

KHẢO SÁT QUÁ TRÌNH KHỬ KHOÁNG VÀ PROTEIN ĐỂ THU NHẬN CHITIN TỪ VỎ ĐẦU TÔM THÊ CHÂN TRẮNG (*Penaeus vannamei*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP BÁN SINH HỌC

Trần Quốc Huy

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

Email: huyvinbio@gmail.com

Ngày nhận bài: 27/01/2021; Ngày chấp nhận đăng: 14/4/2021

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành quá trình khử khoáng và protein từ vỏ đầu tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) bằng phương pháp hóa học và enzyme để đánh giá hiệu suất khử khoáng và protein giữa các phương pháp xử lý. Các thí nghiệm được thực hiện qua 3 giai đoạn: (1) Khử khoáng bằng acid HCl 1N, tỷ lệ nguyên liệu/ dung dịch acid 1/3 (w/v) ở 130 °C trong 2 đến 4 giờ; (2) Khử protein với enzyme SEB Digest F35P, tỷ lệ enzyme/ nguyên liệu 0,05 đến 0,25% (w/w) pH 3 ở 55 °C trong 24 giờ; (3) Tiếp tục khử khoáng và protein bằng NaOH 35% trong 2 đến 6 giờ ở 80 °C. Kết quả thí nghiệm thu được sản phẩm chitin có hàm lượng khoáng ở mức 7,2% (hiệu suất khử khoáng 92,8%), khử protein 10,1% (hiệu suất khử 89,9%) trong điều kiện HCl 1N, tỷ lệ nguyên liệu/ dung dịch acid 1/3 (w/v) ở 130 °C trong 3 giờ; thủy phân protein với nồng độ enzyme 0,02%, pH 3 ở 55 °C trong 24 giờ; sau đó xử lý NaOH 35% trong 6 giờ ở 80 °C.

Từ khóa: Chitin, khử khoáng, khử protein, phế liệu đầu tôm, thu nhận chitin.

1. GIỚI THIỆU

Trong năm 2020, với nguồn sản lượng tôm trong nước đạt khoảng 2,5 triệu tấn, trong đó lượng phế phẩm đầu tôm khoảng 500 ngàn tấn, mới chỉ được xử lý khoảng 30% làm chitin, chitosan, 40% được sử dụng vào làm thức ăn chăn nuôi và thủy sản, và phần còn lại chưa được xử lý [1]. Vì thế, ngành chế biến tôm ngày càng phát triển dẫn đến tích lũy một lượng lớn phế liệu vỏ tôm và đầu tôm từ các nhà máy chế biến thủy sản. Lượng phế liệu này nếu không được xử lý sẽ gây lãng phí và ô nhiễm môi trường. Nguồn phế liệu vỏ tôm và đầu tôm rất giàu các thành phần có giá trị như protein, lipid, chitin và canxi có thể được sử dụng để tạo ra giá trị cao trong đó có chitin, chitosan và glucosamine được ứng dụng sản xuất nhiều nhất hiện nay [2, 3].

Công nghệ sản xuất chitin bằng phương pháp hóa học là phương pháp đang được sử dụng rộng rãi, việc sử dụng acid mạnh và bazơ để hòa tan calcium carbonate và protein tương ứng đã được các nhà nghiên cứu trong và ngoài nước sử dụng, với ưu điểm khử được khá triệt để các tạp chất khoáng, protein [2, 4, 5]. Tuy nhiên, chi phí cao và nước thải có hại từ việc sản xuất đã mang lại nhiều hệ quả xấu cho môi trường [2].

Do đó, các phương pháp sinh học như sử dụng enzyme (viscozyme và alcalase) [6], vi sinh vật (vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*) [7] đã được triển khai nghiên cứu để khắc phục nhược điểm của phương pháp hóa học. Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu còn chưa được áp dụng rộng rãi vì vẫn tồn tại nhiều hạn chế, đặc biệt là thời gian xử lý thường rất dài như việc chiết xuất chitin và chitosan từ chất thải tôm *Litopenaeus vannamei*, vật liệu đã được khử khoáng với acid lactic trong 36 giờ ở 21 °C, thủy phân bằng enzyme viscozyme và alcalase [6, 8]. Chất rắn còn

lại trong vật liệu đã được khử acetyl với 40% NaOH dung dịch trong 4 giờ ở 110 °C [5] hay lên men acid lactic nhờ vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* trong 4 và 6 ngày [9].

Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là thử nghiệm khử khoáng và protein bằng phương pháp kết hợp giữa hoá học và sinh học để thu nhận chitin thô và qua đó hạn chế một số mặt của phương pháp hoá học và góp phần thúc đẩy việc áp dụng các phương pháp sinh học vào thực tiễn, giảm tác động xấu đến môi trường và nâng cao được hiệu quả sử dụng tài nguyên.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Phế phẩm đầu tôm được lấy từ Công ty Cổ phần 3 Con tôm, KCN Trà Nóc, Tp. Cần Thơ. Nguyên liệu sau khi lấy được vận chuyển ngay bằng thùng xốp cách nhiệt có nhiệt độ < 0 °C về phòng thí nghiệm và được bảo quản < -10 °C cho tới khi thí nghiệm được thực hiện.

Chế phẩm enzyme thương mại protease: Enzyme SEB Digest F35P xuất xứ Advandzyme - Ấn Độ.

Hóa chất tinh khiết được sử dụng trong nghiên cứu là: HCl 1N, NaOH 35%.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm 1: Phân tích thành phần hoá học của vỏ đầu tôm thẻ chân trắng

Phân tích thành phần cơ bản của vỏ đầu tôm thẻ chân trắng: Protein, chitin, lipid, khoáng tổng, ẩm độ.

Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng thời gian phản ứng của HCl đến quá trình khử khoáng trên vỏ đầu tôm thẻ

Vỏ đầu tôm sau khi được ép bỏ dịch (được ứng dụng trong quy trình khác), lấy bã sau đó tiến hành khử khoáng với 100 g vỏ đầu tôm được ngâm trong dung dịch HCl 1N với tỷ lệ nguyên liệu/ dung dịch acid 1/3 (w/v) ở 130 °C trong 0, 12, 24 và 36 giờ.

Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng nồng độ enzyme đến quá trình khử protein trên vỏ đầu tôm thẻ

Mẫu vỏ đầu tôm sau khi khử khoáng được rửa sạch tiến hành khử protein bằng enzyme protease SEB Digest F35P, tỷ lệ bã đầu tôm/ nước là 1/3; tỷ lệ enzyme/ nguyên liệu 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 và 0,25% (w/w), pH 3 ở 55 °C với thời gian khảo sát 24 giờ.

Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng thời gian phản ứng của NaOH đến quá trình khử khoáng và protein trên vỏ đầu tôm thẻ

Sau thời gian thủy phân mẫu vỏ đầu tôm được rửa sạch, tiếp tục khử khoáng và protein một lần nữa bằng NaOH 35% [5] với tỷ lệ bã rắn/ dung dịch NaOH là 1:5 ở 80 °C trong 0, 2, 4 và 6 giờ.

2.3. Phương pháp phân tích

Xác định độ ẩm: Xác định bằng phương pháp sấy theo AOAC (2000) số 930.15.

Xác định hàm lượng protein: theo phương pháp Kjeldal, TCVN 3705-90, qui định phương pháp xác định hàm lượng nitơ tổng số và protein thô đối với các nguyên liệu, bán thành phẩm và sản phẩm thủy sản.

Xác định hàm lượng lipid: xác định hàm lượng chất béo trong nguyên liệu, bán thành phẩm và sản phẩm thủy sản theo TCVN 2703:2009.

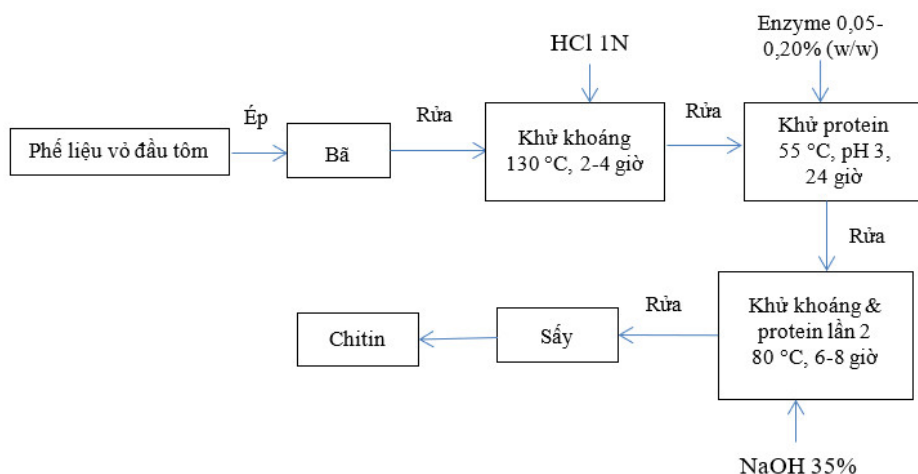
Xác định hàm lượng khoáng: theo phương pháp xác định hàm lượng tro tổng số: TCVN 5105:2009, Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng tro tổng số và tro không tan trong nước trong nguyên liệu, bán thành phẩm và sản phẩm thủy sản.

Xác định hàm lượng chitin: Xác định hàm lượng chitin theo phương pháp của Cho và cộng sự (1998) [10].

Định tính chitin: phương pháp hấp thụ phổ hồng ngoại FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy).

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu báo cáo là trung bình của 3 lần phân tích. Kết quả được phân tích thống kê bằng phần mềm Statgraphics, được phân tích phương sai 1 nhân tố ANOVA. Giá trị của $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa về mặt thống kê.



Hình 1. Sơ đồ quy trình sản xuất chitin bằng phương pháp bán sinh học.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần hóa học của vỏ tôm thể chân trắng

Vỏ tôm sau khi thu nhận từ nhà máy được tiến hành phân tích thành phần hóa học cơ bản và kết quả phân tích được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hóa học cơ bản của vỏ đầu tôm thể chân trắng

Thành phần hóa học	Hàm lượng* (%)	Phương pháp
Chitin	17,3 ± 0,8	Cho và cộng sự (1998)
Hàm lượng protein	38,5 ± 1,1	TCVN 3705:90
Hàm lượng khoáng	30,6 ± 1,2	TCVN 5105:2009
Hàm lượng lipid	2,1 ± 0,4	TCVN 2703:2009

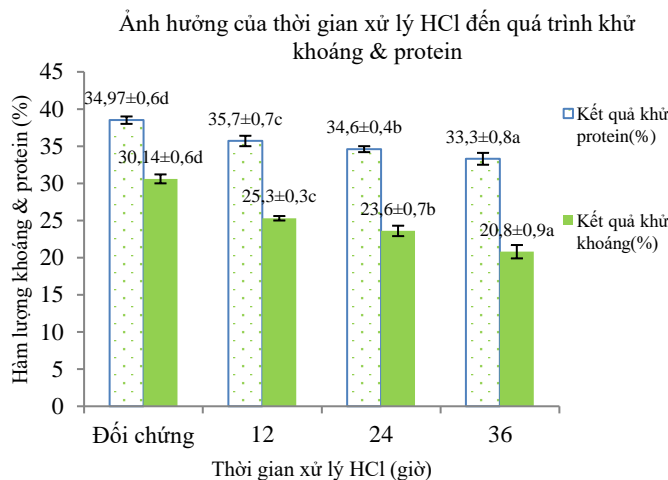
*Tính trên khối lượng khô tuyệt đối; độ ẩm của vỏ tôm tươi là 80 ± 1,5%

Dựa vào kết quả phân tích cho thấy thành phần vỏ đầu tôm gồm 3 thành phần chính: chitin (17,3%), protein (38,5%), khoáng (27,6%) và lipid chiếm một phần khá nhỏ 2,1%. Kết quả này cho thấy có sự tương đồng với công bố của Gopakumar [11]. Hiện nay, để thu nhận chitin từ phế liệu vỏ đầu tôm cần tiến hành thực hiện 2 bước chính đó là khử khoáng và khử protein.

Tuy nhiên, cần lưu ý đến các liên kết chặt chẽ giữa protein, khoáng và chitin chúng có kết cấu phức tạp và rất khó để tách, dẫn đến gây khó khăn cho việc thu nhận chitin [10].

3.2. Thời gian phản ứng của HCl 1N ảnh hưởng đến quá trình khử khoáng trên vỏ đầu tôm thu nhận chitin

Tiến hành thí nghiệm khử khoáng và protein trên vỏ đầu tôm thẻ chân trắng bằng HCl 1N, ghi nhận kết quả tỷ lệ phần trăm khoáng còn lại trên vỏ ở những mốc thời gian khác nhau: 0, 12, 24, 36 giờ.



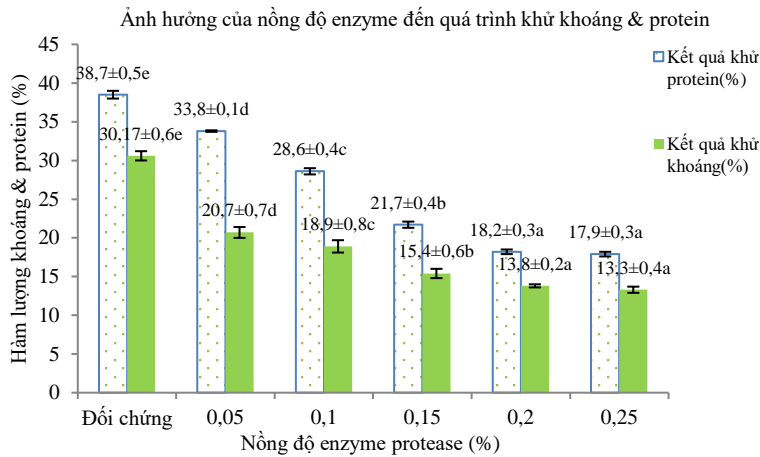
Hình 2. Kết quả khử khoáng và protein theo thời gian phản ứng của HCl

Kết quả Hình 2 cho thấy, thời gian phản ứng của HCl 1N khác nhau ảnh hưởng đến khả năng loại khoáng vỏ đầu tôm thẻ chân trắng. Thời gian xử lý càng dài hàm lượng protein và khoáng còn lại càng giảm, hiệu suất khử protein và khử khoáng tăng dần. Nghiệm thức đối chứng hàm lượng protein và khoáng cao nhất lần lượt là 38,5%, 30,6%. Ở nghiệm thức 36 giờ cho kết quả khử khoáng và protein tốt nhất với hàm lượng khoáng còn lại là 20,8% và protein là 33,1%. Tuy nhiên, kết quả nghiệm thức 36 giờ chênh lệch không đáng kể so với 24 giờ ($p < 0,05$). Năng lượng tiêu tốn và thời gian xử lý làm tăng chi phí sản xuất. Do đó, chúng tôi cân nhắc tiết kiệm thời gian và giảm chi phí sản xuất nên lựa chọn 24 giờ là phù hợp. Các kết quả phân tích $p < 0,05$ cho thấy thí nghiệm này có ý nghĩa về mặt thống kê.

Tuy nhiên, kết quả xử lý 24 giờ vẫn còn hàm lượng khoáng và protein khá cao. Tiếp tục tiến hành thí nghiệm tiếp theo nâng cao hiệu quả khử khoáng và protein cho quy trình thu nhận chitin.

3.3. Nồng độ protease ảnh hưởng đến khả năng loại protein và khoáng trên vỏ tôm thu nhận chitin

Khảo sát sự ảnh hưởng của protease đến quá trình khử khoáng và protein trên vỏ đầu tôm thẻ chân trắng bằng protease SEB Digest F35 với nồng độ: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 và 0,25% ghi nhận kết quả như sau:



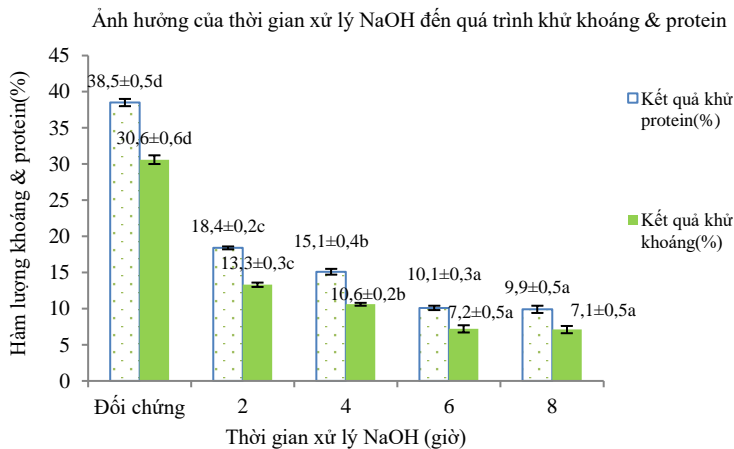
Hình 3. Kết quả khử khoáng và protein theo nồng độ enzyme

Từ Bảng 3 cho thấy nồng độ enzyme khác nhau ảnh hưởng đến khả năng khử khoáng và protein trên vỏ tôm thẻ là khác nhau. Nồng độ enzyme càng tăng thì protein bị khử càng nhiều, kết quả hàm lượng protein còn lại giảm dần theo. Nồng độ enzyme tỷ lệ thuận với lượng protein hòa tan [12, 13]. Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng protein còn lại trong mẫu ở nồng độ protease 0,25% là thấp nhất 17,9%. Hàm lượng khoáng còn lại cũng giảm dần theo nồng độ enzyme cho thấy quá trình thủy phân các liên kết khoáng và thành phần khác cũng được bề gãy.

Từ đó, có thể kết luận rằng tỷ lệ khử khoáng tăng khi mẫu được xử lý với các nồng độ enzyme khác nhau so với khi mẫu không được xử lý với enzyme (đối chứng), đồng thời mẫu có nồng độ protease 0,25% cho kết quả tốt nhất với kết quả khử khoáng còn lại là 13,3%. Tuy nhiên hàm lượng khoáng và protein còn lại của nghiệm thức 0,20% lần lượt là 13,8%, 18,2% chênh lệch không nhiều ($p < 0,05$) so với nghiệm thức 0,25%. Để hợp lý hoá về chi phí kinh tế, chúng tôi chọn nồng độ enzyme là 0,20% làm nồng độ thích hợp để loại bỏ khoáng và protein trên vỏ tôm thẻ.

3.4. Thời gian phản ứng của NaOH ảnh hưởng đến sự khử khoáng và protein trên vỏ đầu tôm thu nhận chitin

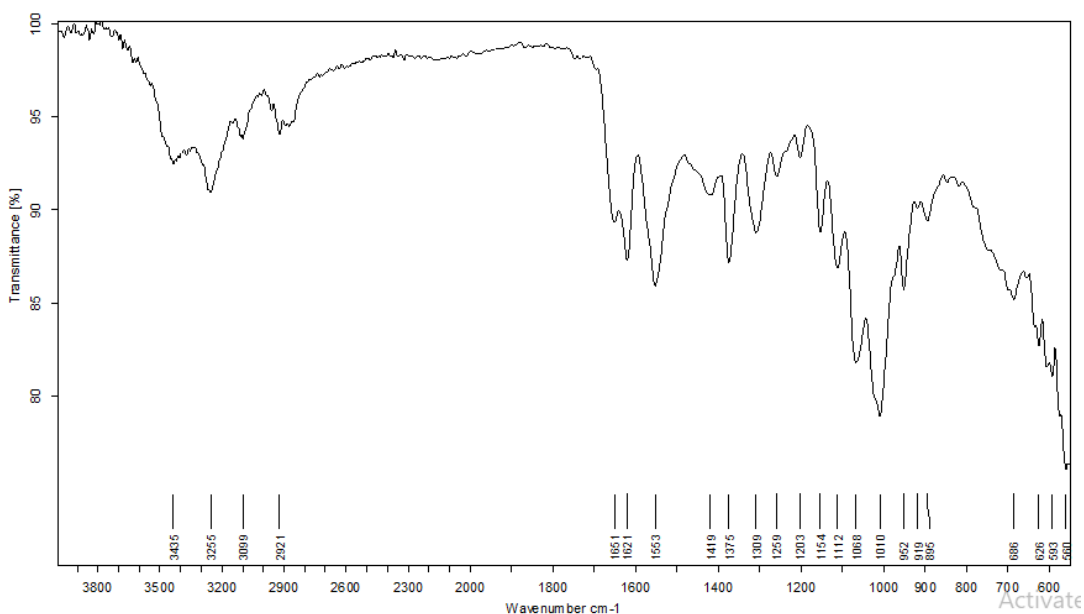
Khảo sát khả năng khử khoáng và protein trên vỏ đầu tôm thẻ chân trắng của NaOH 35% ở những thời gian 0, 2, 4, 6 và 8 giờ, nhiệt độ 80 °C ghi nhận kết quả như sau:



Hình 4. Kết quả khử khoáng và protein theo thời gian phản ứng của NaOH

Từ kết quả Hình 4 cho thấy khi thời gian xử lý NaOH 35% khác nhau thì cho kết quả khác nhau. Trong đó, hàm lượng protein và khoáng trên vỏ đầu tôm giảm dần theo thời gian xử lý từ 2 đến 8 giờ; nghiệm thức 8 giờ cho kết quả tốt nhất với hàm lượng protein còn lại là 9,9% và hàm lượng khoáng còn lại là 7,1%. Tuy nhiên, kết quả khử khoáng và protein của nghiệm thức 6 giờ không quá khác biệt về mặt số liệu và có cùng ý nghĩa về mặt thống kê so với mẫu 8 giờ. Với hàm lượng khoáng và protein còn lại của nghiệm thức 6 giờ lần lượt là 10,1%, 7,2%. Vì vậy, trong các nghiệm thức được khảo sát có thể chọn thời gian phản ứng với NaOH là 6 giờ làm thời gian thích hợp để tăng hiệu quả loại bỏ khoáng và protein trên vỏ tôm thẻ theo đó giúp tiết kiệm thời gian, chi phí. Với kết quả phân tích $p < 0,05$ cho thấy kết quả này có ý nghĩa về mặt thống kê.

Kết quả phân tích phổ hồng ngoại Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - phổ FTIR)



Hình 5. Phổ hồng ngoại của chitin tách chiết từ vỏ đầu tôm thẻ chân trắng

Kết quả cho thấy, các dao động đặc trưng với các nhóm chức trong phân tử chitin tại 3435 cm^{-1} (-OH), 2921, 1419 và 1375 cm^{-1} (-CH), 1651 và 1621 cm^{-1} (Amide bậc 1), 1553 cm^{-1} (Amide bậc 2). Từ kết quả các nhóm chức quang phổ hấp thụ trên Hình 5 khẳng định đây là chitin. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Rinaudo [14].



Hình 6. Hình vỏ đầu tôm đã sấy khô (trái), chitin thô đã sấy khô của nghiên cứu này (phải)

Bảng 2. So sánh kết quả khử khoáng của chitin thô nghiên cứu với chitin thô trên thị trường

STT	Sản phẩm chitin	Nguyên liệu	Hàm lượng khoáng (%w/w)	Hàm lượng protein (%w/w)	Phương pháp	Thời gian xử lý (giờ)	Dịch xả thải (lít/kg chitin)
1	Chitin nghiên cứu	Vỏ đầu tôm	7,2	10,1	Bán sinh học	48	27
2	Phuong Duy, Việt Nam	Vỏ tôm	3,0	5,3	Hoá học	72	60
3	Angel, Trung Quốc	Vỏ tôm	1,0	5,0	Hoá học	72	60

Sản phẩm chitin của thí nghiệm là từ vỏ đầu tôm có hàm lượng khoáng cao hơn và cấu trúc vỏ khó xử lý hơn [14, 15] nên kết quả hàm lượng khoáng và protein còn cao hơn các sản phẩm thương mại. Vì thế, chúng tôi sẽ có nghiên cứu thu nhận chitin trên vỏ tôm để có thể so sánh chính xác hơn cho lần công bố tiếp theo.

4. KẾT LUẬN

Từ phế liệu vỏ đầu tôm, chitin đã được tách chiết thành công với hàm lượng protein còn lại trên vỏ là 10,2, hàm lượng khoáng còn lại 7,2%. Hiệu suất khử khoáng đạt 80%. Điều kiện thích hợp nhất được đề xuất để sản xuất chitin từ phế liệu vỏ tôm gồm: tỷ lệ nguyên liệu:dung dịch acid HCl là 1:3; khử khoáng ở 3 giờ, 130 °C; khử protein với enzyme SEB Digest F35P ở 55 °C, với thời gian phản ứng là 24 giờ tại pH 3.

Việc kết hợp biện pháp sinh học với hóa học đã góp phần giảm đi lượng hóa chất, góp phần giảm ô nhiễm môi trường (giảm đi hơn 50% dịch xả thải), giảm 1/3 thời gian xử lý.

Tuy nhiên, hiệu suất khử khoáng và protein bằng phương pháp bán sinh học còn chưa cao bằng phương pháp hoá học. Cần phải được cải tiến hiệu suất khử khoáng và protein trong nghiên cứu tiếp theo thì sẽ có thể đưa vào sản xuất.

Lời cảm ơn: Chân thành cảm ơn Lê Thị Ngọc Diệu và Nguyễn Ngọc Minh Hiền đã cung cấp thêm thông tin trong quá trình tác giả thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. VASEP (Vietnam Association of Seafood Exporters and Producers) - Xuất khẩu tôm thẻ chân trắng 6 tháng đầu năm 2020, Hà Nội (2020).
2. Trang Sĩ Trung - Đánh giá chất lượng sản phẩm và hiệu quả môi trường của quy trình sản xuất chitin cải tiến kết hợp xử lý enzyme, Tạp chí Khoa học Công nghệ Thủy sản **1** (2009) 3-9.
3. Mao X., Guo N., Sun J., & Xue C. - Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review, *Journal of Cleaner Production* **143** (2017) 814–823.
4. Roberts G.A.F. - Chitosan production routes and their role in determining the structure and properties of the product. In: Domard *et al.* (eds.) *Advances in Chitin Sci.* Vol. **2** National Taiwan Ocean University (1997) 22-31.
5. Soon C.Y, Tee Y. B., Tan C. H., Rosnita A. T, & Khalina A. - Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Zophobas morio* larvae in varying sodium hydroxide concentration, *International Journal of Biological Macromolecules* **108** (2018) 135-142.

6. Giyose N.Y., Mazomba N.T. and Mabinya L.V. - Evaluation of proteases produced by *Erwinia chrysanthemi* for the deproteinization of crustacean waste in a chitin production process, African Journal of Biotechnology **9** (5) (2010) 707-711.
7. Nguyễn Thị Ngọc Hoài, Ngô Thị Hoài Dương, Ngô Đăng Nghĩa - Tối ưu hóa quá trình thủy phân protein từ đầu tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) bằng alcalase theo phương pháp mặt đáp ứng, Tạp chí Khoa học- Công nghệ Thủy sản **2** (2013) 129-134.
8. Rao M. S., Munoz J., Stevens W. F. - Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp bio waste, Applied Microbiology and Biotechnology **54** (2000) 808-813.
9. Sedaghat F., Yousefzadi M., Toiserkani H., Najafipour S. - Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguensis* using lactic acid fermentation: An alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan, International Journal of Biological Macromolecules **104** (2017) 883-888.
10. Cho Y. I., No H. K., and Meyers S. P. - Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products, Journal of Agricultural and Food Chemistry **46** (9) (1998) 3839-3844.
11. Gopakumar K. - Textbook of fish processing technology, Indian Council of Agricultural Research, New Delhi (2002) 467-483.
12. Win. N. N, G. Pengju, W.F. Stevens , 2000. Deacetylation of chitin by fungal enzymes, In: Uragani *et al.* (eds.) Advances in Chitin Sci. Vol **4**, National Taiwan Ocean University (2000) 55-62.
13. Win N.N, Stevens W.F. - Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase, Applied Microbiology and Biotechnology **57** (3) (2001) 334-341.
14. Rinaudo M. - Chitin and chitosan: Properties and applications, Prog. Polym. Sci. **31** (2006) 603-632.
15. Cho Y.I., No H.K., Meyers S.P. - Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products, J. Agric. Food Chem. **46** (9) (1998) 3839-3843.

ABSTRACT

THE SURVEY OF DEMINERALIZATION AND DEPROTEINIZATION PROCESS IN THE ISOLATION OF CHITIN FROM SHELLS OF SHRIMP HEAD (*Penaeus vannamei*) BY SEMI-BIOLOGICAL METHOD

Tran Quoc Huy
Ho Chi Minh City University of Food Industry
Email: huyvinbio@gmail.com

In this study, we investigated the demineralization and deproteinization process from the white shrimp head shell (*Penaeus vannamei*) by the enzyme-combined chemolysis method. The experiments were carried out in 3 phases: (1) Demineralization with 1N hydrochloric acid, the ratio of raw material/acid solution 1/3 (w/v) at 130 °C for 1-3 hours; (2) Deproteinization with SEB Digest F35P enzyme, enzyme/material ratio 0.05-0.2% (w/w) pH 3 at 55 °C for 24 hours; (3) Next demineralization and deproteinization with 35% NaOH for 2-8 hours at 80 °C. The results of the experiment obtained a chitin product with a mineral content of 7.2% (efficiency 92.8%), protein 10.1% (efficiency 89.9%) with a demineralization efficiency of 80% under the HCl 1N condition, ratio of ingredient/acid solution 1/3 (w/v) at 130 °C for 3 hours; protein hydrolysis with enzyme concentration 0.02%, pH 3 at 55 °C for 24 hours, NaOH 35% for 6 hours at 80 °C.

Keywords: Chitin, demineralization, deproteinization, wastes of shrimp head, isolation of chitin.