

## NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH THU NHẬN CHITIN TỪ VỎ BA KHÍA (*Sesarma mederi*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP HÓA HỌC

Trần Chí Hải<sup>1,\*</sup>, Võ Thị Diễm Quyên<sup>1</sup>, Đinh Quốc Tuấn<sup>1</sup>, Mai Tiến Hùng<sup>1</sup>,  
Phạm Ngọc Trâm<sup>1</sup>, Hồ Như Trúc<sup>1</sup>, Phan Văn Mẫn<sup>2</sup>

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

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

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

Ngày nhận bài: 17/01/2025; Ngày nhận bài sửa: 13/3/2025; Ngày chấp nhận đăng: 20/3/2025

### TÓM TẮT

Vỏ ba khía (*Sesarma mederi*) là sản phẩm phụ của quá trình sản xuất mắm ba khía, chứa hàm lượng khoáng và protein cao, cần được xử lý thích hợp để thu nhận chitin tinh khiết. Nghiên cứu này đánh giá hiệu quả của việc sử dụng acid clohydric (HCl) trong quá trình khử khoáng nhằm tối ưu hóa quy trình thu nhận chitin. Kết quả cho thấy, điều kiện tối ưu để loại bỏ khoáng chất là sử dụng dung dịch HCl 5% với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:30 (w/v), ở nhiệt độ 60 °C trong 3 giờ. Sau quá trình khử khoáng, mẫu được xử lý tiếp bằng dung dịch NaOH để loại bỏ protein, thu được chế phẩm chitin có hàm lượng khoáng còn lại dưới 1,0% và độ tinh khiết khoảng 97,66%. Chitin sau khi thu nhận được phân tích bằng các phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), nhiễu xạ tia X (XRD) và hiển vi điện tử quét (SEM), cho thấy hiệu quả cao trong việc loại bỏ khoáng và protein. Kết quả cũng xác nhận rằng sản phẩm thu nhận chủ yếu tồn tại dưới dạng  $\alpha$ -chitin. Nghiên cứu này khẳng định tiềm năng của phương pháp sử dụng dung môi truyền thống trong trích ly chitin từ vỏ ba khía, góp phần nâng cao giá trị của phế phẩm thủy sản và mở ra hướng ứng dụng trong các lĩnh vực công nghiệp và sinh học.

*Từ khóa:* Chitin, khử khoáng, HCl, vỏ ba khía.

### 1. GIỚI THIỆU

Ba khía (*Sesarma mederi*) là một loài giáp xác thuộc họ Sesarmidae, phân bố chủ yếu ở các khu vực rừng ngập mặn thuộc Ấn Độ Dương và Thái Bình Dương [1]. Tại Việt Nam, ba khía tập trung nhiều ở các tỉnh Nam Bộ như Cà Mau, Bạc Liêu, Trà Vinh và Kiên Giang, sinh sống chủ yếu trong môi trường nước lợ và nước mặn [2]. Hiện chưa có số liệu thống kê chính thức về sản lượng ba khía toàn quốc. Tại Cà Mau, loài này tập trung nhiều ở Ngọc Hiển, Năm Căn, Đầm Dơi, với sản lượng hàng ngàn tấn mỗi năm [3]. Thống kê cho thấy có hơn 400 hộ dân, 1.200 lao động tham gia chế biến ba khía muối, chủ yếu tại Năm Căn và Ngọc Hiển [4]. Theo quy hoạch, đến năm 2030, tỉnh dự kiến có khoảng 1.000 cơ sở sản xuất, cung cấp trung bình 10 tấn/năm [5].

Nhờ giá trị dinh dưỡng cao và hương vị đặc trưng, ba khía trở thành nguyên liệu quan trọng trong ẩm thực Tây Nam Bộ, góp phần tạo nên nguồn lợi kinh tế đáng kể cho địa phương [2]. Với sự phát triển mạnh mẽ của các sản phẩm chế biến từ ba khía như mắm ba khía, một lượng lớn vỏ ba khía bị loại bỏ, tạo ra nguồn phụ phẩm chưa được tận dụng hiệu quả và có nguy cơ gây ô nhiễm môi trường. Trong khi đó, vỏ của loài giáp xác này chứa chitin – một polysaccharide có ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, y dược và công nghệ sinh học [6]. Tuy nhiên, vỏ ba khía ngoài chitin còn có nhiều hợp chất như protein, lipid, canxi làm cho quá trình chiết tách chitin gặp khó khăn. Hiện nay, chitin và dẫn xuất của nó (chitosan) được sản xuất chủ yếu từ vỏ giáp xác thông qua phương pháp xử lý hóa học truyền thống gồm khử khoáng bằng acid và khử protein bằng kiềm.

Phương pháp hóa học truyền thống được lựa chọn trong nghiên cứu này vì ưu điểm loại bỏ khoáng và protein hiệu quả, cho phép thu hồi chitin với độ tinh khiết cao và năng suất tốt. Mặc dù, phương pháp này có thể tạo ra lượng chất thải cần xử lý đáng kể, nhưng với điều kiện tối ưu, nó vẫn là một trong những phương pháp phổ biến và khả thi nhất để trích ly chitin từ phụ phẩm thủy sản [6]. Hiện nay, tại

Việt Nam, chưa có nhiều nghiên cứu về việc ứng dụng phương pháp truyền thống này để thu nhận chitin từ vỏ ba khía. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định các thông số công nghệ cho quá trình trích ly chitin từ vỏ ba khía bằng phương pháp hóa học, đồng thời đánh giá chất lượng sản phẩm thông qua các kỹ thuật phân tích hiện đại như phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), nhiễu xạ tia X (XRD) và kính hiển vi điện tử quét (SEM). Kết quả nghiên cứu sẽ cung cấp dữ liệu khoa học quan trọng, góp phần nâng cao giá trị của phế phẩm ngành chế biến ba khía và mở ra hướng ứng dụng tiềm năng trong các lĩnh vực công nghiệp, y dược và bảo vệ môi trường.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

#### 2.1.1. Nguyên liệu

Vỏ ba khía được thu gom ở vựa ba khía Thanh Tân tại Ấp Nam Chánh, xã Ngọc Chánh, huyện Đàm Dơi, tỉnh Cà Mau. Vỏ ba khía được chứa trong các thùng đá để vận chuyển về phòng thí nghiệm. Tại đây, chúng được rửa sạch, làm ráo và sấy đôi lần ở 50 °C trong 24 giờ đến độ ẩm đạt yêu cầu. Sau đó, vỏ ba khía đã sấy được nghiền và rây qua rây có đường kính lỗ sàng 0,3 mm. Phần qua rây được định lượng, đóng gói chân không trong túi polyacrylate (PA) khô sạch và bảo quản ngăn đông để làm nguyên liệu trong suốt quá trình nghiên cứu. Bột vỏ ba khía sau rây có độ ẩm 9,22±0,72%, hàm lượng protein 37,08±0,71% và hàm lượng khoáng là 41,09±1,02%.

#### 2.1.2. Hóa chất

Hydro peroxide (30%), acid hydrochloric (36,5%), sodium hydroxide (98%) và các hóa chất khác đều đạt yêu cầu hóa chất dùng trong phân tích.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Quá trình thu nhận chitin từ vỏ ba khía bằng phương pháp hóa học

Nghiên cứu này tập trung khảo sát ảnh hưởng của các thông số trong quá trình khử khoáng, bao gồm nồng độ acid clohydric (HCl), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, nhiệt độ và thời gian xử lý. Trong khi đó, các điều kiện cho quá trình khử protein và khử màu được cố định theo nghiên cứu của Pandharipande và Bhagat [7]. Quy trình thực hiện như sau: 20 gram bột vỏ ba khía được cân chính xác và trộn với dung dịch HCl theo các điều kiện khảo sát. Hỗn hợp được lắc trong bể ôn nhiệt ở tốc độ 150 vòng/phút. Sau quá trình khử khoáng, mẫu được lọc, rửa bằng nước cất đến pH trung tính và thu lấy bã. Giai đoạn tiếp theo, bã được xử lý bằng dung dịch NaOH 5% với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:10, ở 60 °C trong 60 phút để loại bỏ protein [7]. Sau đó, mẫu được lọc, rửa đến trung tính và tiếp tục khử màu bằng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% trong 90 phút ở 60 °C [7]. Sau quá trình khử màu, mẫu được lọc, rửa và sấy ở 70 °C trong 3 giờ để thu nhận bột chitin [7]. Sản phẩm cuối cùng được đánh giá theo các chỉ tiêu gồm hàm lượng khoáng và protein còn lại, độ tinh khiết và hiệu suất thu hồi chitin.

Thí nghiệm được thiết kế theo phương pháp một yếu tố hoàn toàn ngẫu nhiên. Trước tiên, khảo sát nồng độ HCl được thực hiện với các mức 1%, 3%, 5%, 7%, 9% và 11%, cố định tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:10, nhiệt độ 60 °C trong 2 giờ. Tiếp theo, tỷ lệ nguyên liệu/dung dịch HCl được khảo sát ở các mức 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 và 1:50 (khối lượng/thể tích), trong khi giữ nguyên nồng độ HCl, nhiệt độ 60 °C và thời gian xử lý 2 giờ. Ảnh hưởng của nhiệt độ được xem xét với các mức 50, 60, 70, 80 và 90 °C, trong khi các thông số còn lại được cố định. Cuối cùng, thời gian xử lý được khảo sát với các mức 1, 2, 3, 4 và 5 giờ, giữ nguyên nồng độ HCl, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi và nhiệt độ xử lý.

#### 2.2.2. Đánh giá chất lượng của chitin

Độ ẩm được xác định bằng các sấy mẫu đến khối lượng không đổi ở 135°C [8]. Hàm lượng chất khô của mẫu là tỉ lệ khối lượng của mẫu sau và trước khi sấy. Hàm lượng tro được xác định bằng cách nung ở nhiệt độ 600°C [9]. Hàm lượng tro được đánh giá thông qua so sánh khối lượng tro còn lại trong cốc so với khối lượng mẫu ban đầu. Hàm lượng protein còn sót lại trong mẫu được xác định bằng phương pháp Bradford [10]. Hiệu suất thu hồi và độ tinh khiết của chitin được tính toán theo công thức (1) và (2) dựa trên mô tả của Morgan và cộng sự [11] và Feng và cộng sự [12].

$$\text{Hiệu suất thu hồi chitin (\%)} = \text{Chitin khô sau xử lý (g)} \times 100 / \text{Nguyên liệu (g)} \quad (1)$$

$$\text{Độ tinh khiết chitin (\%)} = 100 - \text{hàm lượng tro (\%)} - \text{hàm lượng protein (\%)} \quad (2)$$

### 2.2.3. Hình thái học điện tử quét (SEM)

Cấu trúc hình thái bề mặt của chitin được xác định bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) (Quanta 650 – FEG, FEI, USA). Mẫu vỏ bột ba khía nguyên liệu, mẫu chitin thu nhận được, mẫu chitin vỏ tôm thương mại đã được sấy khô, mạ một lớp platinum (Pt). Hình ảnh được chụp với điện thế 5kV với độ phóng đại 10.000 lần.

### 2.2.4. Phổ hồng ngoại Fourier (FTIR)

Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) của mẫu được ghi nhận bằng thiết bị Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific, USA). Dữ liệu phổ được thu thập trong vùng số sóng từ 4000 đến 400  $\text{cm}^{-1}$  với độ phân giải 4  $\text{cm}^{-1}$  và mỗi phép đo được thực hiện thông qua 32 lần quét liên tiếp. Kết quả phổ thu được được sử dụng để đánh giá các nhóm chức đặc trưng và sự biến đổi cấu trúc phân tử của mẫu. Mức độ deacetyl hóa DA của chitin được xác định dựa trên kết quả phổ FTIR theo mô tả của Zhang và cộng sự [13].

$$\text{DA (\%)} = A_{1655}/A_{3450} \times 115\% \quad (3)$$

Trong đó,  $A_{1655}$  và  $A_{3450}$  lần lượt là mức độ hấp thụ ở số sóng 1650  $\text{cm}^{-1}$  và 3450  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.2.5. Nhiễu xạ tia X

Nhiễu xạ tia X (XRD) được thực hiện trên thiết bị D8 Advance, Bruker, Billerica, MA, Mỹ. Dữ liệu được thu thập với tốc độ quét 1°/phút tại góc quét 5 – 40°. Chỉ số kết tinh (CrI) được đánh giá dựa vào công thức (4) dựa trên nghiên cứu của Mohan và cộng sự [14] và Saravana và cộng sự [15].

$$\text{CrI (\%)} = [I_{10} - I_{am}] \times 100 / I_{10} \quad (4)$$

Trong đó, cường độ cực đại của vòng tinh thể tại 20° được kí hiệu là  $I_{10}$ , trong khi đó cường độ cực đại tại vùng vô định hình tại 16° được kí hiệu là  $I_{am}$ .

### 2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Ba lần lặp được thực hiện cho mỗi điều kiện thí nghiệm nhằm đảm bảo độ tin cậy của kết quả. Các số liệu được tổng hợp và trình bày dưới dạng giá trị trung bình cùng độ lệch chuẩn. Việc phân tích thống kê được thực hiện trên Minitab Statistical 19.0, sử dụng ANOVA một yếu tố để đánh giá ảnh hưởng của các nghiệm thức và phép thử LSD để phân biệt các trung bình tại ngưỡng xác suất  $p < 0,05$ .

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Khảo sát quá trình khử khoáng vỏ ba khía thu nhận chitin

#### 3.1.1. Ảnh hưởng của nồng độ HCl

Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất thu hồi chitin dao động từ 15,27% đến 63,73%, trong đó hiệu suất thu hồi cao nhất đạt được ở nồng độ HCl 1% (63,73%) (Bảng 1). Tuy nhiên, hiệu suất thu hồi không phải là yếu tố quan trọng nhất trong quá trình tinh sạch chitin, mà hàm lượng tro và protein còn lại mới là chỉ số quyết định độ tinh khiết của sản phẩm thu nhận [16]. Vì vậy, nghiên cứu này ưu tiên lựa chọn nồng độ HCl dựa trên khả năng loại bỏ khoáng và protein hơn là hiệu suất thu hồi.

*Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ HCl lên hiệu suất thu hồi chitin, tro, protein, độ tinh khiết trong quá trình thu nhận chitin từ vỏ ba khía*

Nồng độ acid hydrochloric (%)	Hiệu suất thu hồi chitin (%)	Tro (%)	Protein (%)	Độ tinh khiết (%)
1	58,73 <sup>a</sup> ± 0,73	35,38 <sup>a</sup> ± 0,82	20,43 <sup>a</sup> ± 0,09	45,19 <sup>c</sup> ± 0,73
3	31,96 <sup>b</sup> ± 0,84	24,89 <sup>b</sup> ± 0,68	17,68 <sup>b</sup> ± 0,88	57,42 <sup>b</sup> ± 1,48
5	15,27 <sup>c</sup> ± 0,10	1,32 <sup>c</sup> ± 0,04	3,56 <sup>c</sup> ± 0,06	95,13 <sup>a</sup> ± 0,04
7	15,38 <sup>c</sup> ± 0,23	1,37 <sup>c</sup> ± 0,04	3,52 <sup>c</sup> ± 0,05	95,11 <sup>a</sup> ± 0,09
9	15,48 <sup>c</sup> ± 0,09	1,33 <sup>c</sup> ± 0,06	3,48 <sup>c</sup> ± 0,08	95,19 <sup>a</sup> ± 0,04

*Các chữ cái <sup>a, b, c</sup> trong cùng một cột khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mức nghiệm thức với  $p < 0,05$ .*

Bảng 1 cho thấy khi nồng độ HCl tăng từ 1% lên 5%, hiệu quả khử khoáng và khử protein cũng tăng đáng kể. Tuy nhiên, khi nồng độ tiếp tục tăng trên 5%, sự cải thiện này không còn ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Điều này có thể giải thích bởi đặc điểm thành phần khoáng trong vỏ ba khía, vốn chứa hàm lượng cao canxi carbonate ( $41,09 \pm 1,23\%$ ) [17]. Khi tác động với HCl, canxi carbonate bị hòa tan và loại bỏ khỏi nguyên liệu, giúp giảm hàm lượng tro. Đồng thời, quá trình khử khoáng cũng tạo điều kiện để protein trong nguyên liệu hòa tan vào môi trường chiết, dẫn đến sự suy giảm hàm lượng protein còn lại trong chitin thô. Tại nồng độ HCl 5%, sản phẩm chitin thu được có hàm lượng tro  $1,32 \pm 0,04\%$ , hàm lượng protein  $3,56 \pm 0,06\%$  và độ tinh khiết đạt  $95,13 \pm 0,04\%$ . Khi tăng nồng độ HCl lên 7% và 9%, độ tinh khiết chitin không tăng thêm đáng kể, điều này phù hợp với quy luật đã được Shaqsi và cộng sự quan sát trong nghiên cứu trên nguyên liệu Omani *Portunidae segnis* [18]. Như vậy, việc sử dụng HCl ở nồng độ 5% là tối ưu để thu nhận chitin có độ tinh khiết cao từ vỏ ba khía mà không gây lãng phí hóa chất hay làm giảm hiệu suất thu hồi không cần thiết.

### 3.1.2. Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung dịch HCl

Kết quả nghiên cứu cho thấy tỉ lệ nguyên liệu/dung dịch HCl có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả khử khoáng và độ tinh khiết của chitin thu nhận từ vỏ ba khía. Khi tỉ lệ này tăng từ 1:10 lên 1:30, độ tinh khiết của chitin tăng từ 95,09% lên 97,57%, trong khi hiệu suất thu hồi giảm từ 15,29% xuống 14,27% (Bảng 2). Điều này có thể được giải thích bởi cơ chế khuếch tán và chuyển khối trong dung dịch. Khi tăng lượng dung môi, quá trình hòa tan khoáng và protein diễn ra mạnh hơn, giúp loại bỏ các tạp chất hiệu quả hơn, dẫn đến độ tinh khiết chitin cao hơn [19]. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi từ 1:30 lên 1:50, độ tinh khiết của chitin không cải thiện đáng kể ( $p > 0,05$ ). Điều này có thể là do sự bão hòa của quá trình khuếch tán, khi các thành phần khoáng và protein đã đạt ngưỡng hòa tan tối đa, việc bổ sung thêm dung môi không làm tăng hiệu quả loại bỏ tạp chất. Do đó, tỉ lệ 1:30 được xác định là tối ưu, vì tại mức này, chitin thu được có độ tinh khiết cao ( $97,57 \pm 0,05\%$ ), hàm lượng tro và protein còn lại thấp ( $0,96 \pm 0,03\%$  và  $1,47 \pm 0,02\%$ ), trong khi vẫn đảm bảo hiệu suất thu hồi hợp lý ( $14,27 \pm 0,04\%$ ). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Pohling và cộng sự, khi nhóm tác giả nhận thấy quá trình khử khoáng vỏ tôm *Pandalus borealis* đạt hiệu quả cao nhất ở lần khử khoáng thứ hai với tỉ lệ thể tích acid citric gấp 8 lần thể tích chuẩn. Khi tiếp tục tăng lượng acid citric, hàm lượng khoáng trong nguyên liệu không thay đổi đáng kể, cho thấy sự bão hòa của quá trình hòa tan khoáng [20]. Tương tự, nghiên cứu trên vỏ tôm hồng *Solenocera melantho* cũng ghi nhận rằng khả năng khử khoáng tăng khi tỉ lệ dung dịch HCl so với nguyên liệu được tăng lên, nhưng vượt quá một mức nhất định, hiệu quả loại bỏ khoáng không còn cải thiện [21].

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung dịch HCl lên hiệu suất thu hồi chitin, tro, protein, độ tinh khiết trong quá trình thu nhận chitin từ vỏ ba khía

Tỉ lệ nguyên liệu/dung dịch HCl	Hiệu suất thu hồi chitin (%)	Tro (%)	Protein (%)	Độ tinh khiết (%)
1:10	$15,29^a \pm 0,08$	$1,36^a \pm 0,04$	$3,55^a \pm 0,04$	$95,09^c \pm 0,07$
1:20	$14,97^b \pm 0,07$	$1,07^b \pm 0,05$	$2,09^b \pm 0,01$	$96,84^b \pm 0,04$
1:30	$14,27^c \pm 0,04$	$0,96^c \pm 0,03$	$1,47^c \pm 0,02$	$97,57^a \pm 0,05$
1:40	$14,25^c \pm 0,07$	$0,93^c \pm 0,03$	$1,43^c \pm 0,02$	$97,64^a \pm 0,04$
1:50	$14,29^c \pm 0,04$	$0,96^c \pm 0,05$	$1,44^c \pm 0,02$	$97,60^a \pm 0,04$

Các chữ cái <sup>a, b, c</sup> trong cùng một cột khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mức nghiệm thức với  $p < 0,05$ .

### 3.1.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian xử lý

Kết quả nghiên cứu cho thấy nhiệt độ và thời gian xử lý có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất thu hồi và độ tinh khiết của chitin chiết xuất từ vỏ ba khía. Khi nhiệt độ tăng từ 50 °C lên 90 °C, độ tinh khiết của chitin tăng từ 95,74% lên 97,65%, trong khi hiệu suất thu hồi giảm từ 15,61% xuống 14,17% (Bảng 3). Tương tự, khi thời gian xử lý tăng từ 1 giờ lên 5 giờ, độ tinh khiết tăng từ 96,12% lên 97,71%, đồng thời hiệu suất thu hồi giảm từ 15,89% xuống 14,14% (Bảng 4). Sự gia tăng nhiệt độ và thời gian xử lý giúp nâng cao hiệu quả loại bỏ khoáng và protein nhờ tăng cường quá trình khuếch tán và chuyển khối. Cụ thể, nhiệt độ cao thúc đẩy quá trình hòa tan các thành phần không mong muốn vào dung môi, trong khi thời gian xử lý dài hơn tạo điều kiện cho sự tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi diễn ra

hiệu quả hơn [13]. Điều này dẫn đến giảm hàm lượng tro và protein còn lại trong chitin, đồng nghĩa với việc tăng độ tinh khiết của sản phẩm. Tuy nhiên, khi nhiệt độ vượt quá 60 °C và thời gian xử lý kéo dài hơn 3 giờ, độ tinh khiết của chitin không tăng đáng kể ( $p > 0,05$ ), trong khi hiệu suất thu hồi tiếp tục giảm. Nguyên nhân có thể do sự cắt mạch polymer chitin dưới tác động của nhiệt độ cao và thời gian dài, làm giảm trọng lượng phân tử và dẫn đến thất thoát sản phẩm [22]. Hiện tượng này cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Nguyễn Công Minh và cộng sự khi khảo sát quá trình khử khoáng vỏ tôm, cho thấy nhiệt độ cao và thời gian xử lý kéo dài không mang lại hiệu quả loại bỏ khoáng cao hơn mà còn ảnh hưởng tiêu cực đến hiệu suất thu hồi [23].

Dựa trên các kết quả thực nghiệm, nhiệt độ và thời gian tối ưu để thu nhận chitin từ vỏ ba khía được xác định là 60 °C trong 3 giờ. Ở điều kiện này, chitin đạt độ tinh khiết cao ( $97,66 \pm 0,01\%$ ), với hàm lượng tro và protein thấp lần lượt đạt  $0,93 \pm 0,04\%$  và  $1,41 \pm 0,02\%$ , đồng thời duy trì hiệu suất thu hồi hợp lý ( $14,22 \pm 0,02\%$ ).

*Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ xử lý lên hiệu suất thu hồi chitin, tro, protein, độ tinh khiết trong quá trình thu nhận chitin từ vỏ ba khía*

Nhiệt độ xử lý (°C)	Hiệu suất thu hồi chitin (%)	Tro (%)	Protein (%)	Độ tinh khiết (%)
50	$15,61^a \pm 0,06$	$1,14^a \pm 0,04$	$3,12^a \pm 0,03$	$95,74^c \pm 0,07$
60	$14,31^b \pm 0,03$	$0,96^b \pm 0,03$	$1,47^b \pm 0,02$	$97,57^b \pm 0,05$
70	$14,35^b \pm 0,10$	$0,93^b \pm 0,03$	$1,44^b \pm 0,01$	$97,63^b \pm 0,02$
80	$14,28^b \pm 0,08$	$0,92^b \pm 0,04$	$1,43^b \pm 0,03$	$97,66^b \pm 0,07$
90	$14,17^b \pm 0,29$	$0,93^b \pm 0,06$	$1,43^b \pm 0,01$	$97,65^b \pm 0,06$

*Các chữ cái <sup>a, b, c</sup> trong cùng một cột khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mức nghiệm thức với  $p < 0,05$ .*

*Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian xử lý lên hiệu suất thu hồi chitin, tro, protein, độ tinh khiết trong quá trình thu nhận chitin từ vỏ ba khía*

Thời gian xử lý (giờ)	Hiệu suất thu hồi chitin (%)	Tro (%)	Protein (%)	Độ tinh khiết (%)
1	$15,89^a \pm 0,03$	$1,30^a \pm 0,06$	$2,57^a \pm 0,01$	$96,12^c \pm 0,05$
2	$14,30^b \pm 0,02$	$0,96^b \pm 0,02$	$1,46^b \pm 0,02$	$97,58^b \pm 0,02$
3	$14,22^c \pm 0,02$	$0,93^{bc} \pm 0,04$	$1,41^c \pm 0,02$	$97,66^c \pm 0,01$
4	$14,18^c \pm 0,03$	$0,90^{bc} \pm 0,04$	$1,40^c \pm 0,01$	$97,70^c \pm 0,05$
5	$14,14^c \pm 0,04$	$0,89^c \pm 0,04$	$1,40^c \pm 0,01$	$97,71^c \pm 0,03$

*Các chữ cái <sup>a, b, c</sup> trong cùng một cột khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mức nghiệm thức với  $p < 0,05$ .*

### 3.2. Đánh giá chất lượng của bột chitin tạo thành

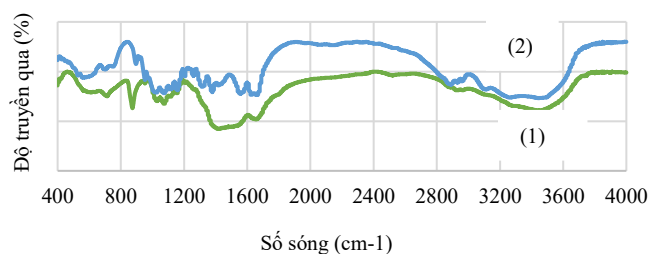
#### 3.2.1. Thành phần hóa học

Phân tích thành phần hóa học cho thấy quá trình xử lý đã giúp loại bỏ hiệu quả khoáng và protein trong bột vỏ ba khía, tạo ra chitin có độ tinh khiết cao. Cụ thể, hàm lượng tro trong nguyên liệu ban đầu là  $41,09 \pm 1,02\%$ , nhưng sau khi xử lý bằng HCl, giá trị này giảm xuống còn  $0,93 \pm 0,04\%$ , chứng minh quá trình khử khoáng đã diễn ra triệt để. Kết quả này phù hợp với phổ FTIR (Hình 1), cho thấy sự biến mất của các đỉnh hấp thụ đặc trưng của muối khoáng, đặc biệt là  $\text{CaCO}_3$ .

Bên cạnh đó, hàm lượng protein trong bột vỏ ba khía ban đầu là  $37,08 \pm 0,71\%$ , nhưng sau khi xử lý bằng HCl kết hợp với NaOH, chỉ còn  $1,41 \pm 0,02\%$ . Điều này cho thấy quá trình khử protein đã hiệu quả, giúp loại bỏ gần như hoàn toàn protein còn sót lại trong nguyên liệu. Độ tinh khiết của chitin sau xử lý đạt  $97,77 \pm 0,03\%$ , với độ ẩm ổn định ở mức  $5,07 \pm 0,02\%$ , cho thấy sản phẩm thu được có chất lượng cao và phù hợp với tiêu chuẩn chitin thương mại.

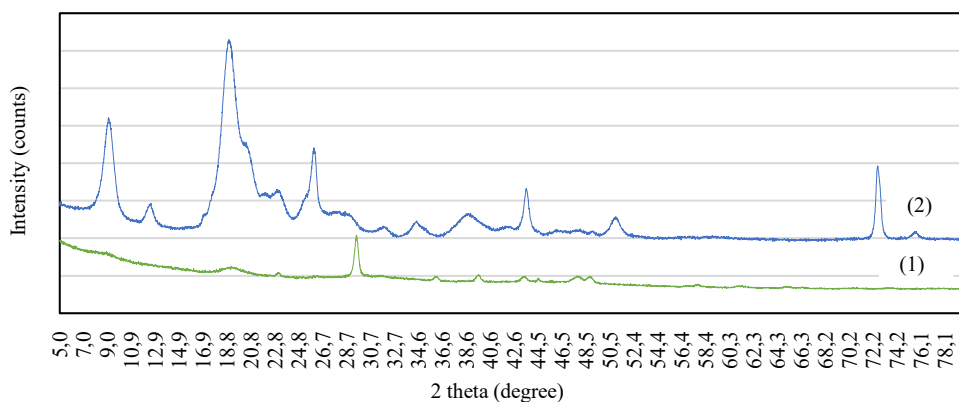
### 3.2.2. Cấu trúc của chitin

Để đánh giá cấu trúc của chitin thu được, mẫu được phân tích bằng các phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), nhiễu xạ tia X (XRD) và hiển vi điện tử quét (SEM). Trong sơ đồ, đỉnh hấp thụ ở bước sóng  $873\text{ cm}^{-1}$  có trong nguyên liệu thô gần như biến mất hoàn toàn trong chitin ba khía được chiết xuất. Sự giảm cường độ cực đại trong chitin được chiết xuất này là kết quả của việc loại bỏ một phần muối khoáng, đặc biệt là  $\text{CaCO}_3$  trong vỏ ba khía, phù hợp với kết quả của Sun và cộng sự [19] và Bradic và cộng sự [24]. Hơn nữa, chitin còn có hai đỉnh ở  $1658$  và  $1625\text{ cm}^{-1}$ , bắt nguồn từ các dao động kéo giãn  $\text{C=O}$  (amid I). Nếu trong phân tử  $\beta$ -chitin chỉ có một đỉnh dao động xung quanh  $1650\text{ cm}^{-1}$  thì đây là các dải phân biệt của  $\alpha$ -chitin [16]. Ngoài ra, dao động kéo dài của nhóm C-N và C-H liên kết với các đỉnh hấp thụ lần lượt ở  $1559\text{ cm}^{-1}$  và  $1314\text{ cm}^{-1}$  và được xác định là amid II và III [16]. Ngoài ra, hai đỉnh hấp thụ ở  $3109\text{ cm}^{-1}$  và  $3448\text{ cm}^{-1}$ , liên quan đến sự kéo dài của các nhóm N-H và OH, tương ứng, cũng được quan sát thấy trong mẫu chitin có nguồn gốc từ vỏ tôm [25].



Hình 1. Phổ FTIR của mẫu bột vỏ ba khía (1) và bột chitin được thu nhận (2)

Để đánh giá độ kết tinh của chitin thu nhận, các mẫu bột chitin sau xử lý và bột vỏ ba khía nguyên liệu được phân tích bằng nhiễu xạ tia X (XRD), kết quả được thể hiện trong Hình 2. Phổ XRD của bột vỏ ba khía nguyên liệu cho thấy một đỉnh nhiễu xạ rõ nét tại khoảng  $29,50^\circ$ , đây là đặc trưng của canxi cacbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) [23]. Tuy nhiên, sau quá trình xử lý khử khoáng, đỉnh này đã hoàn toàn biến mất trên phổ XRD của bột chitin, chứng minh rằng phần lớn khoáng chất trong vỏ ba khía đã được loại bỏ hiệu quả. Ngoài ra, chitin thu nhận có các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng tại  $9,02^\circ$ ,  $12,53^\circ$ ,  $18,97^\circ$ ,  $25,98^\circ$ ,  $31,73^\circ$ ,  $34,49^\circ$ ,  $38,91^\circ$ ,  $43,51^\circ$ ,  $50,92^\circ$ ,  $72,55^\circ$  và  $75,58^\circ$ . Trong đó, hai đỉnh chính tại  $9,02^\circ$  và  $18,97^\circ$  là đặc trưng của cấu trúc  $\alpha$ -chitin, phù hợp với các nghiên cứu trước đó [13]. Sự xuất hiện của những đỉnh nhiễu xạ nhỏ khác phản ánh sự sắp xếp tinh thể của chitin và xác nhận rằng chitin thu nhận có cấu trúc ổn định. Vị trí và cường độ của các đỉnh này tương đồng với chitin chiết xuất từ các loài giáp xác khác như *Litopenaeus vannamei* và *Penaeus monodon* [13], chứng minh rằng phương pháp xử lý đã không làm thay đổi đáng kể cấu trúc tinh thể tự nhiên của chitin.

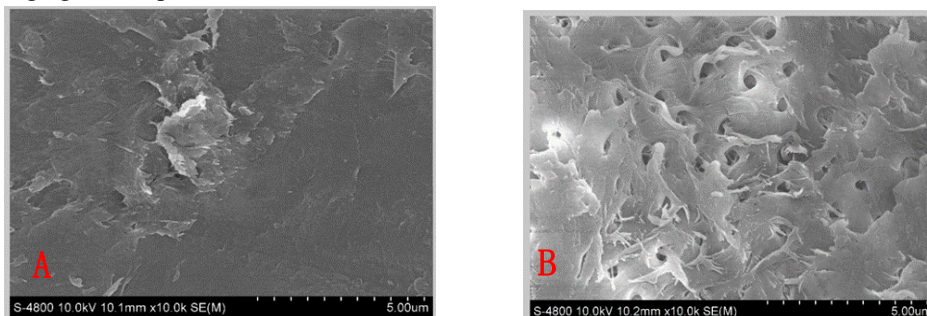


Hình 2. Nhiễu xạ tia X của mẫu bột vỏ ba khía (1) và bột chitin được thu nhận (2)

Chỉ số kết tinh (CrI) của các mẫu được xác định bằng phương pháp Segal nhằm định lượng mức độ sắp xếp trật tự của các chuỗi polymer chitin. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chỉ số CrI của bột chitin sau xử lý đạt  $69,50\%$ , cao hơn đáng kể so với  $66,90\%$  của bột vỏ ba khía nguyên liệu. Sự gia tăng này có thể được lý giải bởi quá trình khử khoáng và khử protein hiệu quả, giúp các chuỗi polymer chitin tái

tổ chức thành cấu trúc tinh thể có độ trật tự cao hơn. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu [13, 16, 26], trong đó ghi nhận rằng khi loại bỏ tạp chất, độ kết tinh của chitin tăng lên đáng kể.

Như vậy, quá trình xử lý không chỉ giúp loại bỏ triệt để khoáng chất và protein mà còn góp phần cải thiện độ kết tinh của chitin thu nhận. Đây là một lợi thế quan trọng, vì độ kết tinh cao giúp cải thiện tính chất cơ học, độ bền nhiệt và mở rộng tiềm năng ứng dụng của chitin trong nhiều lĩnh vực như y sinh, công nghệ thực phẩm và vật liệu sinh học.



Hình 3. Ảnh kính hiển vi điện tử quét SEM của (A) bột vỏ ba khía nguyên liệu, (B) bột chitin thu được

Hình thái bề mặt của bột vỏ ba khía nguyên liệu và chitin thu được sau quá trình xử lý được phân tích bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) nhằm đánh giá hiệu quả của quá trình khử khoáng và khử protein. Hình ảnh SEM (Hình 3A) cho thấy bề mặt bột vỏ ba khía nguyên liệu có cấu trúc nhám, không xốp, phản ánh sự hiện diện của các tạp chất vô cơ như muối khoáng cũng như protein bám dính trên bề mặt. Ngược lại, hình ảnh SEM của chitin sau xử lý (Hình 3B) cho thấy sự hình thành cấu trúc xốp với bề mặt nhẵn hơn, chứng tỏ quá trình khử khoáng và khử protein đã diễn ra hiệu quả, loại bỏ đáng kể các thành phần không mong muốn. Việc hình thành các lỗ nhỏ trên bề mặt chitin sau xử lý có thể là do sự hòa tan của muối khoáng trong dung dịch HCl và sự phân hủy của protein dưới tác động của quá trình xử lý hóa học. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây [27], cho thấy sự thay đổi hình thái bề mặt là một chỉ số quan trọng về mức độ tinh sạch của chitin. Ngoài ra, mức độ deacetyl hóa của chitin thu nhận đạt trên 90%, cho thấy cấu trúc polymer đã được xử lý hiệu quả, tạo điều kiện thuận lợi cho các ứng dụng trong công nghiệp và y sinh.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã tối ưu hóa quy trình khử khoáng vỏ ba khía để thu nhận chitin có độ tinh khiết cao. Các thông số ảnh hưởng đến quá trình khử khoáng, bao gồm nồng độ HCl, tỉ lệ nguyên liệu/dung dịch, nhiệt độ, và thời gian xử lý, đã được khảo sát nhằm xác định điều kiện phù hợp. Kết quả thực nghiệm cho thấy, khi sử dụng HCl 5%, tỉ lệ nguyên liệu/dung dịch 1:30 (w/v), nhiệt độ 60°C, và thời gian xử lý 3 giờ, chitin thu nhận có hàm lượng tro 0,93%, hàm lượng protein 1,41%, độ tinh khiết đạt 97,66%, với hiệu suất thu hồi 14,22%. Phân tích phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) xác nhận quá trình khử khoáng và khử protein diễn ra hiệu quả, loại bỏ đáng kể tạp chất vô cơ và protein, qua đó đảm bảo chất lượng chitin cao. Hình ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy cấu trúc bề mặt chitin trở nên xốp hơn sau xử lý, minh chứng cho hiệu quả của quá trình khử khoáng và khử protein trong việc cải thiện đặc tính vật lý của chitin. Kết quả nghiên cứu này không chỉ cung cấp quy trình hiệu quả để thu nhận chitin từ vỏ ba khía, mà còn mở ra tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp chế biến sinh học. Trong tương lai, cần có thêm nghiên cứu để cải thiện hiệu suất thu hồi và mở rộng ứng dụng của chitin trong các lĩnh vực khác nhau.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này do Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 103/HĐ-DCT ngày 15 tháng 8 năm 2023.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. I. Leonida, S. Ballon, E. F. B. Barredo, C. Borreros, M. S. Golez, J. Arbizo, and J. Baylon, "Gonadal development of tree-climbing mangrove crab *Episesarma mederi* (H. Milne Edwards, 1853) from Capiz, Philippines," *Asian Fisheries Science*, vol. 33, pp. 287–299, 2020, doi: <https://doi.org/10.33997/j.afs.2020.33.3.010>.

- [2] Châu Tài Tào, Lý Văn Khánh, Võ Nam Sơn, Trần Nguyễn Duy Khoa, Trần Ngọc Hải, “Ảnh hưởng của thức ăn lên tăng trưởng và tỉ lệ sống của Ba khía (*Sesarma mederi*) giai đoạn ương giống,” *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Trà Vinh*, vol. 13, pp. 37–42, 2023.
- [3] Nguyễn Thanh Dũng, “Ba khía vào mùa,” *Cà Mau Online*, 2024. [Online]. Available: [https://baocamau.vn/ba-khia-va-o-mua-a34913.html?utm\\_source=chatgpt.com](https://baocamau.vn/ba-khia-va-o-mua-a34913.html?utm_source=chatgpt.com).
- [4] Kim Loan, “Nhớ mùa Ba Khía hội,” *VOV Giao thông*, 2024. [Online]. Available: [https://vovgiaothong.vn/newsaudio/nho-mua-ba-khia-hoi-d40903.html?utm\\_source=chatgpt.com](https://vovgiaothong.vn/newsaudio/nho-mua-ba-khia-hoi-d40903.html?utm_source=chatgpt.com).
- [5] Nguyễn Phú, Chí Diễm, “Ba Khía xuất ngoại,” *Cà Mau Online*, 2024. [Online]. Available: <https://baocamau.vn/ba-khia-xuat-ngoai-a30827.html?utm.com>.
- [6] S. I. Ahmad, R. Ahmad, M. S. Khan, R. Kant, S. Shahid, L. Ghulam, G. M. Hasan, and M. I. Hassan, “Chitin and its derivatives: Structural properties and biomedical applications,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 164, pp. 526–539, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.098>.
- [7] S. L. Pandharipande and P. H. Bhagat, “Synthesis of Chitin from Crab Shells and its Utilization in Preparation of Nanostructured Film,” *International Journal of Science, Engineering and Technology Research*, vol. 5, no. 5, pp. 1378–1383, 2016.
- [8] AOAC Official Method 930.15 - Loss on Drying (Moisture) for Feeds (2023).
- [9] AOAC Official Method 942.05 - Ash (2000).
- [10] N. J. Kruger, “The Bradford Method for Protein Quantitation,” in *The Protein Protocols Handbook*, pp. 17–24, doi: [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4).
- [11] K. Morgan, C. Conway, S. Faherty, and C. Quigley, “A Comparative Analysis of Conventional and Deep Eutectic Solvent (DES)-Mediated Strategies for the Extraction of Chitin from Marine Crustacean Shells,” *Molecules*, vol. 26, no. 24, Art. no. 7603, 2021, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26247603>.
- [12] M. Feng, X. Lu, J. Zhang, Y. Li, C. Shi, L. Lu, and S. Zhang, “Direct conversion of shrimp shells to O-acylated chitin with antibacterial and anti-tumor effects by natural deep eutectic solvents,” *Green Chemistry*, vol. 21, no. 1, pp. 87–98, 2019, doi: <https://doi.org/10.1039/C8GC02506A>.
- [13] 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 Advances*, vol. 12, no. 35, pp. 22631–22638, 2022, doi: <https://doi.org/10.1039/D2RA03417D>.
- [14] K. Mohan, T. Muralisankar, R. Jayakumar, and C. Rajeevgandhi, “A study on structural comparisons of  $\alpha$ -chitin extracted from marine crustacean shell waste,” *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, vol. 2, Art. no. 100037, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100037>.
- [15] P. S. Saravana, T. C. Ho, S.-J. Chae, Y.-J. Cho, J.-S. Park, H.-J. Lee, and B.-S. Chun, “Deep eutectic solvent-based extraction and fabrication of chitin films from crustacean waste,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 195, pp. 622–630, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.018>.
- [16] M. Rinaudo, “Chitin and chitosan: Properties and applications,” *Progress in Polymer Science*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.
- [17] N. H. K. Al Shaqsi, H. A. S. Al Hoqani, M. A. Hossain, and M. A. Al Sibani, “Optimization of the demineralization process for the extraction of chitin from Omani *Portunus segnis*,” *Biochemistry and Biophysics Reports*, vol. 23, Art. no. 100779, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100779>.
- [18] X. Sun, Q. Wei, Y. Yang, Z. Xiao, and X. Ren, “In-depth study on the extraction and mechanism of high-purity chitin based on NADESs method,” *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 10, no. 1, Art. no. 106859, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106859>.
- [19] J. Pohling, D. Dave, Y. Liu, W. Murphy, and S. Trenholm, “Two-step demineralization of shrimp (*Pandalus borealis*) shells using citric acid: An environmentally friendly, safe and cost-effective alternative to the traditional approach,” *Green Chemistry*, vol. 24, no. 3, pp. 1141–1151, 2022, doi: <https://doi.org/10.1039/D1GC03140F>.

- [20] K. L. B. Chang and G. Tsai, "Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melantho*) shell waste," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45, no. 5, pp. 1900–1904, 1997, doi: <https://doi.org/10.1021/jf9606870>.
- [21] Nguyễn Công Minh, Nguyễn Văn Hòa, Phạm Thị Đan Phượng, Trang Sĩ Trung, "Nghiên cứu cải tiến quy trình thu nhận chitin từ phế liệu tôm bằng kết hợp xử lý nhiệt và tẩy màu," *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, vol. 59, no. 2, pp. 27–33, 2017.
- [22] Lê Thị Minh Thủy, Nguyễn Văn Thơm, "Nghiên cứu chiết xuất glucosamine hydrochlorua từ vỏ tôm sú (*Penaeus monodon*)," *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, vol. 56, pp. 231–238, 2020, doi: <https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2020.059>.
- [23] B. Bradić, U. Novak, and B. Likozar, "Crustacean shell bio-refining to chitin by natural deep eutectic solvents," *Green Processing and Synthesis*, vol. 9, no. 1, pp. 13–25, 2020, doi: <https://doi.org/10.1515/gps-2020-0002>.
- [24] Z. Limam, S. Selmi, S. Sadok, and A. El Abed, "Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: Biological and physicochemical properties," *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 4, pp. 640–647, 2011, doi: <https://doi.org/10.5897/AJB10.209>.
- [25] M. Bisht, I. P. E. Macário, M. C. Neves, J. L. Pereira, S. Pandey, R. D. Rogers, J. A. P. Coutinho, and S. P. M. Ventura, "Enhanced dissolution of chitin using acidic deep eutectic solvents: A sustainable and simple approach to extract chitin from crayfish shell wastes as alternative feedstocks," *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, vol. 9, no. 48, pp. 16073–16081, 2021, doi: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c04255>.
- [26] S.-K. Kim, *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*. CRC Press, 2010, doi: <https://doi.org/10.1201/EBK1439816035>.
- [27] Y. I. Cho, H. K. No, and S. P. Meyers, "Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, no. 9, pp. 3839–3843, 1998, doi: <https://doi.org/10.1021/jf971047f>.

## ABSTRACT

### EXTRACTION OF CHITIN FROM *Sesarma mederi* SHELLS USING CHEMICAL TREATMENT

Tran Chi Hai<sup>1\*</sup>, Vo Thi Diem Quyen<sup>1</sup>, Dinh Quoc Tuan<sup>1</sup>, Mai Tien Hung<sup>1</sup>,  
Pham Ngoc Tram<sup>1</sup>, Ho Nhu Truc<sup>1</sup>, Phan Van Man<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Faculty of Food Science and Technology,*

*Ho Chi Minh City University of Industry and Trade, Vietnam*

<sup>2</sup>*Faculty of Tourism, Ba Ria-Vung Tau College of Technology, Vietnam*

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

The shell of *Sesarma mederi*, a byproduct of fermented crab (*mam ba khia*) production, is rich in minerals and proteins, requiring proper processing to obtain high-purity chitin. This study examines the effectiveness of hydrochloric acid (HCl) in the demineralization step of chitin extraction. The results show that optimal mineral removal is achieved using a 5% HCl solution with a material-to-solvent ratio of 1:30 (w/v), at 60°C for 3 hours. After demineralization, the sample underwent NaOH treatment to remove residual proteins, yielding chitin with a mineral content below 1.0% and a purity of approximately 97.66%. Structural analysis using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), and scanning electron microscopy (SEM) confirmed the efficient removal of minerals and proteins. The extracted chitin was identified as predominantly  $\alpha$ -chitin. This study highlights the potential of conventional chemical processing for chitin recovery from *Sesarma mederi* shells, offering a sustainable approach to utilizing seafood byproducts and expanding their applications in industrial and biotechnological fields.

**Keywords:** Chitin, demineralization, HCl, *Sesarma mederi* shells.