

## TRÍCH LY ASTAXANTHIN TỪ VỎ TÔM SÚ *Penaeus monodon* VỚI SỰ HỖ TRỢ CỦA DUNG MÔI ĐẰNG SÂU

Phạm Thị Mỹ Tiên<sup>1</sup>, Bùi Thị Thúy Hằng<sup>1</sup>, Đào Thị Lan<sup>1</sup>,  
Phan Văn Mẫn<sup>2</sup>, Trần Chí Hải<sup>\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Trường Cao đẳng Kỹ thuật Công nghệ Bà Rịa - Vũng Tàu

\*Email: [haitc@huit.edu.vn](mailto:haitc@huit.edu.vn)

Ngày nhận bài: 08/4/2024; Ngày nhận bài sửa: 20/4/2024; Ngày chấp nhận đăng: 22/4/2024

### TÓM TẮT

Astaxanthin là một carotenoid có hoạt tính chống oxy hóa mạnh, được ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm, dược phẩm và công nghệ sinh học. Nghiên cứu này khảo sát khả năng thu nhận astaxanthin từ vỏ tôm sú (*Penaeus monodon*) bằng phương pháp trích ly sử dụng dung môi đẳng sâu (DES) kết hợp với acid citric, đồng thời so sánh với phương pháp chiết bằng ethanol. Kết quả cho thấy hệ dung môi choline chloride – glycerol với tỷ lệ mol 1:2, bổ sung 5% acid citric (CG2–5%), cho hiệu suất thu hồi astaxanthin cao nhất, đạt  $0,311 \pm 0,004$  mg/g ở điều kiện 40 °C trong 3 giờ, cao hơn khoảng 1,3 lần so với phương pháp ethanol. Dung môi DES cũng làm thay đổi cấu trúc bề mặt vỏ tôm, tạo lỗ rỗng và phá vỡ cấu trúc vật liệu, giúp tăng hiệu quả giải phóng astaxanthin. Ngoài ra, dịch chiết thu được từ CG2–5% thể hiện hoạt tính chống oxy hóa cao hơn so với mẫu chiết bằng ethanol. Kết quả cho thấy hệ dung môi choline chloride – glycerol kết hợp acid citric là dung môi xanh tiềm năng cho quá trình thu hồi astaxanthin từ phụ phẩm tôm.

*Từ khóa:* Astaxanthin, dung môi đẳng sâu, hoạt tính kháng oxy hóa, vỏ tôm sú, trích ly.

### 1. GIỚI THIỆU

Astaxanthin (ASX) (3,3'-dihydroxy- $\beta$ , $\beta'$ -carotene-4,4'-dione) là một ketocarotenoid có hoạt tính sinh học cao, nổi bật với khả năng chống oxy hóa mạnh, đồng thời thể hiện các tác dụng kháng viêm và tiềm năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư [1-4]. Những đặc tính này liên quan chặt chẽ đến cấu trúc phân tử đặc trưng của ASX, bao gồm chuỗi polyene dài với nhiều nối đôi liên hợp cùng hai đầu phân tử mang các nhóm chức keto và hydroxyl [5]. Nhờ cấu trúc này, astaxanthin có khả năng trung hòa các gốc tự do hiệu quả, vì vậy được quan tâm và ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm [1].

Trong tự nhiên, astaxanthin được tìm thấy chủ yếu ở các sinh vật thủy sinh như tôm, cua, cá hồi và một số loài vi tảo. Trong đó, vỏ tôm được xem là nguồn nguyên liệu giàu astaxanthin và có chi phí thấp, phù hợp cho mục đích khai thác hợp chất này [6, 7]. Hằng năm, quá trình chế biến thủy sản trên thế giới tạo ra lượng lớn phụ phẩm từ giáp xác, ước tính khoảng 6–8 triệu tấn, gây ra nhiều vấn đề môi trường nếu không được xử lý hợp lý. Việc tận dụng nguồn phế liệu này để thu hồi các hợp chất sinh học có giá trị không chỉ góp phần giảm thiểu ô nhiễm mà còn nâng cao giá trị kinh tế của ngành thủy sản [8]. Trong thành phần vỏ tôm, ngoài các khoáng chất như calcium carbonate và các hợp chất sinh học như chitin, lipid, còn có các sắc tố carotenoid, trong đó astaxanthin là hợp chất quan trọng [9]. Hiện nay, nhiều phương pháp đã được áp dụng để tách chiết astaxanthin từ nguồn nguyên liệu tự nhiên, bao gồm sử dụng dung môi hữu cơ, chiết bằng CO<sub>2</sub> siêu tới hạn, cũng như các hệ dung môi xanh như dung dịch ion (ionic liquids – ILs) và dung môi đẳng sâu (deep eutectic solvents – DES) [7, 10-14].

Trong số đó, DES được xem là hệ dung môi tiềm năng do có nhiều ưu điểm như độc tính thấp, khả năng phân hủy sinh học tốt, chi phí sản xuất thấp và quy trình chuẩn bị đơn giản [15, 16]. DES được hình thành từ sự tương tác giữa chất nhận liên kết hydro (hydrogen bond acceptor – HBA) và chất cho

liên kết hydro (hydrogen bond donor – HBD). Choline chloride (ChCl) là một HBA thường được sử dụng do có tính an toàn, khả năng phân hủy sinh học cao và đã được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực dược phẩm và nông nghiệp [17]. Các hợp chất như glycerol và ure thường đóng vai trò HBD, góp phần hình thành hệ dung môi DES có tính thân thiện với môi trường và chi phí thấp [15].

Các nghiên cứu gần đây trên thế giới cho thấy DES đã được sử dụng để trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học khác nhau từ nhiều nguồn nguyên liệu như curcumin [18], anthocyanin và pectin [19], carotenoid và phenolic [11] và polyphenol [20]. Tuy nhiên, với nguyên liệu vỏ tôm, chỉ một vài tác giả đã tiến hành sử dụng dung môi DES để thu nhận ASX. Zhang và cộng sự đã nhận thấy điều kiện tối ưu cho quá trình trích ly là thời gian trích ly 40 phút, tỷ lệ nước bổ sung là 10%, dung dịch DES được tạo thành từ ChCl: butanediol tỷ lệ 1:5, tỷ lệ vỏ tôm:dung môi là 1:15, công suất siêu âm là 70W; lúc này, hiệu suất astaxanthin thu được là 146  $\mu\text{g/g}$  [21]. Trong khi đó, Roy và cộng sự đã tiến hành tối ưu hóa điều kiện trích ly vỏ tôm và hiệu suất astaxanthin thu được là 69,08  $\mu\text{g/g}$  với loại DES là ChCl: acid lactic tỷ lệ 1:1, thời gian trích ly là 30 phút và cường độ siêu âm sử dụng 60% [13]. Ngoài ra, Nanda và cộng sự cũng đã tiến hành trích ly ASX từ vỏ tôm với sự hỗ trợ của vi sóng tại công suất 180 W, thời gian trích ly 5 phút, tỷ lệ DES/vỏ tôm là 8:1, DES được tạo thành bởi ChCl và ure tỷ lệ 1:2, lúc này hiệu suất ASX thu được là 7,466 ppm [22].

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về ứng dụng dung môi đẳng sâu trong việc thu hồi astaxanthin từ phụ phẩm vỏ tôm vẫn còn khá hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng trích ly astaxanthin từ vỏ tôm thông qua một số hệ dung môi DES phổ biến như choline chloride/glycerol và choline chloride/ure. Đồng thời, vai trò của acid citric khi kết hợp với DES cũng được khảo sát nhằm cải thiện hiệu suất thu nhận astaxanthin. Bên cạnh đó, các điều kiện trích ly thích hợp cũng được đánh giá để tối ưu hóa quá trình thu hồi hợp chất này từ nguồn phụ phẩm tôm. Kết quả của nghiên cứu được kỳ vọng sẽ cung cấp cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo, đặc biệt là khi kết hợp DES với các kỹ thuật hỗ trợ như siêu âm hoặc vi sóng nhằm nâng cao hiệu quả trích ly astaxanthin.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

#### 2.1.1. Nguyên liệu

Phế liệu tôm sú (*Penaeus monodon*), bao gồm phần đầu và vỏ thân, được thu nhận từ Công ty TNHH Minh Phú (Cà Mau, Việt Nam). Nguyên liệu được rửa sạch bằng nước máy nhằm loại bỏ tạp chất, sau đó được sấy ở 50 °C đến khi độ ẩm của bột tôm đạt khoảng 6–8%. Sau quá trình sấy, vỏ tôm được nghiền bằng máy nghiền để thu bột mịn với kích thước hạt khoảng 100  $\mu\text{m}$ . Mẫu bột sau khi nghiền được bảo quản trong túi nilon màu tối và lưu trữ ở nhiệt độ dưới 4°C cho đến khi tiến hành thí nghiệm.

#### 2.1.2. Hóa chất

Choline chloride (ChCl) (>98%), glycerol (Gl) (>99%), urê (Ur) (>99%), Trolox (>97%), DPPH (>90%), ABTS (>99%) và astaxanthin (ASX) (97%) được cung cấp bởi Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acid citric có nguồn gốc từ Trung Quốc được cung cấp bởi công ty Sinopharm. Các hóa chất còn lại sử dụng trong nghiên cứu đều đạt tiêu chuẩn hóa chất dùng cho phân tích.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Ảnh hưởng của các loại dung môi DES đến quá trình trích ly ASX

Các dung môi eutectic sâu (DES) được chuẩn bị bằng cách phối trộn ChCl với glycerol hoặc urê theo các tỷ lệ mol khác nhau (1:1, 1:2 và 1:3). Hỗn hợp được gia nhiệt ở 80°C trong bể điều nhiệt theo phương pháp được mô tả trong nghiên cứu trước đây [23] và khuấy liên tục cho đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất và trong suốt. Độ nhớt của các dung môi DES được xác định bằng máy đo độ nhớt DVII-Brookfield (Middleboro, USA) sử dụng đầu đo S52. Phép đo được tiến hành ở  $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$  với tốc độ quay 50 vòng/phút trong 10 giây. Đối với quá trình trích ly, 3,0 g bột vỏ tôm khô được trộn với 60 mL dung môi DES và lắc trong bể ổn nhiệt ở 40 °C trong 2 giờ. Sau khi trích ly, hỗn hợp được ly tâm bằng máy ly tâm SL-706 (Solab, Piracicaba, Brazil) ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch chiết trong, sau đó tiến hành xác định hàm lượng ASX. Để so sánh hiệu quả trích ly, ethanol được sử dụng làm dung môi đối chứng. Quá trình trích ly bằng ethanol được thực hiện theo nghiên cứu trước đó

của nhóm tác giả [24], trong đó 3,0 g bột vỏ tôm được chiết bằng ethanol 90° với tỷ lệ rắn/lỏng là 1:30 (w/v) trong 2 giờ ở nhiệt độ 40 °C.

#### *2.2.2. Ảnh hưởng của các nồng độ acid citric khác nhau trong môi trường DES đến quá trình trích ly ASX*

Hàm lượng acid citric khác nhau (0, 2,5, 5, 7,5 và 10% so với DES) được bổ sung vào DES và hỗn hợp được khuấy liên tục trong 2 giờ ở nhiệt độ xác định. Lúc này, 3,0 gram bột vỏ tôm được bổ sung với 60 mL hỗn hợp DES – acid citric và lắc ôn nhiệt ở 40 °C trong 2 giờ. Kế tiếp hỗn hợp được ly tâm và thu lấy phần dịch trong để xác định hàm lượng ASX. Hàm lượng ASX thu được bằng dung môi DES được so sánh với mẫu trích ly bằng dung môi truyền thống ethanol.

#### *2.2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian trích ly đến quá trình thu nhận ASX*

Nhiệt độ và thời gian trích ly là hai thông số công nghệ quan trọng có thể ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả thu nhận astaxanthin (ASX). Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của từng yếu tố được khảo sát bằng thiết kế thí nghiệm đơn yếu tố, trong đó mỗi thí nghiệm chỉ thay đổi một biến số, còn các điều kiện còn lại được giữ cố định. Quy trình thực hiện thí nghiệm tương tự như đã mô tả ở phần trước. Phạm vi khảo sát của các yếu tố được thiết lập như sau: nhiệt độ trích ly lần lượt ở 40, 45, 50, 55 và 60 °C, trong khi thời gian trích ly được khảo sát tại 1, 2, 3, 4 và 5 giờ nhằm đánh giá ảnh hưởng của các thông số này đến hiệu suất trích ly ASX.

#### *2.2.4. Xác định hàm lượng ASX bằng phương pháp HPLC*

Hàm lượng astaxanthin (ASX) trong dịch chiết được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) dựa trên phương pháp đã được báo cáo bởi Zhang và cộng sự, với một số điều chỉnh phù hợp với điều kiện thí nghiệm hiện tại [21]. Trước khi tiến hành phân tích, mẫu dịch trích được pha loãng bằng pha động ở tỷ lệ thích hợp và lọc qua màng lọc 0,2 µm nhằm loại bỏ các tạp chất không hòa tan. Sau đó, mẫu được tiêm vào hệ thống HPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific, USA) để thực hiện quá trình phân tích. Sự phân tách ASX được thực hiện trên cột sắc ký C18 (4,6 × 250 mm; kích thước hạt 5 µm) với thể tích tiêm mẫu 20 µL. Pha động sử dụng là hỗn hợp dichloromethane, methanol, acetonitrile và nước theo tỷ lệ 5 : 85 : 5,5 : 4,5 (v/v) và hệ thống được vận hành ở nhiệt độ phòng. Tốc độ dòng được thiết lập ở 0,5 mL/phút, trong khi bước sóng phát hiện được đặt tại 476 nm. Dung dịch chuẩn ASX được chuẩn bị trong khoảng nồng độ từ 0,1 đến 50 µg/mL để xây dựng đường chuẩn phục vụ cho việc định lượng.

#### *2.2.5. Đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa của dịch ASX*

Dịch chiết chứa ASX được tinh sạch bằng cột silica gel có kích thước hạt 0,06 – 0,2 mm. Hỗn hợp dung môi petroleum ether: ethanol (95: 5, v/v) được sử dụng làm pha rửa giải. Phần dịch thu được sau quá trình tách cột được loại dung môi bằng thiết bị cô quay Buchi ở 40 °C dưới áp suất 500 mmHg. Mẫu sau khi cô được sử dụng để đánh giá khả năng kháng oxy hóa thông qua hai phép thử DPPH và ABTS, theo phương pháp được mô tả bởi Chandra Roy và cộng sự [13].

$$\text{Khả năng kháng oxy hóa (\%)} = \left[ 1 - \frac{A_s - A_b}{A_c} \right] \times 100$$

Trong đó,  $A_s$ ,  $A_b$ ,  $A_c$  lần lượt là mật độ quang của mẫu, mẫu đối chứng (thay thế mẫu bằng ethanol), mẫu kiểm soát (chỉ chứa dung dịch DPPH hoặc dung dịch ABTS) tại bước sóng 734 nm đối với phương pháp ABTS và 517 nm đối với phương pháp DPPH.

#### *2.2.6. Phân tích hình thái bề mặt của vật liệu*

Sau quá trình trích ly, phần bã rắn được tách ra, rửa sạch và sấy khô trước khi tiến hành phân tích hình thái bề mặt. Mẫu sau khi sấy được phủ một lớp vàng mỏng bằng phương pháp sputter coating nhằm tăng độ dẫn điện, sau đó được cố định trên giá đỡ bằng băng dính dẫn điện. Cấu trúc bề mặt của mẫu được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) Quanta 650-FEG (FEI, USA). Hình ảnh được ghi nhận ở điện áp gia tốc 5 kV với độ phóng đại 5.000 lần.

#### *2.2.7. Phương pháp và xử lý số liệu*

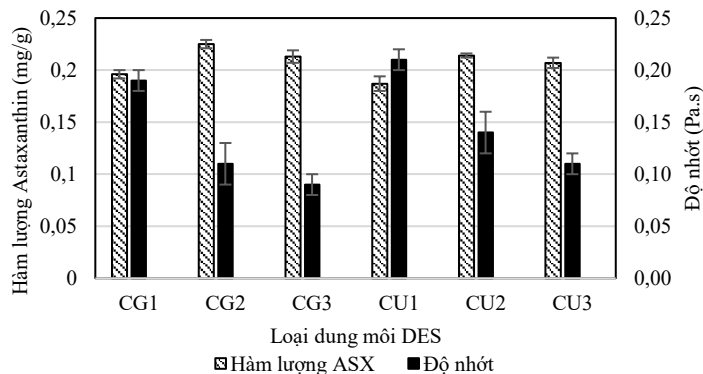
Tất cả các thí nghiệm trong nghiên cứu được thực hiện ba lần lặp lại độc lập nhằm đảm bảo độ chính xác và tính lặp lại của kết quả. Các giá trị thu được được trình bày dưới dạng trung bình kèm theo độ lệch chuẩn (Mean ± SD). Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được đánh giá thông qua phân tích phương sai một yếu tố (one-way ANOVA). Khi kết quả ANOVA cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa

thống kê, phép thử LSD được sử dụng để so sánh các giá trị trung bình ở mức ý nghĩa  $p < 0,05$ . Toàn bộ quá trình xử lý và phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm Minitab Statistical phiên bản 19.0.

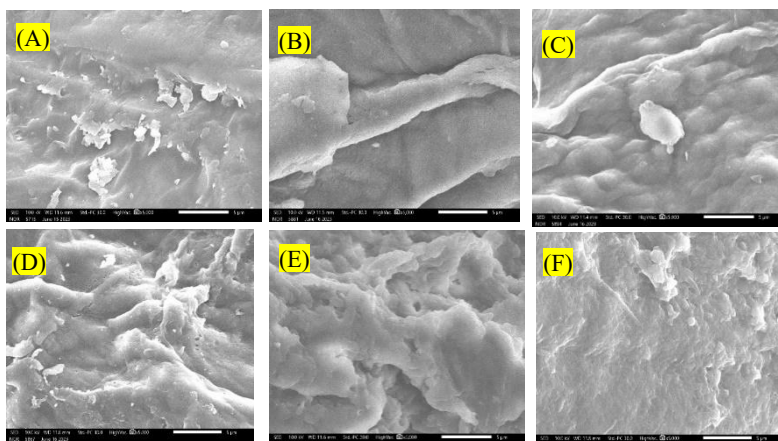
### 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của các loại DES khác nhau đến quá trình thu nhận ASX từ vỏ tôm

Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy hiệu quả trích ly của dung môi eutectic sâu (DES) phụ thuộc đáng kể vào bản chất của các thành phần tạo dung môi (HBD và HBA) cũng như tỷ lệ phối trộn giữa chúng. Sự khác biệt về thành phần và cấu trúc của hệ dung môi có thể dẫn đến khả năng hòa tan và thu nhận các hợp chất mục tiêu khác nhau [18-20], [26], [27]. Trong nghiên cứu này, dung môi sâu DES được điều chế bằng cách phối trộn ChCl với Gl hoặc ChCl với Ur theo các tỷ lệ mol khác nhau (1:1, 1:2, 1:3) dùng để trích ly ASX. Hàm lượng astaxanthin (ASX) thu được từ vỏ tôm thay đổi theo loại hệ dung môi DES, với giá trị dao động từ 0,18 đến 0,23 mg/g nguyên liệu khô (Hình 1). Trong đó, ChCl: Gl với tỷ lệ 1:2 (CG2) cho hiệu quả trích ly astaxanthin là cao nhất, đạt  $0,225 \pm 0,004$  mg/g. Đối với dung môi DES ChCl: Ur, tỷ lệ mol 1:2 cũng cho thấy hiệu quả trích ly astaxanthin tốt hơn so với hai tỷ lệ còn lại, đạt  $0,214 \pm 0,002$  mg/g.



Hình 1. Hàm lượng astaxanthin thu được khi trích ly với các loại DES khác nhau (ChCl: Gl ở các tỷ lệ 1:1, 1:2, và 1:3 kí hiệu CG1, CG2 và CG3; ChCl: Ur ở các tỷ lệ 1:1, 1:2, và 1:3 kí hiệu CU1, CU2 và CU3)



Hình 2. Kết quả hình thái bề mặt vật liệu (SEM) (A) mẫu vỏ tôm; (B) và (C) bã vỏ tôm sau xử lý CG1 và CU1 (Choline chloride: glycerol; Choline chloride: urea tỷ lệ 1:1); (D) và (E) bã vỏ tôm sau xử lý (Choline chloride: glycerol; Choline chloride: urea tỷ lệ 1:2); (F) bã vỏ tôm xử lý bằng ethanol, độ phóng đại 5.000 lần.

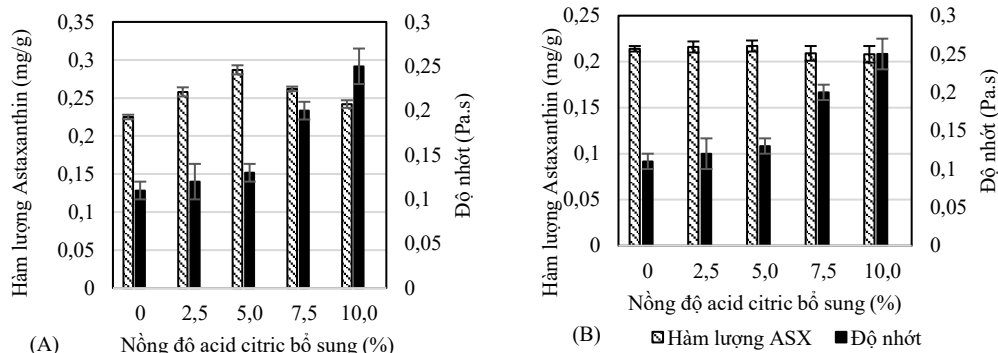
Sự khác biệt có thể được giải thích là do HBA và HBD khác nhau khi hòa tan tạo ra những dung môi DES có chứa các ion có khả năng phá vỡ liên kết hydro của màng tế bào. Từ đó làm cho bề mặt cấu trúc của tế bào thay đổi dẫn đến quá trình xâm nhập của dung môi vào trong để tách ASX tốt hơn, được thể hiện qua kết quả SEM (Hình 2). Ở Hình 2A, tế bào bề mặt mẫu vỏ tôm khô bóng nhẵn, không có sự xuất hiện các lỗ. Với những mẫu được xử lý bằng ChCl/Gl và ChCl/Ur ở tỷ lệ 1:1 bề mặt tế bào

còn bóng, gấp nếp, và xuất hiện lỗ nhỏ. Trong khi đó ở tỷ lệ 1:2 hoặc xử lý bằng ethanol các tế bào bề mặt vỏ tôm có sự phồng lên, các nếp gấp bị vỡ và xuất hiện các lỗ nhỏ. Xu hướng quan sát được trong nghiên cứu này tương tự các kết quả đã được Zhao và cộng sự và Zhang và cộng sự báo cáo, khi vỏ tôm được khai thác như nguồn nguyên liệu để thu nhận các hợp chất mục tiêu và chitosan [23], [27].

Kết quả cũng cho thấy khi tăng tỷ lệ mol ChCl:Gl hoặc ChCl:Ur từ 1:2 lên 1:3, hiệu suất thu nhận astaxanthin (ASX) có xu hướng giảm nhẹ. Hiện tượng này có thể liên quan đến sự thay đổi trong mạng lưới liên kết hydro của hệ dung môi DES, dẫn đến khả năng hòa tan và trích ly hợp chất mục tiêu giảm. Mặc dù vậy, hàm lượng ASX thu được từ hệ DES vẫn thấp hơn so với mẫu trích ly bằng dung môi ethanol, với giá trị đạt  $0,239 \pm 0,006$  mg/g vỏ tôm. Do đó để tăng hiệu suất trích ly ASX, việc bổ sung acid citric như một loại đồng dung môi nhằm để loại bỏ khoáng và protein ở trong tế bào vỏ tôm là cần thiết. Theo Zhao và cộng sự, acid citric phản ứng với muối khoáng, đặc biệt là canxi cacbonate trong vỏ tôm [23]. Do đó, DES (CG2 và CU2) kết hợp acid citric để nâng cao hiệu quả trích ly astaxanthin được khảo sát trong thí nghiệm tiếp theo.

### 3.2. Ảnh hưởng lượng acid citric bổ sung kết hợp DES đến hiệu quả trích ly ASX từ vỏ tôm

Theo Hình 3, việc bổ sung acid citric trong khoảng 0–5% vào hệ dung môi DES đã làm tăng đáng kể hàm lượng ASX thu được, với mức tăng khoảng 1,28 lần. Hàm lượng ASX đạt cao nhất với dung dịch CG2 có chứa 5% acid citric (CG2-5%) là  $0,287 \pm 0,006$  mg/g, cao hơn 1,16 lần so với phương pháp chiết bằng ethanol ( $p$ -value < 0,05). Điều này có thể là do acid citric đã hỗ trợ dung môi DES trong việc phá vỡ mạng lưới phức tạp giữa chitin, muối khoáng hữu cơ và protein màng tế bào để tăng khả năng tách chiết các chất nội bào [23]. Ngoài ra, độ nhớt của CG2-5% thấp giúp quá trình truyền nhiệt diễn ra mạnh hơn, làm tăng khả năng thâm nhập của dung môi và hòa tan ASX ra bên ngoài [26].



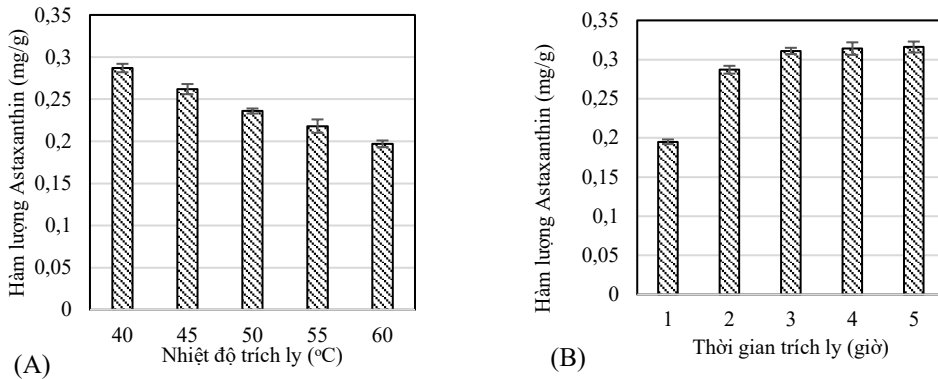
Hình 3. Hàm lượng astaxanthin thu được khi trích ly với tỷ lệ nồng độ acid citric khác nhau kết hợp với (A) CG2 (choline chloride: glycerol tỷ lệ 1:2), và (B) CU2 (choline chloride: ure tỷ lệ 1:2)

Tuy vậy, hàm lượng ASX giảm nhẹ khi nồng độ acid citric tăng từ 7,5% lên 10,0% (w/v). Sự giảm này có thể là do lượng acid citric tăng ảnh hưởng đến độ bền của liên kết hydro trong CG2. Kết quả là giảm sự tương tác giữa các phân tử trong CG2 với muối khoáng và protein trong tế bào vỏ tôm. Hơn nữa, nồng độ acid citric trong CG2 cao hơn có thể dẫn đến độ nhớt cao hơn, cản trở sự xâm nhập của dung môi vào nền chiết, dẫn đến hàm lượng ASX thấp [23]. Kết quả này phù hợp với báo cáo trước đây khi phế liệu tôm sú được xử lý bằng hệ ChCl–Gl trong sự hiện diện của acid acetic [27]. Tuy nhiên, khi sử dụng hệ CU2 (ChCl–Ur, 1:2) kết hợp với acid citric, hiệu suất thu nhận ASX không có sự cải thiện đáng kể về mặt thống kê ( $p > 0,05$ ) (Hình 3B). Các phát hiện này cho thấy rằng sự kết hợp giữa CG2 và acid citric 5% để cải thiện hiệu suất trích ly ASX từ vỏ tôm.

### 3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến quá trình trích ly ASX từ vỏ tôm

Hình 4 minh họa sự thay đổi của hàm lượng astaxanthin (ASX) theo nhiệt độ và thời gian trích ly. Kết quả cho thấy khi nhiệt độ tăng từ 40 lên 60 °C, hàm lượng ASX thu nhận được giảm khoảng 30% (Hình 4A). Thông thường, nhiệt độ cao có thể làm giảm độ nhớt của dung môi và thúc đẩy quá trình khuếch tán, từ đó cải thiện khả năng trích ly các hợp chất từ nguyên liệu [27]. Tuy nhiên, đối với ASX, sự gia tăng nhiệt độ trong khoảng khảo sát lại dẫn đến xu hướng giảm hàm lượng thu nhận được [22, 28].

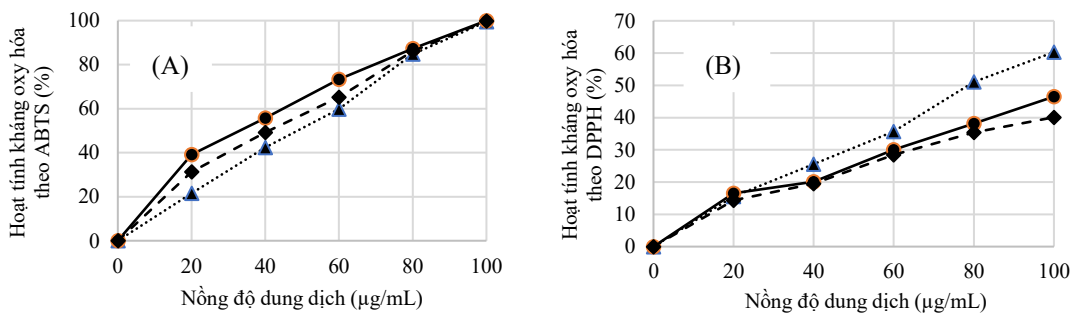
Trong khi đó, thời gian trích ly thay đổi từ 1 đến 5 giờ thì hàm lượng ASX thu được có xu hướng tăng và dần đạt trạng thái ổn định (Hình 4B). Sau 3 giờ trích ly, hàm lượng ASX đạt  $0,311 \pm 0,004$  mg/g. Thời gian trích ly càng dài các chất chiết sẽ đi từ trong nguyên liệu ra môi trường ngoài càng lớn. Tuy nhiên, thời gian quá dài cùng với tác động của nhiệt độ có thể làm bốc hơi một lượng hơi nước làm dung dịch DES có độ nhớt tăng, sự khuếch tán của các chất chiết vào dung dịch DES giảm [26]. Vì vậy, nhiệt độ 40 °C và thời gian chiết 3 giờ sẽ là điều kiện phù hợp để thu nhận ASX từ bột vỏ tôm với hệ DES choline chloride: glycerol (1:2) và 5% acid citric. Tại điều kiện này, hàm lượng ASX thu được cao gấp 1,3 lần so với điều kiện trích ly bằng ethanol.



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ (A) và thời gian trích ly (B) đến hàm lượng astaxanthin (ASX) thu nhận từ vỏ tôm

### 3.4. Đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa của chế phẩm ASX thu được

Chế phẩm astaxanthin (ASX) thu nhận từ quá trình trích ly bằng hệ dung môi DES (DES-ASX) tại điều kiện tối ưu và mẫu ASX trích ly bằng ethanol (Ethanol-ASX) sau khi được tinh sạch và loại bỏ dung môi đã được sử dụng để đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa thông qua hai phương pháp ABTS và DPPH. Kết quả từ phép thử ABTS cho thấy cả hai mẫu ASX đều thể hiện khả năng khử gốc tự do cao hơn so với chất chuẩn Trolox, như thể hiện trong Hình 5A. Sowmya và Sachindra cũng nhận thấy ASX có khả năng kháng oxy hóa mạnh, ngay cả khi đối với một lượng chiết nhỏ của nó cũng có thể tạo ra các hoạt tính trong sản phẩm cuối cùng [3]. Trong khi đó, đối với phương pháp DPPH, hoạt tính kháng oxy hóa của cả hai mẫu ASX đều thấp hơn so với chất chuẩn Trolox (Hình 5B). Quy luật này cũng được tìm thấy trong nghiên cứu của Chandra Roy và cộng sự khi trích ly ASX bằng hỗn hợp choline chloride: lactic acid (tỷ lệ 1:2) từ vỏ tôm sú [13]. Sự chênh lệch này là do cơ chế phản ứng để tạo nên màu sắc đặc trưng (màu xanh lam/lục của ABTS và màu tím của DPPH) của hai phương pháp trong môi trường khác nhau. Tuy vậy, đối với cả hai phương pháp thì mẫu DES – ASX đều cho khả năng kháng oxy hóa tốt hơn so với mẫu Ethanol – ASX. Điều này có thể là do lượng ASX trong chế phẩm được thu nhận bằng dung dịch DES cao hơn so với cồn, nên khả năng kháng oxy hóa cao hơn [29].



Hình 5. Hoạt tính kháng oxy hóa theo phương pháp ABTS (A) và theo phương pháp DPPH (B)

(—●—: Trolox, —●—: DES – ASX, —●—: Ethanol – ASX)

#### 4. KẾT LUẬN

Hệ DES dựa trên choline chloride và glycerol kết hợp với acid citric đã được sử dụng để đánh giá khả năng trích ly astaxanthin (ASX) từ vỏ tôm sú. Kết quả cho thấy hàm lượng ASX thu được tăng dần khi nồng độ acid citric được bổ sung trong khoảng 0–5%. Hàm lượng ASX đạt đến  $0,311 \pm 0,004$  mg/g tại nhiệt độ 40°C trong 3 giờ với dung dịch CG2-5%. Giá trị này cao hơn xấp xỉ 1,3 lần so với phương pháp trích ly bằng cồn. Nhìn chung, khả năng kháng oxy hóa của chế phẩm được tinh sạch từ dịch trích bằng CG2-5% cao, đặc biệt theo phương pháp ABTS thì chế phẩm ASX cho khả năng kháng oxy hóa tốt hơn cả chất chuẩn Trolox.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh theo Hợp đồng nghiên cứu số 153/HĐ-DCT ngày 01/10/2022.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. E. El-Agamy, A. K. Abdel-Aziz, S. Wahdan, A. Esmat, and S. S. Azab, “Astaxanthin Ameliorates Doxorubicin-Induced Cognitive Impairment (Chemobrain) in Experimental Rat Model: Impact on Oxidative, Inflammatory, and Apoptotic Machineries,” *Mol. Neurobiol.*, vol. 55, no. 7, pp. 5727–5740, Jul. 2018, <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0797-7>.
- [2] R. Sowmya and N. M. Sachindra, “Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by in vitro assays and in membrane model system,” *Food Chem.*, vol. 134, no. 1, pp. 308–314, Sep. 2012, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.147>.
- [3] M. Zuluaga, V. Gueguen, D. Letourneur, and G. Pavon-Djavid, “Astaxanthin-antioxidant impact on excessive Reactive Oxygen Species generation induced by ischemia and reperfusion injury,” Jan. 05, 2018, *Elsevier Ireland Ltd.* <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.012>.
- [4] N. Anarjan, H. Mirhosseini, B. S. Baharin, and C. P. Tan, “Effect of processing conditions on physicochemical properties of sodium caseinate-stabilized astaxanthin nanodispersions,” *LWT*, vol. 44, no. 7, pp. 1658–1665, 2011, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.01.013>.
- [5] I. Higuera-Ciapara, L. Félix-Valenzuela, and F. M. Goycoolea, “Astaxanthin: A review of its chemistry and applications,” Mar. 2006. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>.
- [6] K. Prameela, K. Venkatesh, S. B. Immandi, A. P. K. Kasturi, C. Rama Krishna, and C. Murali Mohan, “Next generation nutraceutical from shrimp waste: The convergence of applications with extraction methods,” Dec. 15, 2017, *Elsevier Ltd.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.097>.
- [7] V. C. Roy, A. T. Getachew, Y. J. Cho, J. S. Park, and B. S. Chun, “Recovery and bio-potentialities of astaxanthin-rich oil from shrimp (*Penaeus monodon*) waste and mackerel (*Scomberomorus niphonius*) skin using concurrent supercritical CO<sub>2</sub> extraction,” *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 159, May 2020, <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104773>.
- [8] A. E. Ghaly, V. V. Ramakrishnan, M. S. Brooks, S. M. Budge, and D. Dave, “Fish processing wastes as a potential source of proteins, amino acids and oils: A critical review,” *J. Microb. Biochem. Technol.*, vol. 5, no. 4, pp. 107–129, 2013, <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000110>.
- [9] M. J. Hülsey, “Shell biorefinery: A comprehensive introduction,” Oct. 01, 2018, *KeAi Publishing Communications Ltd.* <https://doi.org/10.1016/j.gee.2018.07.007>.
- [10] J. Gao, J. You, J. Kang, F. Nie, H. Ji, and S. Liu, “Recovery of astaxanthin from shrimp (*Penaeus vannamei*) waste by ultrasonic-assisted extraction using ionic liquid-in-water microemulsions,” *Food Chem.*, vol. 325, Sep. 2020, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126850>.
- [11] S. Koutsoukos, T. Tsiaka, A. Tzani, P. Zoumpoulakis, and A. Detsi, “Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient extraction of phenolic and

- carotenoid compounds,” *J. Clean. Prod.*, vol. 241, Dec. 2019, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118384>.
- [12] L. A. Rodrigues *et al.*, “Terpene-Based Natural Deep Eutectic Systems as Efficient Solvents to Recover Astaxanthin from Brown Crab Shell Residues,” *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 8, no. 5, pp. 2246–2259, Feb. 2020, <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06283>.
- [13] V. Chandra Roy *et al.*, “Extraction of astaxanthin using ultrasound-assisted natural deep eutectic solvents from shrimp wastes and its application in bioactive films,” *J. Clean. Prod.*, vol. 284, Feb. 2021, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125417>.
- [14] S. Dong, Y. Huang, R. Zhang, S. Wang, and Y. Liu, “Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga haematococcus pluvialis,” *The Scientific World Journal*, vol. 2014, 2014, <https://doi.org/10.1155/2014/694305>.
- [15] R. Alcalde, M. Atilhan, and S. Aparicio, “On the properties of (choline chloride + lactic acid) deep eutectic solvent with methanol mixtures,” *J. Mol. Liq.*, vol. 272, pp. 815–820, Dec. 2018, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.10.052>.
- [16] W. H. Zhang, M. N. Chen, Y. Hao, X. Jiang, X. L. Zhou, and Z. H. Zhang, “Choline chloride and lactic acid: A natural deep eutectic solvent for one-pot rapid construction of spiro[indoline-3,4'-pyrazolo[3,4-b]pyridines],” *J. Mol. Liq.*, vol. 278, pp. 124–129, Mar. 2019, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.01.065>.
- [17] K. Radošević, M. Cvjetko Bubalo, V. Gaurina Srček, D. Grgas, T. Landeka Dragičević, and R. I. Redovniković, “Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 112, pp. 46–53, Feb. 2015, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.034>.
- [18] Y. Liu, J. Li, R. Fu, L. Zhang, D. Wang, and S. Wang, “Enhanced extraction of natural pigments from *Curcuma longa* L. using natural deep eutectic solvents,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 140, Nov. 2019, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111620>.
- [19] L. Benvenuti, A. del P. Sanchez-Camargo, A. A. F. Zielinski, and S. R. S. Ferreira, “NADES as potential solvents for anthocyanin and pectin extraction from *Myrciaria cauliflora* fruit by-product: In silico and experimental approaches for solvent selection,” *J. Mol. Liq.*, vol. 315, Oct. 2020, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113761>.
- [20] C. Bakirtzi, K. Triantafyllidou, and D. P. Makris, “Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants,” *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, vol. 3, no. 3, pp. 120–127, Sep. 2016, <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.03.003>.
- [21] H. Zhang, B. Tang, and K. H. Row, “A Green Deep Eutectic Solvent-Based Ultrasound-Assisted Method to Extract Astaxanthin from Shrimp Byproducts,” *Anal. Lett.*, vol. 47, no. 5, pp. 742–749, Mar. 2014, <https://doi.org/10.1080/00032719.2013.855783>.
- [22] E. V. Nanda, Erdawati, Y. Pratiwi, and E. R. Putri, “Characteristic and Photostability of Astaxanthin Extract from Shrimp Shells by Microwave Assisted Extraction Using Nades Solvent,” in *Journal of Physics: Conference Series*, Institute of Physics, 2022. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2309/1/012036>.
- [23] D. Zhao, W. C. Huang, N. Guo, S. Zhang, C. Xue, and X. Mao, “Two-step separation of chitin from shrimp shells using citric acid and deep eutectic solvents with the assistance of microwave,” *Polymers (Basel)*, vol. 11, no. 3, Mar. 2019, <https://doi.org/10.3390/polym11030409>.
- [24] Trần Chí Hải, Phạm Thị Mỹ Tiên, Nguyễn Thị Ngọc Thúy, Hà Thị Thanh Nga, Nguyễn Đoàn Mạnh Chiến, and Lê Thanh Thuận, “Tối ưu hóa quá trình trích ly astaxanthin bằng ethanol từ vỏ tôm,” *Tạp chí Công Thương - Các kết quả nghiên cứu khoa học và ứng dụng công nghệ*, vol. 18, no. 2, pp. 1–5, 2022.
- [25] D. Skarpalezos and A. Detsi, “Deep eutectic solvents as extraction media for valuable flavonoids from natural sources,” Oct. 01, 2019, *MDPI AG*. <https://doi.org/10.3390/app9194169>.

- [26] J. Zhang, W.-R. Xu, and Y.-C. Zhang, “Facile production of chitin from shrimp shells using a deep eutectic solvent and acetic acid,” *RSC Adv.*, vol. 12, no. 35, pp. 22631–22638, 2022, <https://doi.org/10.1039/D2RA03417D>.
- [27] N. S. Calvo, C. M. Reynoso, S. Resnik, E. Cortés-Jacinto, and P. Collins, “Thermal stability of astaxanthin in oils for its use in fish food technology,” *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 270, Dec. 2020, <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114668>.
- [28] R. Sowmya and N. M. Sachindra, “Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by in vitro assays and in membrane model system,” *Food Chem.*, vol. 134, no. 1, pp. 308–314, Sep. 2012, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.147>.
- [29] D. M. L. E. Silva *et al.*, “Chemical characteristics and antioxidant activity of astaxanthin extracted from shrimp residues using soybean oil,” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 32, no. 6, pp. 1277–1285, 2021, <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210030>.

## ABSTRACT

### DEEP EUTECTIC SOLVENT EXTRACTION FOR ASTAXANTHIN FROM GIANT TIGER PRAWN (*Penaeus monodon*) SHRIMP SHELLS

Pham Thi My Tien<sup>1</sup>, Bui Thi Thuy Hang<sup>1</sup>, Dao Thi Lan<sup>1</sup>,  
Phan Van Man<sup>2</sup>, Tran Chi Hai<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Ho Chi Minh City University of Industry and Trade*

<sup>2</sup>*Ba Ria - Vung Tau College of Technology*

\*Email: [haitc@huit.edu.vn](mailto:haitc@huit.edu.vn)

Astaxanthin, a powerful antioxidant compound commonly used in the food and pharmaceutical industries, was the main focus of this study. The research aimed to evaluate a new method that combines deep eutectic solvent and citric acid for extracting astaxanthin from shrimp waste. The study compared the astaxanthin levels and antioxidant effects of this approach with the traditional ethanol extraction method. The results showed that the highest astaxanthin content (0.311±0.004 mg/g) was achieved by using a mix of choline chloride – glycerol (ChCl-Gl) at a 1:2 molar ratio with an additional 5% citric acid (CG2-5%), extracted at 40 °C for 3 hours. This led to astaxanthin levels 1.3 times higher than those obtained through ethanol extraction. Additionally, the CG2-5% treatment involving choline chloride – glycerol (ChCl-Gl) and 5% citric acid resulted in cell wall deformation, facilitating a more efficient extraction of astaxanthin, as shown by SEM results. The astaxanthin extracts obtained with CG2-5% demonstrated superior antioxidant properties compared to the ethanol-extracted sample, highlighting the environmentally friendly aspect of the CG2-5% solvent for recovering astaxanthin from shrimp waste.

*Keywords:* astaxanthin, antioxidant activity, deep eutectic solvent, extraction, giant tiger prawn shrimp shells.