhau. Vỏ cua biển và vỏ ghe đều có hàm lượng khoáng trên 2% (lần lượt 2,86% và 7,91%) khi nồng độ HCl đạt 4% và thấp hơn 1% ở nồng độ xử lý 6% và tương tự như kết quả của Sugiyanti *et al.* (2018). Theo đề xuất của Rao *et al.* (2007), yêu cầu đối với chất lượng chitin để đạt tiêu chuẩn công nghiệp và thương mại hóa khi chitin có hàm lượng khoáng dưới 1%.

Do đó, để đáp ứng yêu cầu về tỉ lệ khoáng trong nguyên liệu để sản xuất chitin và tiết kiệm hóa chất, nồng độ HCl thích hợp cho xử lý khử khoáng vỏ tôm tít là 4% và nồng độ 6% được áp dụng cho quá trình xử lý vỏ cua biển và vỏ ghe.

3.3. Điều kiện thủy phân đến mức độ khử protein trong vỏ cua biển, vỏ ghe và vỏ tôm tít

Xử lý nguyên liệu vỏ giáp xác bằng enzyme để khử thành phần protein được đánh giá là phương pháp tốt để thu chitin có chất lượng cao hơn phương pháp hóa học, do hạn chế sự thủy phân và acetyl hóa chuỗi polysaccharide (Vázquez *et al.*, 2013).

Bảng 3. Sự thay đổi hàm lượng protein (%) của vỏ cua biển, vỏ ghe và vỏ tôm tít (căn bản khô)

Nồng độ alcalase (%) - Thời gian (giờ)	Vỏ cua biển	Vỏ ghe	Vỏ tôm tít
0,1 - 4	9,36±0,44 ^c	8,44±0,45 ^c	6,82±0,42 ^b
0,1 - 6	7,74±0,31 ^b	7,65±0,58 ^c	4,66±0,28 ^a
0,3 - 4	5,37±0,32 ^a	5,44±0,47 ^a	4,41±0,30 ^a
0,3 - 6	5,21±0,37 ^a	5,33±0,10 ^a	4,22±0,11 ^a

Ghi chú: những chữ cái a, b, c khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn, $n=3$

Dựa vào kết quả ở bảng 3 cho thấy, tỉ lệ protein còn lại trong cả ba loại vỏ cua biển, vỏ ghe và vỏ tôm tít giảm dần khi nồng độ enzyme alcalase tăng và thời gian thủy phân tăng. Bởi vì enzyme sẽ tác động trực tiếp vào phân tử protein tại các vị trí liên kết peptide, làm cắt mạch protein thành các chuỗi peptide ngắn hơn và có thể giải phóng các amino acid tự do nếu điều kiện thủy phân cao (Nguyễn Đức Lượng, 2004) và các hợp chất này mất khả năng liên kết với các thành phần khác nên tan vào nước rửa dễ dàng.

Hàm lượng protein vỏ tôm tít giảm còn 4,66% ở điều kiện thủy phân với nồng độ enzyme alcalase

0,1%, 6 giờ và giảm không đáng kể khi tiếp tục tăng nồng độ enzyme alcalase lên 0,3%. Nghiên cứu của Thuy *et al.* (2021) cũng có kết quả tương tự, thành phần protein của chitin vỏ tôm sú và tôm thẻ chân trắng lần lượt là 4,29% và 4,12% khi sử dụng alcalase để khử protein và chiếm 4,45% của chitin trong báo cáo của Synowiecki và Al-Khateeb (2000). Trong khi đó, vỏ cua biển và vỏ ghe cần xử lý ở nồng độ enzyme cao hơn (0,3%) để khử protein, tỉ lệ protein còn lại lần lượt là 5,37% và 5,44% với thời gian thủy phân 4 giờ, khi thời gian tăng lên 6 giờ ở cùng nồng độ enzyme 0,3% thì hiệu quả khử protein tương tự như 4 giờ. Các kết quả này phù hợp với nhận định của Younes và Rinaudo (2015), hiệu quả của quá trình khử protein bị hạn chế do sự hiện diện của các chuỗi peptide ngắn còn lại và các amino acid (khoảng 5-10% protein) liên kết chặt chẽ với các phân tử chitin nên không thể loại hết protein trong nguyên liệu, đồng thời trong thành phần chitin chứa khoảng 5% protein là đạt yêu cầu cho nhiều ứng dụng. Như vậy, nồng độ enzyme alcalase và thời gian thủy phân thích hợp để khử protein cho vỏ tôm tít là 0,1% và 6 giờ, còn đối với xử lý vỏ cua biển và vỏ ghe là alcalase 0,3% và thời gian thủy phân trong 4 giờ.

3.3. Hiệu quả chiết xuất glucosamine hydrochlorua

Bảng 4. Hiệu suất thu hồi và độ hòa tan của glucosamine hydrochlorua

Nồng độ HCl (M) - Thời gian (giờ)	Hiệu suất thu hồi (%)		
	Vỏ cua biển	Vỏ ghe	Vỏ tôm tít
10 - 4	45,71±0,63 ^a	42,82±1,81 ^a	43,14±0,98 ^a
10 - 6	52,67±0,25 ^b	49,63±0,50 ^c	53,88±0,84 ^c
12 - 4	47,65±2,08 ^a	46,68±0,87 ^b	49,40±1,25 ^b
12 - 6	53,13±1,57 ^b	50,35±1,08 ^c	53,23±1,57 ^c
Độ hòa tan (%)			
10 - 4	81,30±1,19 ^a	80,78±1,01 ^a	87,44±0,22 ^a
10 - 6	83,11±0,42 ^{ab}	82,62±0,02 ^a	87,36±0,38 ^a
12 - 4	85,09±0,01 ^{bc}	84,18±0,60 ^{bc}	89,01±0,80 ^b
12 - 6	86,27±0,85 ^c	84,31±0,09 ^c	86,62±0,29 ^a

Ghi chú: những chữ cái a, b, c khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn, $n=3$

Hiệu suất thu hồi và độ hòa tan của glucosamine hydrochlorua từ chitin của 3 loại vỏ giáp xác (vỏ cua

biển, vỏ gẹ và vỏ tôm tít) được thể hiện ở bảng 4. Trong cùng một nồng độ HCl, thời gian thủy phân tăng từ 4 giờ - 6 giờ thì hiệu suất thu hồi glucosamine hydrochlorua từ chitin của vỏ cua biển, vỏ gẹ và vỏ tôm tít đều tăng mạnh. Mức độ thủy phân chitin thành glucosamine hydrochlorua càng cao khi nồng độ HCl cao và thời gian thủy phân dài (Trần Thái Hòa, 2005; Mojarrad *et al.*, 2007).

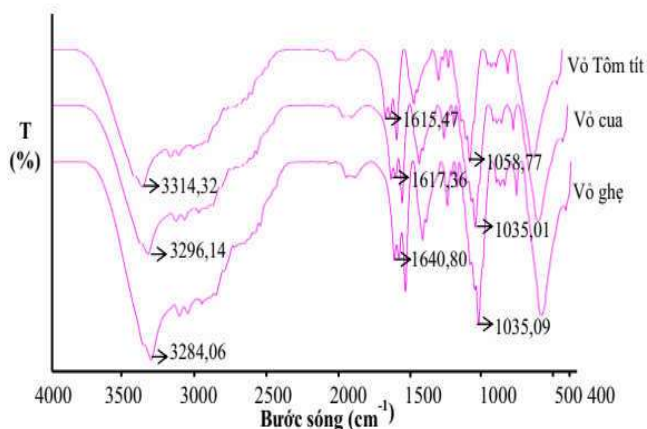
Thời gian thủy phân 6 giờ cho hiệu quả thu nhận glucosamine hydrochlorua cao (49,63-53,88%), và khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa hai nồng độ HCl 10M và 12M, trong đó chitin từ vỏ tôm tít có hiệu suất thu hồi glucosamine cao nhất và vỏ gẹ là thấp nhất. Sản lượng glucosamine hydrochlorua thu được từ 3 loại vỏ giáp xác trong nghiên cứu này cao hơn các kết quả được công bố bởi Jittrakan *et al.* (2018) với hiệu suất thu hồi glucosamine hydrochlorua đạt 36,4% từ chitin vỏ gẹ thủy phân trong HCl 30% (9,78M) và 18,3% từ vỏ cua (Nurjannah *et al.*, 2016), nhưng thấp hơn so với nghiên cứu của Benavente *et al.* (2011) chiết xuất glucosamine từ vỏ tôm đạt 58% khi chitin được thủy phân trong dung dịch HCl 12M và khoảng 57% từ vỏ tôm sú và tôm thẻ chân trắng trong thí nghiệm của Thuy *et al.* (2021). Độ hòa tan của glucosamine hydrochlorua từ chitin vỏ cua biển, vỏ gẹ, vỏ tôm tít đều trên 80% và có xu hướng tăng dần khi nồng độ và thời gian thủy phân tăng, cao nhất đối với glucosamine hydrochlorua có nguồn gốc từ vỏ tôm tít. Quá trình thủy phân giúp ion Cl⁻ liên kết với các nhóm -NH₂ thành NH₃Cl và tạo liên kết hydroxyl với nhóm -OH và làm cho glucosamine hydrochloride dễ dàng hòa tan trong nước (Cahyono *et al.*, 2014).

Tóm lại, điều kiện thủy phân thích hợp để thu nhận glucosamine hydrochlorua cho cả 3 loại chitin từ 3 loại vỏ giáp xác là sử dụng dung dịch HCl có nồng độ 10M, thủy phân chitin trong 6 giờ vừa giúp tiết kiệm hóa chất nhưng vẫn cho hiệu suất thu hồi cao.

3.4. Phổ FTIR của glucosamine hydrochlorua

Qua kết quả phân tích phổ FTIR cho thấy, glucosamine hydrochlorua chiết xuất từ vỏ cua biển, vỏ gẹ và vỏ tôm tít có các peak chuẩn tương tự nhau, đại diện cho cấu trúc điển hình của phân tử glucosamine và tương đồng với sản phẩm glucosamine thương mại trong nghiên cứu của Martha *et al.* (2015) với các peak có bước sóng 3370 cm⁻¹, 1615 cm⁻¹ và 1094 cm⁻¹.

Glucosamine hydrochlorua từ 3 loại nguyên liệu này có đỉnh peak 1 hấp thụ ở bước sóng từ 3284,06 cm⁻¹ - 3314,32 cm⁻¹, biểu thị cho nhóm chức amino - NH và liên kết CO-NH nội phân tử và thuộc loại monomer glucosamine (Brugnerottoa *et al.*, 2001).



Hình 1. Phổ FTIR của glucosamine hydrochlorua (HCl 10M, 6 giờ)

Đỉnh của peak 2 được quan sát ở bước sóng dao động 1615,47 cm⁻¹ - 1640,80 cm⁻¹ và giống với nhận xét của Cahyono *et al.* (2014) và Thuy *et al.* (2021), đặc trưng cho liên kết hydrogen giữa nhóm CO-NH và liên kết nội phân tử CO-HOCH₂. (Mohammed *et al.*, 2013). Nhóm chức -OH thể hiện cấu trúc thứ cấp của rượu trong glucosamine hydrochlorua có bước sóng trong khoảng 1035,09 cm⁻¹ - 1058,77 cm⁻¹ và phù hợp với quan sát của Thuy *et al.* (2021).

4. KẾT LUẬN

Dựa trên hiệu quả thu nhận glucosamine hydrochlorua từ vỏ cua biển, vỏ gẹ và vỏ tôm tít trong phạm vi nghiên cứu này, nguồn phụ phẩm từ vỏ của 3 loài giáp xác này là những nguồn nguyên liệu đầy tiềm năng để chiết xuất chế phẩm sinh học glucosamine với hiệu suất thu hồi cao khoảng 50%, mang lại lợi ích kinh tế và góp phần làm phong phú nguồn nguyên liệu để tinh chế sản phẩm glucosamine.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đức Lượng (2004). *Công nghệ enzyme* 2. Nxb. Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh. 245 trang.
2. Nguyễn Văn Thường và Phạm Minh Đức (2014). *Thành phần loài và phân bố của tôm họ Scyllidae ở vùng ven biển đồng bằng sông Cửu*

Long. Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ. 2: 270-277.

3. Phạm Thị Đan Phượng và Trang Sĩ Trung (2012). *Tính chất của chitin và chitosan từ vỏ tôm thẻ chân trắng khử protein bằng phương pháp hóa học và sinh học*. Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản. 3: 48-52.

4. Trần Thái Hòa (2005). *Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình deacetyl và cắt mạch chitin để điều chế glucosamine*. Tạp chí Khoa học - Đại học Huế. 27: 1-7.

5. Trần Thị Luyến (2006). *Sản xuất các chế phẩm kỹ thuật và y dược từ phế liệu thủy sản*. Nxb Nông nghiệp TP. Hồ Chí Minh. 162 trang.

6. Ahmad, L. O., Permal, D., Wahabi, Sabarwatil, S. H., Ramadhan, L. O. A. N. and Rianse, U. (2016). *Improved Chitosan Production from Tiger Shrimp Shell Waste (Penaeus monodon) by Multistage Deacetylation Method and Effect of Bleaching*. Advances in Environmental and Geological Science and Engineering. 38: 373-378.

7. AOAC (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th Edition, George, W. and Latimer, Jr (Eds.), Volume II*. Washington DC. USA.

8. Benavente, M., Arias, S., Moreno, L. and Martínez, J. (2011). *Production of glucosamine hydrochloride from crustacean shell*. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 3(1): 20-26.

9. Bolat, Y. Ş., Bilgin, A., Günlü, L., Izci, S. B., Koca, S., Çetinkaya, and Koca, H. U. (2010). *Chitin-Chitosan yield of freshwater crab (Potamon potamios, Olivier 1804) shell*. Pakistan Veterinary Journal. 30(4): 227-231.

10. Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Moncal, W., Desbrières, J. and Rinaudo, M. (2001). *An infrared investigation in relation with chitin and chitosan Characterization*. Polymer. 42(8): 3569-3580.

11. Cahyono, E., Suptijah, P. and Wientarsih, I. (2014). *Development of a pressurized hydrolysis method for producing glucosamine*. Asian Journal of Agriculture and Food Sciences. 2(5): 390-396.

12. Cho, H. R., Chang, D. S., Lee, W. D., Jeong, E. T. and Lee, E. W. (1998). *Utilization of chitosan hydrolysate as a natural food preservative for fish*

meat paste products. Korean Journal Food Science Technology. 30: 817-822.

13. De Holanda, H. D. and Netto, F. M. (2006). *Recovery of components from shrimp (Xiphopenaeus kroyeri) processing waste by enzymatic hydrolysis*. Journal of Food Science. 71(1): 298-303.

14. Gildberg, A. and Stenberg, E. (2001). *A new process for advanced utilisation of shrimp waste*. Process Biochemistry. 36(8-9): 809-812.

15. Hajji, S., Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Hajji, R., Rinaudo, M., Nasri, M. and Jellouli, K. (2014). *Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources*. International Journal of Biological Macromolecules. 65: 298-306.

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

17. Houpt, J. B., McMillan, R., Wein, C. and Paget-Dellio, S. D. (1999). *Effect of glucosamine hydrochloride in the treatment of pain of osteoarthritis of the knee*. Journal of Rheumatology. 26: 2423-2430.

18. Jegannathan, K. R. and Nielsen, P. H. (2013). *Environmental assessment of enzyme use in industrial production e a literature review*. Journal of Clean. Production. 42: 228-240.

19. Jittrakan, K., Sitthipong, N., Siriporn, R., Suthasinee Y. and Palanivel, G. (2018). *Physicochemical Characteristics of Glucosamine from Blue Swimming Crab (Portunus pelagicus) Shell Prepared by Acid Hydrolysis*. Agricultural Technology and Biological Sciences. 15(12): 869-877.

20. Kumari, S., Annamareddy, A. H. K., Abanti, S. and Rath, P. K. (2017). *Physicochemical properties and characterization of chitosan synthesized from fish scales, crab and shrimp shells*. International Journal of Biological Macromolecules. 104: 1697-1705.

21. White, T. and Stegemann, J. A. (2001). *Environmentally preferred materials, In Advance in Environmental Materials; Material Research Society: Singapore*. 2: 249-260.

22. Li, Q., Dunn E. T., Grandmaison E. W. and Goosen M. F. A. (1992). *Applications and properties of chitosan*. Journal of Bioactive and Compatible Polymer. 7(4): 370-397.
23. Martha, B., Selene, A., Luis, M. and Joaquín M. (2015). *Production of glucosamine hydrochloride from Crustacean Shell*. Journal of Pharmacology. 3: 20-26.
24. Mohammed, M. H., Williams, P. A. and Tverezovskaya, O. (2013). *Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan*. Food Hydrocolloids. 31(2): 166-171.
25. Mojarrad, J. S., Nemati, M., Valizadeh., Ansarin, M. and Bourbour, S. (2007). *Preparation of Glucosamine from Exoskeleton of Shrimp and Predicting Production Yield by Response Surface Methodology*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55(6): 2246-2250.
26. Nagaoka, M., Igarashi, J., Hua, Y., Ju, S., Yomogida. and Sakamoto, K. (2011). *Recent aspects of the antiinflammatory actions of glucosamine*. Carbohydrate Polymers. 84(2): 825-830.
27. Nurjannah, A., Darmanto, Y. S. and Wijayanti, I. (2016). *Optimization making glucosamine hydrochloride of crab shell waste through chemical hydrolysis*. J. Pengolah. Hasil. Pernikan. Indones. 19: 26-35.
28. Percot, A., Viton, C. and Domard, A. (2003). *Optimization of chitin extraction from shrimp shells*. Biomacromolecules. 4(1): 12-18.
29. Prameela, K., Mohan., Ch. M., Smitha, P. V. and Hemalatha, K. P. J. (2010). *Bioremediation of shrimp biowaste by using natural probiotic for chitin and carotenoid production an alternative method to hazardous chemical method*. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. 3: 903-910.
30. Rao, M. S., Nyein, K. A., Trung, T.S. and Stevens, W. F. (2007). *Optimum parameters for production of chitin and chitosan from Squilla (S. empusa)*. Journal of Applied Polymer Science. 103(6): 3694-3700.
31. Seghir, B. B. and Benhamza, M. H. (2017). *Preparation, optimization and characterization of chitosan polymer from shrimp shells*. Journal of Food Measurement and Characterization. 11(3): 1137-1147.
32. Sibi, G., Dhananjaya, K., Ravikumar, K. R., Mallesha, H., Venkatesha, R. T., Trivedi, D., Bhusal, K., Neeraj, P. and Gowda K. (2013). *Preparation of Glucosamine Hydrochloride from Crustacean Shell Waste and It's Quantitation by RP-HPLC*. American-Eurasian Journal of Scientific Research. 8(2): 63-67.
33. Sugiyanti, D., Darmadji, P., Anggrahini, S., Anwar, C. and Santoso, U. (2018). *Preparation and characterization of chitosan from Indonesian tambak torok shrimp shell waste and crab shell waste*. Pakistan Journal of Nutrition. 17(9): 446-453.
34. Synowiecki, J. and Al-Khateeb, N. A. A. Q. (2000). *The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards*. Food Chemistry. 68(2): 147-152. doi:10.1016/s0308-8146(99)00165-x
35. Thuy, L. T. M., Truc, T. T. and Osako, K. (2021). *The effect of deproteinization methods on the properties of glucosamine hydrochloride from shells of white leg shrimp (Litopenaeus vannamei) and black tiger shrimp (Penaeus monodon)*. Ciência Rural, Santa Maria. 52(1): e20200723. Doi.org/10.1590/0103-8478cr20200723.
36. Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M. and Alagui, A. (2003). *Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties*. Polymer. 44(26): 7939-7952.
37. Vázquez, J. A., Rodríguez-Amado, I., Montemayor, M. I., Fraguas, J., González, M. P. and Murado, M. A. (2013). *Chondroitin Sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: characteristics, applications and ecofriendly processes: a review*. Marine Drugs. 11(3): 747-774.
38. Younes, I. and Rinaudo, M. (2015). *Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications*. Marine Drugs. 13(3): 1133-1174.

PREPARATION OF GLUCOSAMINE HYDROCHLORUA FROM CRAB SHELL, BLUE SWIMMING CRAB SHELL, MANTIS SHRIMP SHELL BY THE BIOCHEMICAL METHOD

Le Thi Minh Thuy^{1*}, Nguyen Van Thom¹

¹College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University

Email: ltmthuy@ctu.edu.vn

Summary

Extraction of glucosamine hydrochloride from various crustacean shells namely crab shell (*Scylla paramamosain*), blue swimming crab shell (*Portulus pelagicus*) and mantis shrimp shell (*Oratosquilla interrupta*) was carried out through the following steps: demineralization and deproteinization to obtain chitin, and then this crude chitin was hydrolysed to create glucosamine hydrochloride. The research results revealed that the remaining mineral content in all three types of shells were lower than 1% which treated in 4% HCl solution (mantis shrimp shell) and 6% HCl for crab shell and blue swimming crab shell. After that, the optimal condition of deproteinization for mantis shrimp shell was 6 hours and Alcalase concentration of 0.1%, and Alcalase concentration of 0.3% for 4 hours were applied for the others. Finally, the crude chitins derived from these three types had the same hydrolysis mode (HCl 10M, 6 hours) to convert into glucosamine hydrochloride, the solubility was over 80%, the highest glucosamine hydrochloride recovery yield reaching to 53.88% was recorded for chitin from mantis shrimp shell and 52.67% from the crab shell chitin, whereas blue swimming crab shell showed the lowest yield of 49.63%. Based on the results of FTIR analysis, the structure of all obtained glucosamine hydrochloride from the shell of crustacean wastes was similar to the standard sample. The result of this research showed the ability to utilize mantis shrimp shell, crab shell and blue swimming crab shell as a suitable material for the production of glucosamine hydrochlorua.

Keywords: *Alcalase enzyme, crustacean shells, glucosamine, FTIR spectroscopy, yield.*

Người phản biện: TS. Đỗ Văn Nam

Ngày nhận bài: 10/8/2021

Ngày thông qua phản biện: 10/9/2021

Ngày duyệt đăng: 17/9/2021