

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



TRẦN DUY PHONG

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG MỘT SỐ KỸ THUẬT TIÊN TIẾN VÀ
CÔNG NGHỆ TÍCH HỢP ĐỂ CHẾ BIẾN TOÀN DIỆN RONG NÂU
THÀNH CÁC SẢN PHẨM HỮU ÍCH

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

HÀ NỘI- 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

TRẦN DUY PHONG

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG MỘT SỐ KỸ THUẬT TIÊN TIẾN VÀ
CÔNG NGHỆ TÍCH HỢP ĐỂ CHẾ BIẾN TOÀN DIỆN RONG NÂU
THÀNH CÁC SẢN PHẨM HỮU ÍCH

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Chuyên ngành: Kỹ thuật hóa học

Mã số: 9.52.03.01

Người hướng dẫn khoa học: 1. GS.TS. Phạm Quốc Long

2. PGS.TS. Trần Quốc Toàn

Hà Nội- 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: “Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích” là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày tháng năm 2023

Tác giả luận án
(Ký và ghi rõ họ tên)

Trần Duy Phong

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được hoàn thành tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong thời gian thực hiện nghiên cứu tôi đã nhận được nhiều sự giúp đỡ, đóng góp ý kiến và chỉ bảo tận tình của các thầy cô, anh, chị, em, bạn đồng nghiệp.

Trước hết tôi xin bày tỏ lời cảm ơn chân thành, sâu sắc nhất tới GS. TS Phạm Quốc Long và PSG. TS. Trần Quốc Toàn, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên đã tận tình hướng dẫn và định hướng cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu để hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn sự quan tâm giúp đỡ của Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin cảm ơn tập thể phòng hóa sinh hữu cơ, phòng phân tích hóa học, trung tâm phát triển công nghệ sạch và vật liệu, trung tâm nghiên cứu và phát triển sản phẩm thiên nhiên, trung tâm Hóa thực vật và Công nghệ Nano Y Sinh - Viện hóa học các hợp chất thiên nhiên đã tạo điều kiện cơ sở vật chất giúp tôi hoàn thành nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn tới PGS. TS. Nguyễn Mạnh Cường, PGS. TS Đoàn Lan Phương, PGS. TS Đỗ Hữu Nghị, PGS. TS. Phạm Minh Quân, TS. Đặng Thị Phương Ly, TS. Hoàng Thị Bích, TS. Đinh Thị Thu Thủy, Ths Lại Phương Phương Thảo đã hướng dẫn, góp ý và giúp đỡ cho tôi rất nhiều trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn đề tài nghiên cứu mã số KC.09.23/16-20 đã tạo điều kiện nguyên liệu, hóa chất và trang thiết bị giúp tôi hoàn thành nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc đến gia đình tôi, những người luôn tạo điều kiện, động viên tinh thần cho tôi thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày tháng năm 2023

Tác giả

Trần Duy Phong

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	3
1.1. Giới thiệu rong nâu.....	3
1.1.1. Đặc điểm, phân bố	3
1.1.2. Một số ứng dụng của rong nâu	4
1.1.3. Thành phần hoá học và hoạt tính sinh học.....	5
1.2. Các công nghệ chế biến một số sản phẩm từ rong	13
1.2.1. Công nghệ truyền thống.....	13
1.2.2. Công nghệ hiện đại	21
CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	37
2.1. Nguyên vật liệu và trang thiết bị	37
2.1.1. Nguyên liệu	37
2.1.2. Thiết bị	37
2.2. Các phương pháp nghiên cứu	38
2.2.1. Phương pháp xác định hàm lượng phenolic tổng	38
2.2.2. Phương pháp xác định alginate	38
2.2.3. Phương pháp sàng lọc in silico	39
2.2.4. Phương pháp xác định hàm lượng và thành phần lipid	40
2.2.5. Phương pháp xác định thành phần và hàm lượng các axit béo.....	40
2.2.6. Xác định hàm lượng Fucoidan bằng phương pháp so màu	40
2.2.7. Xác định hàm lượng fucoxanthin.....	42
2.3. Phương pháp đánh giá tác dụng sinh học	43
2.3.1. Phương pháp đánh giá chỉ tiêu an toàn	43
2.3.2. Phương pháp xác định độc tính cấp	43
2.3.3. Nghiên cứu tính độc bán trường diễn	44
2.3.4. Phương pháp đánh giá tác dụng đào thải kim loại nặng	45
2.3.5. Phương pháp đánh giá khả năng chống loãng xương	46
2.3.6. Phương pháp thử hoạt tính chống oxi hóa	48
2.3.7. Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào.....	48
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	49
3.1. Sử dụng kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp chế biến rong mơ.....	49

3.1.1. Sơ đồ và thuyết minh quy trình.....	49
3.1.2. Đánh giá hiệu quả các quá trình chiết xuất.....	52
3.2. Nghiên cứu khảo sát đánh giá nguyên liệu.....	55
3.2.1. Nghiên cứu khảo sát hàm lượng alginate một số loại rong nâu thu hoạch tại biển Việt Nam	55
3.2.2. Nghiên cứu khảo sát hàm lượng các acid béo và lớp chất lipid	59
3.2.3. Nghiên cứu dự đoán khả năng ức chế enzym tyrosinase của một số hợp chất phân lập từ rong mơ	64
3.3. Kết quả nghiên cứu chiết xuất phenolic từ rong mơ	70
3.3.1. Quy trình công nghệ chiết xuất phenolic từ rong mơ theo phương pháp vi sóng	70
3.3.2. Kết quả nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết phenolic từ rong nâu theo phương pháp chiết vi sóng.....	71
3.3.3. Kết quả tối ưu hóa điều kiện chiết xuất phenolic từ rong nâu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM).....	77
3.3.4. Đánh giá hoạt chất cao chiết phenolic	83
3.4. Nghiên cứu quá trình thu nhận fucoidan	84
3.4.1. Quy trình công nghệ chiết xuất Fucoidan bằng phương pháp siêu âm.....	84
3.4.2. Các yếu tố tác động tới quá trình chiết tách fucoidan	87
3.5. Kết quả nghiên cứu chiết xuất alginate từ rong nâu.....	93
3.5.1. Quy trình công nghệ chiết xuất alginate từ rong mơ theo phương pháp tích hợp enzyme và siêu âm.....	93
3.5.2. Kết quả nghiên cứu quá trình thủy phân rong biển bởi enzyme.....	96
3.5.3. Nghiên cứu quá trình thu nhận alginate.....	99
3.6. Đánh giá chất lượng và một số hoạt tính của Canxi alginate.....	106
3.6.1. Đánh giá chất lượng Canxi alginate.....	106
3.6.2. Đánh giá hoạt tính chống loãng xương của Canxi alginate	108
3.6.3. Kết quả nghiên cứu về độ an toàn của Canxi alginate.....	109
3.6.4. Đánh giá tác dụng đào thải kim loại nặng của Canxi alginate.....	115
3.7. Nghiên cứu xử lý các phụ phẩm của quá trình chế biến	118
3.7.1. Thành phần cơ bản của bã rong nâu sau khi chiết alginate	118

3.7.2. Nghiên cứu lựa chọn chế phẩm vi sinh vật có khả năng phân giải bã rong nâu sau chiết alginate	119
3.7.3. Theo dõi sự biến động của một số yếu tố trong quá trình ủ bã rong bằng chế phẩm S.EM	120
3.7.4. Đánh giá thành phần phân bón hữu cơ từ bã rong sau khi chiết alginate	122
KẾT LUẬN	124
CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	126
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	127

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 1.1. Một số quy trình chiết alginate thông thường [64,65].....	14
Bảng 1.2. Chiết phenolic từ rong nâu theo phương pháp thông thường [106, 113] .	17
Bảng 1.3. Một số quy trình chiết fucoidan truyền thống [74].....	19
Bảng 1.4. Chiết xuất phenolic từ rong theo phương pháp PLE [106, 113]	30
Bảng 2.1. Ký hiệu 7 nhóm chuột thử nghiệm	46
Bảng 3.1. Hiệu quả quá trình chiết xuất theo các phương án	53
Bảng 3.2. So sánh kết quả thu nhận các hợp chất.....	54
Bảng 3.3. Hàm lượng alginate của một số mẫu khảo sát.....	55
Bảng 3.4. Biến động theo tháng của hàm lượng axit alginic (%) trong một số loài rong mơ.....	57
Bảng 3.5. Thành phần hóa học chính của các loài rong mơ	58
Bảng 3.6. Thành phần đường đơn của polysacarit rong mơ	58
Bảng 3.7. Thành phần hóa học và tính chất lý hóa của alginate canxi chiết từ rong mơ .	58
Bảng 3.8. Kết quả về hàm lượng lipid tổng các mẫu rong nâu.....	59
Bảng 3.9. Kết quả các acid béo trong lipid tổng các mẫu rong nâu.....	61
Bảng 3.10. Kết quả dự đoán năng lượng liên kết của các hợp chất với enzyme tyrosinase	65
Bảng 3.11. Kết quả mô phỏng docking phân tử các hợp chất tiềm năng với enzyme sEH	66
Bảng 3.12. Chỉ số ADMET và dự đoán độc tính của các chất ức chế tiềm năng.....	69
Bảng 3.13. Các mức thí nghiệm của các biến công nghệ	77
Bảng 3.14. Ma trận kế hoạch hóa thực nghiệm của quá trình chiết xuất.....	77
Bảng 3.15. Bảng kết quả phân tích ANOVA của 2 hàm mục tiêu	79
Bảng 3.16. Bảng kết quả các hàm mục tiêu Y1, Y2	80
Bảng 3.17. Giá trị biến mã hóa và biến thực tại điều kiện tối ưu	82
Bảng 3.18. Giá trị các hàm mục tiêu tại điều kiện tối ưu.....	82
Bảng 3.19. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của mẫu cao chiết phenolic từ rong <i>Padina crassa</i>	83
Bảng 3.20. Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa	84
Bảng 3.21. Thành phần hóa học của rong mơ và bã rong mơ thu hồi trong quá trình sản xuất fucoxanthin	84
Bảng 3.22. Thành phần hóa học của rong mơ và bã thải rong mơ trong quá trình sản xuất fucoxanthin.....	93

Bảng 3.23. Kết quả sản xuất thử nghiệm các mẻ ở các quy mô thí nghiệm khác nhau.	94
Bảng 3.24. Kết quả khảo sát tác động của việc xử lý nguyên liệu với enzyme lên mức độ thủy phân thành tế bào và hiệu suất thu hồi chất chống oxi hóa	96
Bảng 3.25. Biểu diễn ảnh hưởng của của pH lên hàm lượng đường khử.....	97
Bảng 3.26. Biểu diễn ảnh hưởng của của nhiệt độ lên hàm lượng đường khử.....	98
Bảng 3.27. Biểu diễn ảnh hưởng của tỷ lệ E/S lên hàm lượng đường khử.....	98
Bảng 3.28. Biểu diễn ảnh hưởng của thời gian lên hàm lượng đường khử	98
Bảng 3.29. Xác định chỉ tiêu chất lượng chính.....	106
Bảng 3.30. Kết quả phân tích chỉ tiêu vi sinh vật	107
Bảng 3.31. Chỉ tiêu hàm lượng kim loại nặng	107
Bảng 3.32. Kết quả đánh giá hoạt tính chống loãng xương của hoạt chất Canxi alginate.....	108
Bảng 3.33. Số lượng chuột chết, biểu hiện bên ngoài khi uống Canxi alginate	109
Bảng 3.34. Kết quả theo dõi khối lượng của chuột ở các lô	110
Bảng 3.35. Sự thay đổi trọng lượng chuột khi cho uống Canxi alginate (gram/con).....	111
Bảng 3.36. Các chỉ tiêu huyết học khi cho chuột uống Canxi alginate	112
Bảng 3.37. Một số chỉ tiêu hóa sinh khi uống Canxi alginate	113
Bảng 3.38. Ảnh hưởng của Canxi alginate đến nồng độ creatinin trong máu chuột	113
Bảng 3.39. Kết quả mổ giải phẫu cơ quan nội tạng khi uống Canxi alginate.....	114
Bảng 3.40. Trọng lượng của một số nội quan (gram/10 gram thể trọng)	114
Bảng 3.41. Kết quả thử nghiệm trên động vật thí nghiệm	115
Bảng 3.42. Thành phần cơ bản trong bã rong nâu sau khi chiết alginate	119
Bảng 3.43. Ảnh hưởng của loại chế phẩm đến tỷ lệ C/N của khối ủ.....	119
Bảng 3.44. Một số chỉ tiêu đánh giá bã rong trước và sau khi ủ chế phẩm S.EM..	122

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Biểu đồ sự xuất hiện của rong Nâu trên thế giới [8].....	3
Hình 1.2. Các monomer có trong axit Alginic. (a) axit β -D-mannuronic; (b) axit α -L-guluronic.....	6
Hình 1.3. Trình tự chuỗi alginate	6
Hình 1.4. Công thức cấu tạo của fucoidan	8
Hình 1.5. Công thức cấu tạo của fucoxanthin.....	11
Hình 1.6. Cấu trúc hóa học của một số loại phlorotannin.....	12
Hình 3.1. Sơ đồ quy trình sử dụng kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến rong mơ	50
Hình 3.2. Biểu đồ hàm lượng lipid tổng trong các mẫu Rong mơ Sargassum	60
Hình 3.3. Biểu đồ hàm lượng các acid béo n-3 và n-6 trong các mẫu nghiên cứu ...	63
Hình 3.4. Biểu đồ hàm lượng acid béo n-7 và n-9 trong các mẫu nghiên cứu	64
Hình 3.5. Cấu hình liên kết trong không gian hai chiều và ba chiều được dự đoán bởi phần mềm AutoDock4.2.6 của các hợp chất.....	68
Hình 3.6. Quy trình chiết xuất phenolic từ rong nâu	70
Hình 3.7. Biểu đồ ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hàm lượng phenolic.....	71
Hình 3.8. Biểu đồ ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu đến hàm lượng phenolic..	73
Hình 3.9. Biểu đồ ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng phenolic.....	74
Hình 3.10. Biểu đồ ảnh hưởng của công suất vi sóng đến hàm lượng phenolic.....	76
Hình 3.11. Mô hình bề mặt đáp ứng của hàm mục tiêu Y1	81
Hình 3.12. Mô hình bề mặt đáp ứng của hàm mục tiêu Y2	81
Hình 3.13. Điều kiện tối ưu và kết quả hàm mục tiêu	83
Hình 3.14. Quy trình chiết xuất Fucoidan từ rong nâu	86
Hình 3.15. Ảnh hưởng của loại dung môi đến hàm lượng fucoidan của dịch chiết .	87
Hình 3.16. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi (nước khử ion) : nguyên liệu đến hàm lượng fucoidan thu được của dịch chiết tách bằng sóng siêu âm	88
Hình 3.17. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tách đến hàm lượng fucoidan của dịch chiết tách rong mơ bằng sóng siêu âm.....	89
Hình 3.18. Ảnh hưởng của thời gian và cường độ sóng siêu âm đến hàm lượng fucoidan của dịch chiết tách bã rong nâu	90

Hình 3.19. Ảnh hưởng của hàm lượng CaCl_2 tủa axit alginic trong dịch chiết tách đến độ sạch fucoidan thu nhận được	91
Hình 3.20. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến độ sạch (% fucoidan ở phần tủa) và hiệu suất thu nhận fucoidan (% fucoidan tủa so với fucoidan trong dịch lọc)	92
Hình 3.21. Quy trình chiết xuất alginate từ rong nâu	95
Hình 3.22. Ảnh hưởng của nồng độ HCl xử lý bã rong mơ tới hiệu suất và độ nhớt alginate chiết tách từ rong mơ bằng sóng siêu âm	100
Hình 3.23. Ảnh hưởng của nồng độ natri carbonat tới hiệu suất và độ nhớt alginate chiết tách từ rong mơ bằng sóng siêu âm.....	100
Hình 3.24. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tách tới hiệu suất và độ nhớt alginate chiết tách từ rong mơ bằng sóng siêu âm.....	101
Hình 3.25. Ảnh hưởng của thời gian và cường độ sóng siêu âm đến hiệu suất alginate chiết tách từ rong mơ bằng sóng siêu âm.....	103
Hình 3.26. Ảnh hưởng của thời gian và cường độ sóng siêu âm đến độ nhớt alginate chiết tách từ rong mơ bằng sóng siêu âm.....	103
Hình 3.27. Ảnh hưởng của nồng độ CaCl_2 tới hiệu suất thu tủa $\text{Ca}(\text{Alg})_2$	104
Hình 3.28. Ảnh hưởng của hàm lượng H_2O_2 (dung dịch H_2O_2 5 %) lên độ nhớt và độ truyền qua của sản phẩm alginate	106
Hình 3.29. Ảnh gan, thận, lách chuột sau khi thí nghiệm độc bán trường diễn.....	114
Hình 3.30. Ảnh hưởng của loại chế phẩm đến tỷ lệ C/N của khối ủ	120
Hình 3.31. Theo dõi diễn biến nhiệt độ trong đồng ủ	120
Hình 3.32. Theo dõi sự biến động pH trong đồng ủ	121
Hình 3.33. Theo dõi tỷ lệ C/N trong đồng ủ	122
Hình 3.34. Bã rong trước khi ủ (a) và sau khi ủ 6 tuần (b).....	122

MỞ ĐẦU

Tại các vùng biển ở Việt Nam đã phát hiện khoảng 1000 loài rong biển, trong đó có hơn 120 loài rong nâu có giá trị kinh tế cao, trữ lượng lớn. Rong nâu phân bố từ biển Bắc đến Nam, tập trung nhiều nhất là ở biển miền Trung, trữ lượng của họ rong mơ (Sargassaceae) là lớn nhất, có thể khai thác làm nguyên liệu sản xuất cho các sản phẩm cho công nghiệp, thực phẩm chức năng, dược phẩm...

Rong nâu được xác định có nhiều thành phần có giá trị như axit alginic, fucoidan, fucoxanthin và phlorotanin... Alginate được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như công nghiệp dệt (nâng cao độ bền cho sợi), công nghiệp giấy (chất tạo độ dính cho thuốc nhuộm), mực in (làm chất kết dính), công nghiệp thực phẩm (sử dụng làm phụ gia để tăng độ nhớt, khả năng tạo gel và làm ổn định hỗn hợp với nước, chống đông và nhũ hóa), bào chế thuốc, công nghệ mỹ phẩm (giữ mùi hương, tạo độ ổn định)... Fucoidan trong rong nâu có hoạt tính sinh học cao, có tác dụng chống ung thư, kháng khuẩn, virut mạnh, được ứng dụng nhiều trong sản xuất thuốc điều trị ung thư và trong nuôi trồng thủy sản.

Tuy nhiên, việc khai thác và chế biến rong nâu của Việt Nam hiện còn hạn chế, rong nâu chủ yếu được chế biến thành thực phẩm ở quy mô hộ gia đình. Việc chiết xuất các sản phẩm có giá trị từ rong nâu chủ yếu được thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm hoặc pilot. Một số nghiên cứu đã ứng dụng và tích hợp các kỹ thuật tiên tiến (chiết siêu âm, chiết enzyme, chiết sử dụng vi sóng, chiết enzyme – siêu âm, chiết enzyme – vi sóng, ...) nhưng chỉ mới dừng ở việc chiết xuất các thành phần cụ thể, chưa đưa ra được quy trình chế biến toàn diện và sâu đối với đối tượng rong nâu. Do đó, yêu cầu nghiên cứu ứng dụng các kỹ thuật tiên tiến để chế biến toàn diện và hiệu quả rong nâu trong điều kiện ở Việt Nam; đồng thời, định hướng tạo Alginate và một số sản phẩm hữu ích trong thực tiễn trở nên cấp bách.

Bên cạnh đó, nghiên cứu sử dụng công cụ hỗ trợ máy tính đã và đang đóng góp quan trọng trong lĩnh vực nghiên cứu phát triển thuốc. Dựa trên sự tiến bộ của công nghệ thông tin, các công cụ mô phỏng hóa sinh hiện đại đã có thể được sử dụng để sàng lọc ảo (*in silico*), nghiên cứu cơ chế hoạt động và dự đoán các hợp chất cấu trúc mới có hoạt tính mạnh. Luận án định hướng sử dụng kỹ thuật *in silico* nhằm dự đoán các hợp chất có tiềm năng về hoạt tính làm trắng da từ các loài rong nâu, đồng

thời tìm hiểu cơ chế hoạt động, mối tương quan hoạt tính – cấu trúc của các hợp chất có hoạt tính theo ức chế tyrosinase.

Chính vì vậy chúng tôi thực hiện đề tài “**Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích**” nhằm thực hiện các mục tiêu chính sau:

- Xây dựng quy trình công nghệ chế biến toàn diện rong mơ *Sargasum. sp.* thành các sản phẩm có giá trị cao (fucoxanthin, phlorotannin, fucoidan và alginate) sử dụng tích hợp các kỹ thuật tiên tiến.

- Xây dựng quy trình công nghệ chiết xuất phenolic từ rong nâu theo phương pháp tích hợp vi sóng và enzyme; Nghiên cứu dự đoán khả năng làm trắng da của một số hợp chất phân lập từ chi rong.

- Xây dựng quy trình công nghệ chiết xuất alginate từ rong mơ theo phương pháp tích hợp siêu âm và enzyme, đánh giá tác dụng sinh học, xây dựng tiêu chuẩn cơ sở chế phẩm.

Điểm mới của luận án:

- Lần đầu tiên sử dụng tích hợp các kỹ thuật tiên tiến (chiết siêu âm, chiết vi sóng, chiết enzyme, lọc màng và ly tâm 3 pha) và công nghệ tích hợp kỹ thuật (siêu âm – enzyme, lọc màng, ly tâm 3 pha) tạo đồng thời các sản phẩm có giá trị từ một đối tượng rong nghiên cứu.

- Lần đầu tiên đã xây dựng quy trình công nghệ sâu chiết xuất phenolic từ rong nâu theo phương pháp tích hợp vi sóng và enzyme; tối ưu hóa điều kiện chiết xuất phenolic từ rong nâu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt;

- Lần đầu tiên đã xây dựng quy trình công nghệ sâu chiết xuất alginate từ rong mơ theo phương pháp tích hợp siêu âm và enzyme; nghiên cứu quá trình thu nhận alginate; và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở sản phẩm canxi alginate.

- Lần đầu tiên đã đánh giá hoạt tính chống loãng xương, độ an toàn và hiệu lực của chế phẩm gel canxi alginate và tác dụng đào thải các kim loại nặng ở chuột cho kết quả tốt.

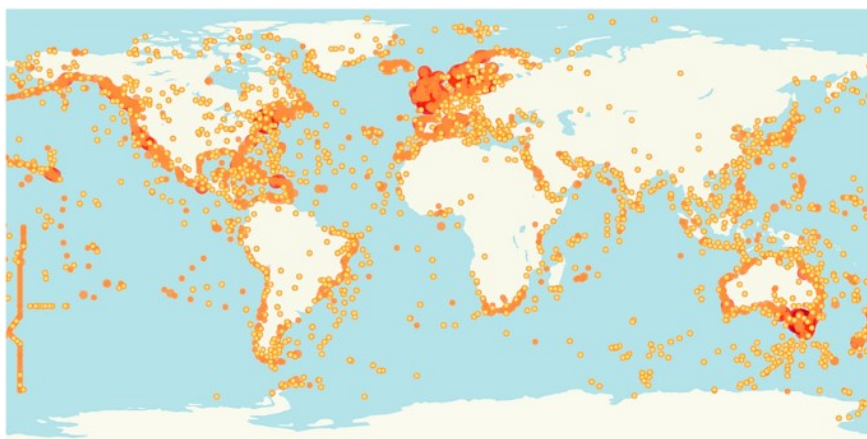
- Đã sàng lọc được các hợp chất phenolic từ rong có tác dụng tốt làm trắng da thông qua docking phân tử, định hướng cho nghiên cứu tiếp theo về thực nghiệm.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu rong nâu

1.1.1. Đặc điểm, phân bố

Ngành rong nâu bao gồm 16 bộ với khoảng 285 chi và khoảng 2040 loài, trong đó khoảng 1500 loài được xác định trên toàn thế giới [8]. Các chi như *Cystoseira*, *Dictyota*, *Ectocarpus*, *Sargassum*, và *Sphacelaria* bao gồm một số lượng lớn các loài [1,2]. Ngoại trừ một số chi sống ở vùng nước ngọt (ít hơn 1%), hầu hết các loại rong nâu đều sống ở biển và phần lớn phát triển ở các khu vực cận triều [3]. Khoảng 95% các loài rong nâu phân bố ở vùng nước lạnh đến ôn đới.



Hình 1.1. Biểu đồ sự xuất hiện của rong Nâu trên thế giới [8]

Kết quả nghiên cứu của Đàm Đức Tiến (2019) cho thấy đã xác định được 73 loài rong biển thuộc 4 ngành rong tại vùng biển ven đảo huyện Cô Tô và Thanh Lân, trong đó 4 loài rong Lam (5,5%), 34 loài rong Đỏ (46,6%), 20 loài rong Nâu (27,3%) và 15 loài rong Lục (20,6%). Các Bộ rong nâu chủ yếu ở Việt Nam là bộ Dictyotales (họ Dictyotaceae: 9 loài). Rong nâu phân bố chủ yếu ở vùng biển Bắc Bộ với 73 loài, vùng biển Bắc Trung Bộ có 49 loài chiếm 24%, vùng biển Nam Trung Bộ có 31 loài, vùng biển Nam Bộ có 1 loài [4]. Tổng trữ lượng tươi tức thời ước tính cho các nhóm rong biển ưu thế này (tháng 11/2010) vào khoảng 300 tấn. Riêng nhóm rong mơ, chúng phân bố chủ yếu ở khu vực ven đảo, có độ sâu nước không lớn, tập trung ở các bãi khu vực cảng Bắc Vân và một số khu vực ven biển xã Đồng Tiến trên diện tích khoảng 20 ha, với trữ lượng ước tính khoảng 160 tấn tươi (Đỗ Văn Khương và cs., 2016).

1.1.2. Một số ứng dụng của rong nâu

Rong nâu được dùng để sản xuất ra các loại keo rong biển như alginate, agar hoặc chế biến làm thức ăn cho vật nuôi, làm phân bón [4]. Nhiều loài rong nâu cũng là nguồn thực phẩm quan trọng của con người và các ngành công nghiệp, chẳng hạn như hoạt động nuôi trồng thủy sản các loài tảo bẹ (kelp) rất phổ biến ở Hàn Quốc và Nhật Bản [2].

Sử dụng làm thực phẩm: Rong nâu làm thực phẩm nhiều nhất là các loài thuộc chi *Laminaria* (như *L. japonica*, *L. ochotensis*, *L. angustata*, *L. coriacea* và *Laminaria longissima*) phân bố tự nhiên ở Hàn Quốc, Nhật Bản và được nuôi trồng thành công ở Trung Quốc [3,4].

Làm phân bón: Các loài rong thuộc chi *Ascophyllum*, *Ecklonia* và *Fucus* thường được dùng như chất phụ gia điều hòa đất và phân bón vì trong rong có chứa nhiều hợp chất nitơ, kali và phot pho. Tại Việt Nam, nhân dân thường lấy rong mơ bón cho lúa, khoai sắn, đậu, cải củ, mía, cà phê, cà chua, dưa hấu rất tốt.

Chế biến keo rong: Loại keo rong được chế biến chủ yếu nhất từ rong nâu là alginate. Các loài thuộc chi *Sargassum* được sử dụng nhiều để sản xuất alginate. Ngoài ra, alginate được sản xuất ở Mỹ, Châu Âu và Trung Quốc còn từ các loài thuộc chi *Laminaria*, *Macrocystis*, *Ecklonia*, *Durvillea*, *Ascophyllum* [3]

Ứng dụng sản xuất nhiên liệu sinh học: Rong *Sargassum horneri* được nghiên cứu để sản xuất ethanol sinh học, kết quả thu được 29,6 kg ethanol hoặc 38 lít ethanol từ 1 tấn rong tươi có độ ẩm 90 % [5].

Điều chế các chất có hoạt tính sinh học: Rong biển chứa các polysaccharid có ý nghĩa trong ngành y dược. Đặc biệt trong rong nâu chứa nhiều alginate, được sử dụng trong điều trị bệnh tim mạch, chống đông máu, chống oxy hóa và hạ huyết áp,... Một số loài rong Nâu thường được sử dụng là *Saccharina japonica* - tên thương phẩm: *Laminaria* hoặc haidai; *Ecklonia kurome*; một số loài thuộc chi *Sargassum*, có tác dụng để điều trị ung; *Saccharina* khô dùng để làm giãn cổ tử cung [4].

Làm thức ăn chăn nuôi: Từ lâu, rong biển đã được sử dụng làm thức ăn cho gia súc (cừu, bò, ngựa) ở các vùng ven biển. Ngày nay, rong biển làm thức ăn gia súc được sản xuất ở quy mô công nghiệp (dạng bột) [6].

1.1.3. Thành phần hoá học và hoạt tính sinh học

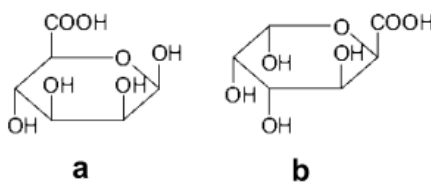
Giống như các ngành rong biển khác, rong nâu chứa các chất cơ bản như cacbonhydrate (4-70%CK), protein (3-24%CK), tro (14-45%CK), lipid (0,3-4,8%CK) [7]. Rong biển nói chung và rong Nâu nói riêng có chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học cao như các sắc tố (carotenoid), polysaccharid (alginate, fucoidan), lipid dự trữ, vitamin,... có tiềm năng ứng dụng cao trong lĩnh vực y dược.

1.1.3.1. Carbohydrate

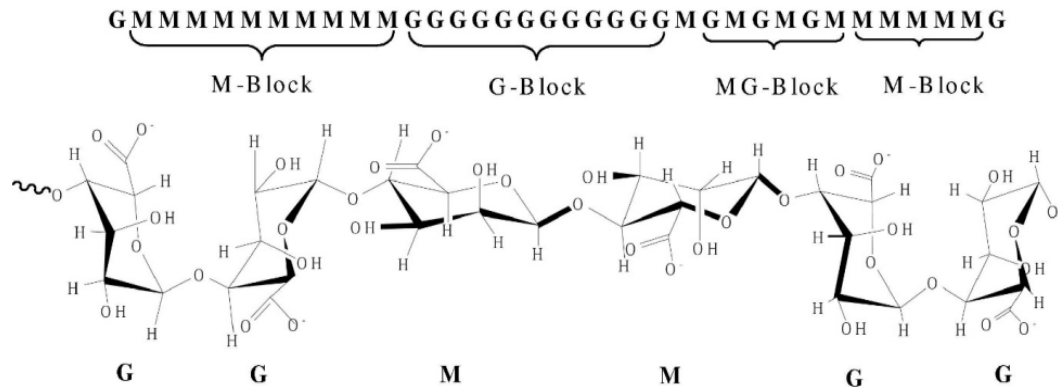
Trong thành phần của rong biển, polysaccharid là thành phần quan trọng nhất xét về mặt hàm lượng hóa học và giá trị thương mại. Các polysaccharit chủ yếu được chia thành ba nhóm: polysaccharit cấu trúc, chất nhầy giữa các tế bào và polysaccharit lưu trữ. Tính chất hóa học của các polysaccharit này không chỉ khác với các tính chất được tìm thấy trong thực vật trên cạn mà còn giữa các lớp rong biển [9]. Các polysaccharit chính của rong nâu là axit alginic (alginate), fucoidan và laminaran.

❖ *Alginate*

Alginate chiết xuất từ rong nâu ở cả dạng axit và muối. Dạng axit là một axit polyuronic mạch thẳng, được gọi là axit alginic; dạng muối là thành phần quan trọng của thành tế bào trong tất cả rong nâu, chiếm tới 40–47% trọng lượng khô của sinh khối rong biển. Hầu hết các loại rong nâu là nguồn alginate tiềm năng. Hàm lượng axit alginic khác nhau giữa các loài và mùa thu hoạch và thường chiếm từ 10% đến 30% trọng lượng rong khô. Đặc tính của alginate phụ thuộc vào loài rong biển và loại alginate có trong chúng [7].



Hình 1.2. Các monomer có trong axit Alginate. (a) axit β -D-mannuronic;
(b) axit α -L-guluronic



Hình 1.3. Trình tự chuỗi alginate

Axit alginate bao gồm các đơn vị axit β -D-mannuronic (M) và gốc axit α -L-guluronic (G) nối với nhau bằng liên kết β -1,4. Các đơn vị này được phân phối ngẫu nhiên trong một chuỗi mạch thẳng. Chúng cũng có thể được sắp xếp thành các khối đồng nhất MM hoặc GG và không đồng nhất hoặc xen kẽ như MG. Đặc tính vật lý khác nhau của alginate giữa các loài là do tỷ lệ khác nhau của các gốc axit mannuronic và axit guluronic. Trọng lượng phân tử của các chế phẩm thương mại nằm trong khoảng từ 32.000 đến 200.000, với mức độ trùng hợp từ 180-930 [9].

Alginate là muối của axit alginate chuỗi dài, trong rong nâu xuất hiện chủ yếu dưới dạng muối canxi của axit alginate, mặc dù muối magiê, kali và natri cũng có mặt. Natri alginate là polyme tan trong nước tạo ra dung dịch có độ nhớt cao, có khả năng tạo gel với sự có mặt của các cation đa hóa trị, chẳng hạn như canxi, natri alginate [64].

Alginate được ứng dụng ở nhiều lĩnh vực do tính chất lưu biến, khả năng tương thích sinh học, khả năng phân hủy sinh học và ít độc tính. Tỷ lệ của ba loại khối – MM, GG và MG xác định tính chất vật lý của alginate – alginate có G cao có đặc tính tạo gel cao hơn, trong khi những loại có M cao có độ nhớt cao hơn. Việc đánh giá tỷ lệ M/G cũng rất cơ bản – đối với alginate có tỷ lệ M/G cao, alginate tạo ra gel đàn hồi, trong khi đối với alginate có tỷ lệ M/G thấp tạo ra gel giòn [64].

Nhiều ngành công nghiệp liên quan đến chế biến thực phẩm, dược phẩm, thức ăn chăn nuôi và mỹ phẩm sử dụng axit alginate chiết xuất từ *Saccharina* và *Undaria*. Axit alginate thô được tinh chế để sử dụng làm phụ gia thực phẩm. Trong thực phẩm, chúng chủ yếu được sử dụng làm chất ổn định trong kem, phomai, siro và topping [9].

Axit alginate có tác dụng: Chống tăng huyết áp, giảm nồng độ cholesterol, có thể ngăn chặn sự hấp thụ các chất hóa học độc hại và đóng vai trò chính là chất xơ

tiêu hoá để duy trì sức khỏe; Chống lại chất gây ung thư tiềm ẩn, làm sạch hệ thống tiêu hóa và bảo vệ màng bề mặt của dạ dày và ruột; Hấp thụ các chất như cholesterol, sau đó được loại bỏ khỏi hệ thống tiêu hóa và dẫn đến các phản ứng hạ đường huyết. Alginate với trọng lượng phân tử ≥ 50 kDa có thể ngăn ngừa bệnh béo phì, hạ cholesterol máu và tiểu đường. Các quan sát lâm sàng của những người tình nguyện thừa cân từ 25-30% cho thấy alginate, một loại thuốc có chứa axit alginic, làm giảm trọng lượng cơ thể một cách đáng kể [11,12]. Trong điều trị bệnh tiểu đường loại II, uống 5g natri alginate mỗi sáng giúp ngăn chặn sự gia tăng nồng độ glucose, insulin và C-peptide sau bữa ăn và làm chậm quá trình vận chuyển xuống dạ dày. Bữa ăn bổ sung 5% alginate tảo bẹ làm giảm cân bằng hấp thụ glucose trong 8 giờ ở lợn. Các nghiên cứu tương tự đã được thực hiện trên chuột và người [13].

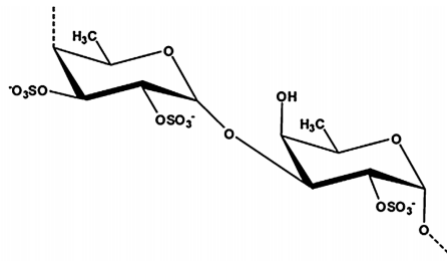
Một tác dụng đối với sức khỏe khác là đặc tính liên kết của axit alginic với các ion kim loại hóa trị hai, với mức độ tạo gel hoặc kết tủa với các kim loại trong khoảng $Ba < Pb < Cu < Sr < Cd < Ca < Zn < Ni < Co < Mn < Fe < Mg$. Không có enzym đường ruột nào có thể tiêu hóa axit alginic. Điều này có nghĩa là các kim loại nặng được đưa vào cơ thể con người sẽ bị axit alginic trong ruột tạo thành gel hoặc dạng kết tủa và không thể hấp thụ vào mô cơ thể [7].

Tác dụng cầm máu của alginate cũng được khai thác trong phẫu thuật. Băng gạc, bông, gạc và các vật liệu đặc biệt được tẩm dung dịch natri alginate được sản xuất và sử dụng bên ngoài và bôi lên các điểm chảy máu trong quá trình phẫu thuật trên các cơ quan nhu mô. Nghiên cứu về tác dụng của alginate đối với quá trình đông máu tiền huyết khối và kích hoạt tiểu cầu đã chỉ ra mức độ của những tác dụng này phụ thuộc vào tỷ lệ giữa chuỗi mannuronic và guluronic trong phân tử, cũng như nồng độ canxi. Tuy nhiên, ion kẽm chứa alginate đã được chứng minh có tác dụng cầm máu nhiều nhất [14].

❖ *Fucoidan*

Rong biển chứa fucoidan polysaccharit sunfat, một loại axit polyuronic, là chất xơ hòa tan trong nước. Fucoidan, được đặt tên bởi Kylin vào năm 1915, là một polyme của fucan sunfat gồm các đơn vị L-fucose-4-sulfate được liên kết với nhau bằng liên kết 1,2 và trong một số trường hợp, nó còn chứa thêm fucan sunfat với liên kết 1,3 hoặc 1,4, mang chuỗi mạch bên của các gốc galactose, xyloza hoặc uronic. Hàm lượng fucoidan thay đổi từ ít nhất là 2% trong họ Laminariaceae đến hơn 20% (trọng

lượng khô) trong họ Fucaceae, có mối liên hệ giữa hàm lượng fucoidan và độ sâu mà rong phát triển (hàm lượng này giảm khi độ sâu của rong tăng) [9].



Hình 1.4. Công thức cấu tạo của fucoidan

Fucoidan được tìm thấy chủ yếu trong thành tế bào của rong nâu, nhưng không có ở các loại tảo hoặc thực vật bậc cao khác. Fucoidan được coi là một phân tử củng cố thành tế bào và dường như có liên quan đến việc bảo vệ chống lại tác động của việc bị hút ẩm khi rong biển lộ ra khi thủy triều xuống. Fucanoids có thể chiếm hơn 40% trọng lượng khô của chiết xuất thành tế bào tảo rong và có thể dễ dàng chiết bằng nước nóng hoặc dung dịch axit. Fucoidan nhớt ở nồng độ rất thấp, dễ bị phân hủy bởi axit hoặc bazơ pha loãng [15].

Fucoidan được biết là có nhiều đặc tính sinh học với các ứng dụng tiềm năng cho sức khỏe con người. Fucoidan được tìm thấy trong rong biển như *Undaria* và *Laminaria* cho thấy các đặc tính chống đông máu, chống ung thư và kháng vi-rút. Các chế phẩm Fucoidan đã được đề xuất như một giải pháp thay thế cho heparin chống đông máu dạng tiêm [16].

Fucoidan đã được tìm thấy có khả năng phục hồi các chức năng miễn dịch của chuột bị ức chế miễn dịch, hoạt động như một chất điều hòa miễn dịch trực tiếp trên đại thực bào, tế bào lympho T, tế bào B, tế bào giết tự nhiên (NK), thúc đẩy sự phục hồi chức năng miễn dịch trong cơ thể chuột bị chiếu xạ, kích thích sản xuất interleukin 1 (IL-1) và interferon- γ (IFN- γ) trong ống nghiệm và thúc đẩy phản ứng kháng thể sơ cấp trong tế bào hồng cầu cừu *in vivo* [7,17].

Đặc tính kháng virus của fucan sunfat hóa cũng đã được mô tả như ức chế lây nhiễm HIV, HSV, virus bại liệt III, adenovirus III, virus ECH06, coxsackie B3, coxsackie A16, cytomegalovirus và virus tiêu chảy bò [18-20].

Fucoidan được biết là có tác dụng chống khối u. Các polysaccharit đa anion này có tác dụng chống hình thành mạch, chống tăng sinh tế bào khối u, chúng ức chế sự phát triển của khối u và giảm kích thước khối u, ức chế sự kết dính của tế bào khối u

với các chất nền khác nhau, và có tác dụng chống ung thư trực tiếp trên các tế bào HS-Sultan của con người thông qua con đường caspase và ERK [16,21].

Ngoài ra, fucoidan là một chất chống oxy hóa tự nhiên tuyệt vời và thể hiện hoạt tính chống oxy hóa đáng kể trong các thí nghiệm in vitro. Các polysaccharit sunfat hóa từ rong biển *Laminaria japonica* và *Ecklonia kurome* đã được chứng minh là có hoạt tính chống oxy hóa này [22,23].

❖ *Laminaran*

Laminaran là polysaccharit dự trữ được tìm thấy phổ biến trong rong biển nâu và bao gồm khoảng 20 gốc glucose nối với nhau bằng liên kết β -1,3. Hàm lượng laminaran thay đổi theo mùa và theo môi trường sống và có thể đạt tới 32% trọng lượng khô [7]. Laminaran đã được nghiên cứu làm chất nền cho vi khuẩn [24]. Nó đã được chứng minh là một loại bột bụi phẫu thuật an toàn và có thể có giá trị như một chất ức chế khối u và ở dạng este sulphate, nó như một chất chống đông máu [25]. Laminaran có khả năng bảo vệ chống nhiễm trùng do vi khuẩn và bảo vệ chống lại sự chiếu xạ nghiêm trọng, tăng cường miễn dịch, giảm cholesterol trong máu [7,25].

1.1.3.2. *Lipid*

Lipid là một nhóm rộng lớn các phân tử tự nhiên bao gồm chất béo, sáp, sterol, vitamin tan trong chất béo (chẳng hạn như vitamin A, D, E và K), mono-, di- và triacylglycerol, diglyceride, phospholipid và các loại khác. Hàm lượng lipid trong rong biển trung bình chỉ 1-3% trọng lượng khô, thấp hơn so với các sinh vật biển khác. Do đó, đóng góp của chúng như một nguồn năng lượng thực phẩm là không đáng kể. Các loài rong biển nhiệt đới chứa ít lipid (<1%) hơn các loài nước lạnh (1,6%). Glycolipid là lớp lipid chính trong tất cả các loại rong biển, tiếp theo là trung tính và phospholipid.

Các axit béo của rong biển thường có mạch thẳng, số nguyên tử carbon chẵn và có một hoặc nhiều liên kết đôi. Đặc biệt, rong biển có thể là một nguồn axit béo thiết yếu như axit eicosapentanoic (EPA, C20:5n-3). Rong nâu giàu axit béo với 20 nguyên tử carbon là EPA và axit arachidonic (AA, C20:4n-6). Tỷ lệ axit béo n6 / n3 là rất quan trọng đối với lượng ăn vào của con người vì cả hai loại này cạnh tranh cùng một loại enzyme để tổng hợp các tuyến tiền liệt có nguồn gốc từ cả hai họ n3 và n6. *Sargassum* có tỷ lệ n-6/n-3 tốt (0,3) và cũng có hàm lượng lipid tổng cao (3,9%) [7,9,10]. Trong cả 3 loài *Sargassum*, axit palmitic (C16:0) là axit béo chiếm ưu thế,

tiếp theo là axit arachidonic và axit linoleic. Di-homo gamma linolenic acid, là tiền chất của prostaglandin PGE1 và một số hoạt chất sinh học có liên quan khác, hiện diện với số lượng tương đối cao (khoảng 2,4% trong tổng số lipid, 5,7% trong lipid trung tính và 2,9% trong phospholipid) trong *S. confusum*, so với *S. margimatum* và *S. thunbergii* [37].

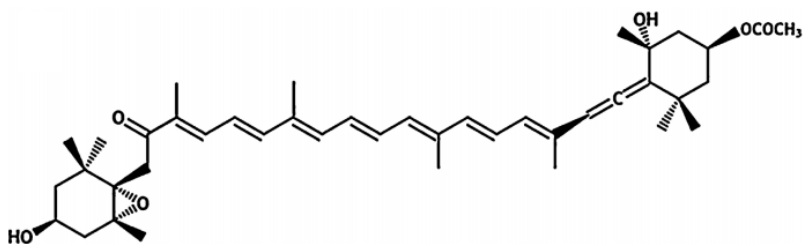
Các phospholipid chính trong *F. vesiculosus* và *A. nodosum* là phosphatidylethanolamine, nhưng chúng chiếm <10% tổng số acyl lipid [38]. Kiểm tra thành phần glycolipid trong một số loại rong nâu cho thấy hàm lượng monoglycosyldiacylglycerol (MGDG) thay đổi từ 26% đến 47%, hàm lượng diglycosyldiacylglycerol (DGDG) từ 20% đến 44% và hàm lượng sulphaquinovosylglycerol từ 18% đến 52% tổng số glycolipid. Hàm lượng glycolipid trong hai loài *Fucus* chiếm 14% chất béo hòa tan trong este [39].

1.1.3.3. Sắc tố màu

Chlorophyll và carotenoid là các sắc tố màu được tìm thấy trong tất cả các loại rong biển. Chlorophyll a có mặt trong tất cả các loại rong biển; nhưng chlorophyll c chỉ có trong rong nâu. Hàm lượng chlorophyll a là 565–2.000 mg/kg chất khô ở các loài rong nâu [7].

Carotenoid là sắc tố phổ biến nhất trong tự nhiên và chúng có mặt trong tất cả các loại rong, thực vật bậc cao và nhiều vi khuẩn quang hợp. Các sắc tố chính của rong nâu là β -caroten, violaxanthin và fucoxanthin, trong đó fucoxanthin chiếm ưu thế [9].

Màu nâu của rong nâu là kết quả của sự chiếm ưu thế của sắc tố fucoxanthin, sắc tố này che lấp các sắc tố khác như chlorophyll a và chlorophyll c, β -carotene và các xanthophyll khác. Fucoxanthin là một xanthophyll và có cấu trúc độc đáo, bao gồm một liên kết allenic bất thường và 5,6-monoepoxide trong phân tử của nó [41]. Fucoxanthin là một trong những carotenoid phong phú nhất trong tự nhiên. Hàm lượng trong rong biển thay đổi theo mùa và vòng đời. Ở dạng tinh khiết, fucoxanthin dễ bị oxy hóa. Tổng hàm lượng carotenoid của *F. serratus* được tìm thấy là khoảng 0,08% chất khô và fucoxanthin bao gồm khoảng 70% tổng số carotenoid. Hàm lượng fucoxanthin nằm trong khoảng từ 172-720 mg/kg trọng lượng khô ở các loài rong nâu, với nồng độ tối đa ở *F. serratus* [7, 42].



Hình 1.5. Công thức cấu tạo của fucoxanthin

Fucoxanthin từ *Undaria* tươi chủ yếu được tìm thấy dưới dạng đồng phân hình học all-trans (~88%). Các dạng trans ổn định hơn; nhưng dạng cis của fucoxanthin được phát hiện có tác dụng ức chế cao hơn với tế bào ung thư bạch cầu (HL-60) và tế bào ung thư ruột kết (Caco-2). Sự hấp thu và kết hợp dạng trans của fucoxanthin vào lipid tế bào nhanh hơn so với dạng cis [43]. Fucoxanthin dễ dàng chuyển đổi thành fucoxanthinol trong tế bào ruột người và chuột [7].

Các thí nghiệm đã chỉ ra rằng fucoxanthin từ rong biển nâu *Undaria* làm giảm đáng kể khả năng sống sót của các tế bào ung thư tuyến tiền liệt ở người và giảm đáng kể tỷ lệ chuột mang khối u và số lượng khối u trung bình trên mỗi con chuột khi được cho vào nước uống [44,45]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tác dụng chống ung thư, bao gồm ức chế sự tăng sinh của dòng tế bào ung thư bạch cầu ở người (HL-60) và gây ra quá trình chết theo chương trình của chúng [46, 47, 48].

Fucoxanthin tinh khiết ức chế sự tích tụ lipid tế bào chất trong 3T3-L1 có thể được gây ra bởi insulin, và theo cách phụ thuộc vào liều lượng làm giảm đáng kể sự biểu hiện của các gen chuyển hóa lipid trong các tế bào mỡ 3T3-L1. Có thể nhận thấy fucoxanthin có tác dụng ngăn ngừa béo phì một cách hiệu quả [46].

1.1.3.4. Phenolic

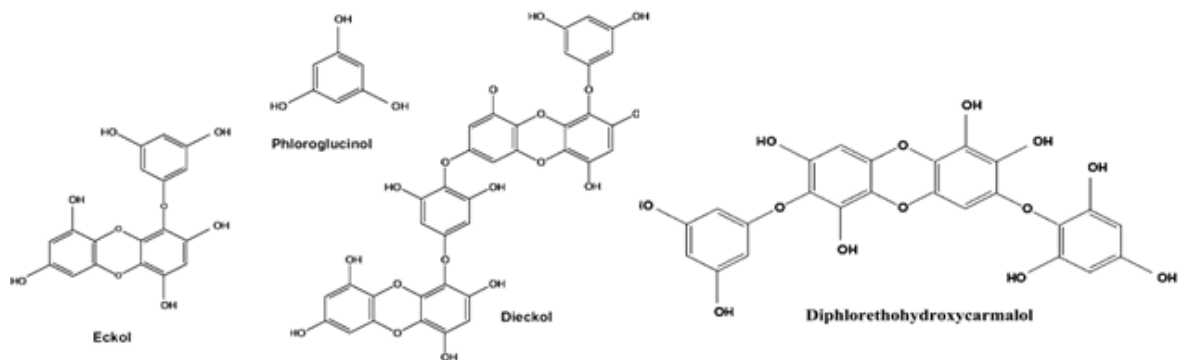
Phenolic có cấu tạo gồm nhóm hydroxyl (-OH) liên kết trực tiếp với nhóm hydrocarbon thơm. Phenolics đóng vai trò quan trọng đối với chức năng chống oxy hóa của rong biển. Hàm lượng và thành phần của phenolic trong rong biển thay đổi theo loài, theo mùa. Ví dụ, phenolic trong *Ascophyllum* ở mức tối thiểu (~9–10% trọng lượng khô) trong thời kỳ quả rụng nhiều nhất (tháng 5) và đạt mức tối đa (~12–14%) trong “mùa đông” [7].

Trong rong biển nâu, phlorotannin là nhóm các hợp chất phenolic chính. Phlorotannin là những thành phần cực kỳ ưa nước với nhiều kích thước phân tử từ 126

kDa đến 650 kDa [8]. Rong nâu chứa nhiều loại phlorotannin khác nhau như fucoll, phlorethol, fucophlorethol, fuhalol, phlorotannin halogen hóa và sulfite hóa [50,52].

Phlorotannin sở hữu một số đặc tính hoạt động sinh học, bao gồm ức chế antiplasmin, giải độc kim loại nặng, tác dụng kháng khuẩn, chống tia cực tím và hóa trị ngăn ngừa các yếu tố nguy cơ mạch máu. Cũng có báo cáo rằng phlorotannin đã kéo dài thời gian cảm ứng trong quá trình oxy hóa methyl α -linolenate [53-59]. Có thể nhận thấy phlorotannins là hợp chất chống oxy hóa tự nhiên trong rong nâu, có khả năng chống lại sự thoái hóa do oxy hóa cũng như ngăn ngừa và/hoặc điều trị các bệnh liên quan đến gốc tự do.

Phlorotannin có có nhiều tác dụng như chống tiểu đường, chống oxy hóa, chống tăng sinh, chống HIV và bảo vệ da, chống phóng xạ và chống dị ứng. Các loài *Ecklonia* khác nhau cho thấy các đặc tính nêu trên do sự hiện diện của các hợp chất phlorotannin khác nhau như fucodiphlorethol G, phloroglucinol, eckol, dieckol và phlorofucofuroeckol A. Rong nâu ăn được *Eisenia arborea* đã được sử dụng trong y học dân gian và cho thấy tác dụng chống dị ứng nhờ hợp chất phlorofucofuroeckol B. *Himanthalia elongate* cho thấy tác dụng chống vi khuẩn và chống oxy hóa cao, do sự hiện diện của phloroglucinol [8].



Hình 1.6. Cấu trúc hóa học của một số loại phlorotannin

1.1.3.4. Một số thành phần khác

Mannitol là một loại rượu đường quan trọng hiện diện trong nhiều loài rong nâu, đặc biệt là ở *Laminaria* và *Ecklonia*. Hàm lượng mannitol chiếm 5-30% trong rong nâu và có thể dao động theo mùa rộng, thay đổi theo môi trường. Mannitol được ứng dụng đa dạng trong dược phẩm, sản xuất kẹo cao su, trong công nghiệp sơn và vecni, sản xuất da và giấy, trong công nghiệp chất dẻo và sản xuất chất nổ [26].

Thành phần và hàm lượng protein của rong biển thay đổi theo loài, nhưng nhìn chung hàm lượng của rong nâu là thấp (trung bình 5-15% trọng lượng khô) [7]. Hầu

hết rong biển chứa tất cả các axit amin thiết yếu và là nguồn giàu axit amin có tính axit, axit aspartic và axit glutamic [27]. Protein rong nâu cũng là một nguồn giàu threonine, valine, leucine, lysine, glycine và alanine, với các axit amin như cysteine, methionine, histidine, tryptophan và tyrosine được ghi nhận ở mức thấp hơn [29, 30].

1.2. Các công nghệ chế biến một số sản phẩm từ rong

1.2.1. Công nghệ truyền thống

Alginate được chiết xuất theo nhiều cách khác nhau tùy thuộc vào ứng dụng, nhưng quy trình được sử dụng phổ biến nhất là quy trình được mô tả bởi Calumpong et al. (1999), dựa trên việc chiết xuất alginate dưới dạng natri alginate. Phương pháp này dựa trên việc chuyển đổi các alginate canxi và magie không hòa tan có trong thành tế bào rong nâu thành các alginate natri hòa tan và sau đó được thu hồi dưới dạng axit alginic hoặc canxi alginate. Quá trình này được thực hiện bằng cách bổ sung tuần tự axit, rượu và natri cacbonat sau đó tách rắn/lông, kết tủa và làm khô [63, 64].

Chiết xuất alginate từ rong biển gồm nhiều giai đoạn. Rong biển tươi được rửa sạch, phơi khô và xay thành bột. Sau đó, sinh khối rong biển được ngâm trong nước để bù nước, trong đó các hóa chất khác nhau được thêm vào để loại bỏ các hợp chất không mong muốn trong rong biển. Sau đó, tiến xử lý bằng axit hoặc kiềm được áp dụng để phá vỡ thành tế bào thực vật, tiếp theo là quá trình chiết xuất natri cacbonat để thu được alginate hòa tan trong nước từ nền sinh khối rong biển. Có ba con đường kết tủa để thu hồi alginate từ dung dịch, đó là con đường natri alginate, con đường canxi alginate và con đường axit alginic, với sản phẩm cuối cùng thường được phân lập ở dạng natri alginate [65].

Theo Phạm Quốc Long và cs (2009), có hai cách thu hồi alginate: Cách thứ nhất là thêm axit để tạo thành gel axit alginic không tan trong nước và tách nó dưới dạng rắn ra khỏi nước. Sau đó bổ sung cồn vào axit alginic, tiếp theo là cacbonate natri để chuyển hóa axit alginic về alginate natri. Cách thứ 2 là thêm vào dung dịch chiết ban đầu một muối canxi, tạo thành gel alginate canxi với một kết cấu dạng sợi, không hòa tan trong nước và có thể tách ra khỏi chúng. Sau đó thêm axit vào để chuyển hóa thành alginic axit. Axit alginic dạng sợi này được tách ra rất dễ và đặt vào trong một máy trộn hình cầu với cồn và natri cacbonat được đưa từ từ vào bột nhào cho đến khi tất cả axit alginic được chuyển hóa về alginate natri, bột alginate natri đôi khi còn được ép thành những viên nhỏ sau đó sấy và nghiền mịn [66].

Bảng 1.1. Một số quy trình chiết alginate thông thường [64,65]

Loài rong	Quy trình chiết	Hiệu suất
<i>Sargassum natans</i> , <i>Sargassum Vulgare</i> , <i>Padina gymnospora</i> , <i>Padina antillarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Ngâm rong qua đêm trong formaldehyde 2% (w/w) - Rửa rong bằng nước và thêm HCl 0,2M (để qua đêm) - Rửa và thêm Na₂CO₃ 2% ở 99°C trong 3 giờ - Lọc và kết tủa natri alginate trong isopropanol 80% 	Từ 16±0,7% dw đối với <i>P. gymnospora</i> đến 29±4,2% dw đối với <i>L. digitata</i>
<i>Ecklonia radiata</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Kích thước rong 0,25–1,4 mm - Ngâm trong Ethanol, 3 h, (tỉ lệ rong/cồn = 1:10 w/v) - Bỏ sung HCl để pH=1–6,5, nhiệt độ 25–55°C, trong thời gian 1–120 phút - Rửa chất rắn, chiết bằng Na₂CO₃ 0,2 M, 45°C, 2 giờ (tỉ lệ 1:20 w/v) - Kết tủa bằng etanol, tỉ lệ 2/1 - Sấy kết tủa ở 60°C 	Hiệu suất 32,2–45,4%, trọng lượng phân tử = 373–986 kDa
<i>Sargassum turbinarioides</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Ngâm rong khô trong formaldehyde 2% (24 giờ, nhiệt độ phòng) - Rửa chất rắn bằng nước và thêm HCl 0,2 M (24 giờ) - Rửa chất rắn và chiết bằng Na₂CO₃ 2% (3 giờ, 100°C) - Thu thập phần hòa tan bằng cách ly tâm - Kết tủa alginate bằng etanol 95% (tỉ lệ 1:3) và rửa bằng axeton 	10% dw
<i>Ascophyllum nodosum</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Ngâm bột rong (kích thước 0.25 mm) trong CaCl₂ 1%, 18 giờ (tỉ lệ 1:15 w/v) - Sau đó, bỏ sung vào phần chất rắn HCl 5%, 1 giờ (tỉ lệ 1:15 w/v) - Chiết phần chất rắn thu được bằng Na₂CO₃ 3% (w/v) trong 1 giờ (tỉ lệ 1:15 w/v) - Thu phần hoà tan, kết tủa bằng Ethanol (tỉ lệ 1:1 v/v) - Sấy ở 50°C 	Hiệu suất = 18.3–23.7%, tỉ lệ M/G= 0.91–1.33

<p><i>Sargassum duplicatum</i>, <i>Sargassum crassifolium</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Rửa sạch và ngâm các mảnh lá rong trong nước cho đến khi chúng nở ra rồi ngâm trong HCl 0,3% trong 1 giờ - Chiết xuất: các mảnh rong được rửa sạch bằng nước cất và ngâm trong Na₂CO₃ 4% (w/w) có khuấy ít nhất 2 giờ - Tách phần nổi phía trên khỏi dung dịch bằng cách axit hoá dùng HCl 10% và rửa axit alginic bằng nước và làm khô - Thêm NaOH 10% để sản xuất natri alginate 	<p>-</p>
<p><i>Nizimuddinia zanardini</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Bột rong khô được ngâm trong formaldehyde 2% (v/v), 24 giờ (tỉ lệ 1:32 w/v) - Thêm HCl 0.2 M vào chất rắn (tỉ lệ 1:32 w/v), 60°C, 3 giờ. - Thu phần chất rắn, chiết bằng Na₂CO₃ 3% (w/w), 60°C, 2.5 giờ (tỉ lệ 1:32 w/v) - Kết tủa bằng cồn 96% (V=3 lần) - Đông khô kết tủa thu được 	<p>Hiệu suất 27%, Mw=103–119 kDa, tỉ lệ M/G= 1.22</p>
<p><i>Sargassum</i> sp. <i>Turbinaria</i> sp. <i>Hormophysa</i> sp.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Hoà bột rong biển vào nước cất và thêm HCl 0,1N, khuấy mạnh để có được pH=3 (24 giờ, ở nhiệt độ phòng) - Rửa sinh khối bằng nước cất. - Thêm Na₂CO₃ 1M và EDTA, pH là 11 (80°C, 2 giờ) - Axit hóa bằng HCl 6N (pH =3), thu kết tủa bằng ly tâm và huyền phù trong nước cất - Bổ sung NaOH 1M (pH 10) – kết tủa natri alginate với etanol khi có mặt NaCl và rửa bằng hỗn hợp etanol/nước 	<p>31%dw – <i>Sargassum</i> sp. 31% dw– <i>Turbinaria</i> sp. 30% dw– <i>Hormophysa</i> sp Khi không có EDTA, năng suất alginate thấp hơn (10-13%) liên quan đến sự hiện diện của phức hợp canxi trong vách tế bào</p>
<p><i>Sargassum latifolium</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Rong biển kích thước 1–5 mm, hoà vào CaCl₂ 0.54%, 30 phút, rồi ngâm NaCl 0.5%, 1 giờ, 100°C (tỉ lệ 1:15 w/v) - Chiết bằng Na₂CO₃ 5% trong 30 phút ở 100°C (1:5 w/v) 	<p>Hiệu suất 17.54%</p>

	- Kết tủa bằng 80% Ethanol - Sấy ở 50°C	
<i>Laminiaria digitata</i>	- Rong biển có kích thước 5 mm ² –5 cm ² , ngâm trong formaldehyde 2% (w/v), 4 tháng - Bổ sung H ₂ SO ₄ 0.5 Mm qua đêm ở 4°C - Chiết bằng Na ₂ CO ₃ 4% (w/w) ở 20°C - Kết tủa bằng H ₂ SO ₄ pH=2 - Sấy ở 30°C	- Hiệu suất 33–39%, Mw = 105 kDa

Chiết dung môi rắn-lỏng là phương pháp truyền thống được sử dụng nhiều nhất để chiết các hợp chất phenolic. Quá trình này gồm 5 giai đoạn liên tục: (1) dung môi được ngâm vào gian bào mẫu; (2) dung môi hòa tan chất mục tiêu; (3) chất tan được chiết từ sản phẩm mục tiêu lên bề mặt của gian bào; (4) chất tan được chuyển từ bề mặt ngoài của gian bào sang môi trường dung môi; (5) gian bào mẫu (phần rắn) được tách ra và dung dịch với các hợp chất mong muốn được thu thập. Hiệu quả chiết phụ thuộc vào khả năng hòa tan của các chất mục tiêu trong dung môi sử dụng. Các loại dung môi thường được sử dụng để chiết từ rong nâu là etanol, axeton, metanol hoặc dung dịch nước của chúng.

Chew và cộng sự [107] đã báo cáo hàm lượng các hợp chất phenolic trong chiết xuất metanol (MeOH) và trong hỗn hợp metanol-nước (20% và 50%) của *Padina antillarum*. Hàm lượng cao nhất thu được trong MeOH 50% trong khi hàm lượng thấp hơn 2 lần thu được trong chiết xuất metanol nguyên chất (100%). López và cộng sự [108] đã báo cáo kết quả hoàn toàn trái ngược đối với chiết xuất từ *Halopteris scoparia*, trong đó sản lượng phenolics cao nhất được phát hiện trong chiết xuất MeOH và thấp nhất trong hỗn hợp MeOH-nước 50%. Otero et al [109] cũng báo cáo hàm lượng phenolic cao hơn (hơn 2 lần) trong hỗn hợp etanol-nước (50%) so với chỉ trong etanol, giống như Machu et al. [110] trong chiết xuất MeOH 80% của *Undaria pinnatifida*, trong đó hàm lượng thậm chí cao gấp 4,5 lần so với chiết xuất MeOH nguyên chất. Mặt khác, Del Pilar Sánchez-Camargo et al. [111] đã nghiên cứu dịch chiết *Sargassum muticum* trong nước, etanol (EtOH) và EtOH 50% theo cùng một quy trình ở nhiệt độ khác nhau, hàm lượng phenolic cao nhất được với dịch chiết EtOH, thấp nhất trong dịch chiết nước.

Với nghiên cứu thực hiện bởi Airanthi et al. [112], hàm lượng phenolic của *Eisenia bicyclis*, *Kjellmaniella crassifolia* và *Alaria crassifolia* thu được bằng cách sử dụng dung môi khác nhau trên 100 g rong biển khô cho thấy hàm lượng phenolics cao nhất với dung môi metanol (từ 72 đến 87 mg PCE/100 g). Kết quả này cho thấy mối tương quan với đặc tính chống oxy hóa đã thử nghiệm.

Bảng 1.2. Chiết phenolic từ rong nâu theo phương pháp thông thường [106, 113]

Loài rong	Điều kiện chiết	Hàm lượng phenolic tổng
<i>Alaria crassifolia</i>	Rong/methanol = 1:10; 24 giờ, nhiệt độ phòng	86.82 mg PCE/100 g DW
<i>Eisenia bicyclis</i>	Điều kiện 1: rong/nước=1:100; lắng 10 min ở 80 °C Điều kiện 2: rong/hỗn hợp 30% methanol-1% acetic acid là 1:100; lắng 50 phút ở 70°C Điều kiện 3: : rong/ methanol 80% là 1: 100; lắng 1 h ở 70°C) Điều kiện 4: rong/acetone 70% là 1:100; lắng 30 phút ở 30°C Điều kiện 5: rong/ methanol là 1: 100; lắng 24 giờ ở 23°C)	Điều kiện 1: 19,260 mg GAE/100 g DW Điều kiện 2: 19,280 mg GAE/100 g DW Điều kiện 3: 14,320 mg GAE/100 g DW Điều kiện 4: 8410 mg GAE/100 g DW Điều kiện 5: 950 mg GAE/100 g DW
<i>Cystoseira sedoides</i>	Rong/ethanol 50% là 1:5; 30 phút ở 50°C	2645 mg PGE/100 g DW
<i>Fucus vesiculosus</i>	Rong/ axeton 70% là 1:20; 1 giờ với 400 vòng / phút	110.28–144.51 mg PGE/100 g DW
<i>Nizimuddinina zanardinii</i>	Rong/Methano là 1:4 l; 2 giờ, nhiệt độ phòng	675 mg PGE/100 g DW
<i>Saccharina latissima</i>	Điều kiện 1: rong: nước khử ion là 1: 20; 24 giờ, nhiệt độ phòng Điều kiện 2: rong: nước khử ion là 1: 20; 30 phút ở 90°C Điều kiện 3: rong: ethanol 80% là 1: 20; 24 giờ, nhiệt độ phòng Điều kiện 4: rong: acetone 70% là 1: 20; 24 giờ, nhiệt độ phòng	Điều kiện 1: 470 mg GAE/100 g DW Điều kiện 2: 780 mg GAE/100 g DW Điều kiện 3: 190 mg GAE/100 g DW Điều kiện 4: 520 mg GAE/100 g DW
<i>Padina pavonica</i>	Rong/EtOH 50% là 1:5, lắng 30 phút, 50°C	7.06 mg PGE/g dw
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Điều kiện 1: rong:nước là 1:20, lắng 24 giờ, nhiệt độ phòng	Điều kiện 1: 138 mg PGE/g

	Điều kiện 2: rong:aceton70% là 1:20, lắc 24 giờ, nhiệt độ phòng	Điều kiện 2: 159 mg PGE/g
--	---	---------------------------

Các kỹ thuật chiết xuất fucoidan truyền thống (sử dụng nước nóng, dung dịch axit loãng hoặc dung môi hữu cơ) dựa trên khả năng hòa tan của polysaccharit thành tế bào trong các điều kiện khác nhau. Việc chiết xuất fucoidan thường được thực hiện bằng cách xử lý nguyên liệu rong bằng nước nóng hoặc dung dịch axit (HCl) ở nhiệt độ từ 70–100 °C, qua nhiều bước và trong vài giờ. CaCl₂ có thể được thêm vào hỗn hợp để ngăn chặn sự giải phóng alginate. Chiết xuất thu được sau đó được phân tách thông qua quá trình kết tủa trong dung môi hữu cơ như etanol [76].

Chiết thường với nước nóng (80–100 °C) được sử dụng để chiết xuất polysaccharide sunfat hòa tan trong nước từ *Sargassum henslowianum* và *Dictyopteris divaricate*. Tuy nhiên, phương pháp này không đủ chọn lọc vì tất cả các loại polysaccharide (fucoidan, alginate và laminarin) và các hợp chất hòa tan trong nước khác từ mẫu rong biển cũng có thể được chiết xuất. Do đó, cần có nhiều bước phân lập hơn để tăng độ tinh khiết của phân đoạn với polysaccharit đích. Hơn nữa, để cải thiện năng suất chiết xuất, việc sử dụng dung dịch HCl 0,1 M đã được chứng minh là có hiệu quả vì nó cho phép thủy phân thành tế bào và tạo điều kiện chiết xuất fucoidan và laminarin từ nền. Ngoài ra, axit chuyển đổi alginate thành axit alginic-không tan trong nước và này được loại bỏ cùng với cặn rong biển rắn, tạo ra phần fucoidan tương đối tinh khiết [74].

Để loại bỏ hiệu quả alginate có trong vách tế bào rong nâu, người ta thường sử dụng dung dịch canxi clorua (CaCl₂) 2%. Vì chỉ có muối natri là tan trong nước, nên dung dịch CaCl₂ cho phép chiết xuất và hòa tan fucoidan và natri alginate, đồng thời khuấy trộn cơ học và nhiệt độ cao cũng giúp tăng cường quá trình chiết xuất. Tuy nhiên, khi natri alginate tiếp xúc với các ion canxi, chúng sẽ thay thế các ion natri trong polymer và canxi alginate rắn được hình thành. Nó không hòa tan trong nước, có thể dễ dàng tách ra và để lại fucoidan tương đối tinh khiết trong chiết xuất.

January et al. đã sử dụng cả ba dung môi (muối - CaCl₂, axit và nước) để chiết xuất fucoidan từ *Ecklonia maxima*, *Laminaria pallida* và *Splachnidium rugosum*. Kết quả của họ cho thấy rằng chiết bằng nước nóng thông thường (HWE) dẫn đến nồng độ L-fucose cao nhất trong khi chiết bằng axit dẫn đến hàm lượng sunfat và axit

uronic cao nhất [77]. Ngược lại, trong khi nghiên cứu chiết xuất fucoidan từ *Sargassum fusiforme*, Liu et al. [78] đã đạt được hàm lượng sunfat và axit uronic thấp nhất bằng cách sử dụng axit làm dung môi. Hơn nữa, họ đã đạt được hiệu suất fucoidan cao nhất với dung môi là axit (11,24%) và thấp nhất với phương pháp CaCl_2 (3,94%). Khối lượng phân tử (MW) của fucoidan được chiết bằng axit thấp hơn đáng kể, trong khi chiết bằng axit và muối đã loại bỏ gần như tất cả protein cho thấy độ tinh khiết cao hơn của chiết xuất thu được. Các hoạt động thu dọn gốc tự do và DPPH cao hơn nhiều đối với fucoidan chiết xuất bằng nước và muối so với fucoidan chiết bằng axit, điều này có sự tương quan thuận với hàm lượng axit uronic, MW và thành phần monosacarit (glucose + galactose).

Bảng 1.3. Một số quy trình chiết fucoidan truyền thống [74]

Loài rong	Quy trình, thông số	Hiệu suất
<i>S. henslowianum</i>	- Tiền xử lý: EtOH 95%; 2 × 12 giờ - Chiết: H ₂ O; 3 × 2 giờ; gia nhiệt hồi lưu - Tinh sạch: Kết tủa bằng EtOH; lọc màng (12000 Da)	5.1%
<i>S. fusiforme</i>	- Tiền xử lý: EtOH 95%; 24 h; 30°C - Chiết theo 3 phương pháp: + H ₂ O; 3 giờ; 80°C + 1.0M HCl; 6 giờ; 25°C + CaCl ₂ 2%; 3 giờ; 50°C - Tinh sạch: Kết tủa bằng EtOH, lọc màng (3,5 kDa)	3.94–11.24%
<i>E. maxima</i> <i>L. pallida</i> <i>S. rugosum</i>	Chiết theo 3 cách: - Cách 1: H ₂ O; 24 giờ; 70°C - Cách 2: HCl 0.15M; 2 giờ; 65°C. Sau đó kết tủa bằng EtOH - Cách 3: + Tiền xử lý bằng methanol-chloroform-H ₂ O (4:2:1); qua đêm; nhiệt độ phòng + Chiết bằng CaCl ₂ 2%; 5 giờ; 85°C + Tinh sạch bằng CTAB 10%	-
<i>Fucus serratus</i> <i>F. vesiculosus</i> <i>A. nodosum</i>	- Tiền xử lý: EtOH 85%; qua đêm, nhiệt độ phòng - Chiết: + HCl 0.1M; 4 giờ; 80°C + CaCl ₂ 1%; qua đêm; 4°C - Kết tủa bằng cồn	F. serratus: 4.2–7.5% F. vesiculosus: 8.1–12.2% A. nodosum: 6.5–8.9%

<i>Cystoseira crinite</i>	- Tiền xử lý: methanol-dichloromethane (1:1); 3 × 48 giờ; nhiệt độ phòng	2.8–3.7%
<i>C. compressa</i>	- Chiết: CaCl ₂ 2%; 3 × 3 giờ	
<i>C. sedoides</i>	- Tinh sạch bằng lọc màng (30 kDa)	

Rong biển tươi được ưu tiên sử dụng để chiết xuất fucoxanthin thay vì sử dụng rong khô. Các bước tiền xử lý được sử dụng để cải thiện hiệu quả chiết xuất fucoxanthin từ rong biển. Các phương pháp xử lý nhiệt có chức năng hỗ trợ giải phóng fucoxanthin khỏi các liên kết protein, vô hiệu hóa các enzyme oxidase nội sinh (như peroxidase và polyphenol oxidase) làm phân hủy fucoxanthin, thay đổi cấu trúc của thành tế bào rong biển, thúc đẩy tính thấm của nó và nâng cao tốc độ khuếch tán của dung môi. Chần ấm (40 °C) và nóng (60–100 °C) trong 10–20 phút đã chứng minh khả năng nâng cao hiệu quả chiết xuất fucoxanthin từ *Laminaria* sp., *Sargassum fusiforme*, *Sargassum ilicifolium* và *U. pinnatifida* [125-127]. Sau khi xử lý, rong biển được tiến hành chiết fucoxanthin bằng nhiều phương pháp khác nhau.

Chiết xuất dung môi thông thường được sử dụng phổ biến để chiết xuất fucoxanthin từ rong biển do đơn giản, không tốn kém. Dung môi hữu cơ thường được sử dụng là acetone, chloroform, ethanol, metanol và ethyl acetate hoặc kết hợp các dung môi này [128]. Dung môi khuếch tán qua thành và màng tế bào, sau đó hòa tan các phân tử fucoxanthin nội bào. Cấu trúc hóa học, hằng số điện môi và chỉ số phân cực của dung môi hữu cơ là những thông số chính ảnh hưởng đến khả năng hòa tan của các thành phần [129].

Các kỹ thuật chiết dung môi thông thường bao gồm ngâm chiết (ngâm nóng và lạnh), chiết ngược dòng và chiết Soxhlet. Kỹ thuật ngâm chiết là chiết xuất rắn/lỏng được nghiên cứu với các thông số khác nhau như tỷ lệ nguyên liệu:dung môi, phần trăm dung môi, thời gian, nhiệt độ... Tỷ lệ nguyên liệu: dung môi được nghiên cứu trong phạm vi rộng từ 1:10 đến 1:500 để tối ưu hóa quy trình chiết xuất. Nhiệt độ được kiểm soát đã thử nghiệm cho ngâm chiết nằm trong khoảng từ 4 °C đến 65 °C hoặc trong bể nước đá hoặc ở nhiệt độ phòng, trong khi thời gian đánh giá nằm trong khoảng từ 15 phút đến 96 giờ. Việc lựa chọn dung môi để chiết fucoxanthin sẽ quyết định hiệu quả của quá trình chiết [130]. Trong nghiên cứu chiết xuất fucoxanthin từ *S. siliquosum* và *S. polycystum*, dung môi tốt nhất là MeOH. Trong nghiên cứu này, các điều kiện tốt nhất đạt được ở 30 phút và nhiệt độ 45 °C với tỷ lệ dung môi/chất rắn là 5 mL/g. Hàm lượng fucoxanthin thu được đối với *S. siliquosum*

và *S. polycystum* lần lượt là 491,47 và 449,90 $\mu\text{g/g}$ trọng lượng khô (DW) khi sử dụng EtOH và 706,98 và 521,34 $\mu\text{g/g}$ DW đối với MeOH [131]. Kỹ thuật chiết Soxhlet với ứng dụng nhiệt cung cấp giải pháp thay thế cho ngâm chiết với mức tiêu thụ dung môi thấp hơn vì nó cho phép tái tuần hoàn. Nghiên cứu gần đây cho thấy hiệu suất chiết đối với rong *Saccharina japonica* là 0,45 mg/g, sử dụng n-hexane làm dung môi ở 40 °C trong 16 giờ [132]. Một nghiên cứu khác với *Undaria pinnatifida* cho thấy điều kiện tốt nhất chiết soxhlet là 12 giờ ở 78 °C với EtOH dẫn đến hiệu suất 50 $\mu\text{g/g}$ [133].

Kỹ thuật chiết xuất truyền thống sử dụng lượng lớn dung môi, thời gian kéo dài (lên đến 24 giờ) cũng như nhu cầu chiết xuất lặp lại. Ngoài ra, thời gian chiết xuất dài có thể ảnh hưởng đến chất lượng của fucoxanthin. Việc thu hồi, xử lý dung môi đã qua sử dụng yêu cầu chi phí cao.

1.2.2. Công nghệ hiện đại

1.2.2.1. Chiết xuất có hỗ trợ siêu âm (UAE)

Đây là kỹ thuật chiết xuất với yêu cầu lượng dung môi thấp, thân thiện với môi trường, xử lý dễ dàng và tốc độ chiết xuất nhanh. Nó có thể được sử dụng kết hợp với các kỹ thuật chiết xuất không thông thường khác. Hiệu quả của phương pháp này dựa trên nhiều yếu tố khác nhau như nhiệt độ, thời gian chiết xuất, công suất siêu âm,.... Youssouf và cộng sự (2017) đã nghiên cứu chiết xuất alginate từ *Sargassum binderi* và *Turbinaria ornate* với việc bổ sung xử lý siêu âm ở pH, tỷ lệ nạp chất rắn và thời gian chiết xuất khác nhau [67]. Ở điều kiện tối ưu (pH=12, sử dụng Na_2CO_3 , tỷ lệ rong/nước=10g/L, với siêu âm ở 25 kHz, 150 W trong 40 phút), hiệu suất chiết xuất alginate đạt 54,06%. Có thể thấy, thời gian chiết xuất alginate đã giảm đáng kể – từ khoảng 2 giờ đối với phương pháp thông thường xuống còn 15–30 phút với sự hỗ trợ của siêu âm.

UAE được sử dụng rộng rãi trong chiết xuất polyphenol do tiêu thụ năng lượng và dung môi thấp. UAE thực hiện tốt việc chiết xuất polyphenol từ các loại thực vật khác nhau cũng như phlorotannins từ rong nâu. Thiết bị của UAE có thể là bể siêu âm (siêu âm gián tiếp) hoặc đầu dò siêu âm (siêu âm trực tiếp). Theo V. Ummat và cộng sự, so với chiết dung môi truyền thống, các điều kiện UAE được tối ưu hóa (35 kHz, 30 phút và 50% ethanol) có thể tăng năng suất chiết xuất của tất cả các loại rong biển được nghiên cứu từ 1,5 lần lên 2,2 lần [116]. Kadam et al. [117] báo cáo sản

lượng phenolic cao hơn trong chiết xuất *Ascophyllum nodosium* và *Laminaria hyperborea* thu được từ UAE so với chiết xuất thông thường.

Tuy nhiên, có báo cáo rằng UAE sẽ làm cho một số chất phenolic bị phân hủy trong quá trình chiết xuất và tạo ra các gốc hydroxyl hoạt tính cao trong bong bóng. Mặc dù các gốc tự do tạo ra trong bong bóng tạo bọt trong quá trình UAE, nhưng điều kiện vận hành nhẹ nhàng thường được sử dụng ở UAE sẽ đảm bảo không có thay đổi lớn được tạo ra đối với cấu trúc, chức năng của phần lớn hoạt chất sinh học được chiết xuất. Tại UAE, hiện tượng xâm thực, nhiệt và cơ học có tác động đáng kể đến quá trình chiết. Hơn nữa, việc sử dụng UAE với quy mô công nghiệp là phù hợp do sự tiện lợi của phương pháp chiết xuất này [113].

UAE có thể kết hợp với các công nghệ phi truyền thống khác như xử lý enzym hoặc MAE [74]. Quá trình chiết xuất fucoidan bằng siêu âm từ nguyên liệu thô được thực hiện dưới ảnh hưởng của siêu âm tần số thấp với thời gian ngắn, có thể trong môi trường axit hóa. Ngoài ra, nước và cồn cũng có thể được sử dụng làm môi trường xử lý. Sự xâm thực âm thanh ở UAE tạo ra các lực vật lý như lực cắt, sóng xung kích, tia cực nhỏ và dòng âm thanh, gây ra sự phá vỡ thành tế bào, giảm kích thước hạt và tiếp xúc tốt hơn giữa dung môi và hợp chất mục tiêu. Hơn nữa, siêu âm gây ra sự hình thành và sụp đổ nhanh chóng của bong bóng tạo bọt trong môi trường chất lỏng được xử lý, dẫn đến ứng suất mạnh và sự phân tách chuỗi không thể đảo ngược [74,86].

Wan và cộng sự (2015) đã áp dụng thiết kế Box–Behnken (BBD) kết hợp với RSM để tối ưu hóa chiết xuất siêu âm cho polysaccharit từ *L. japonica*. Các điều kiện tối ưu hóa thu được là thời gian chiết ở 54 phút, công suất siêu âm ở 1050 W, nhiệt độ chiết ở 80°C, tỷ lệ nguyên liệu : dung môi là 1:50 (g/ ml). So với chiết truyền thống sử dụng nước nóng, chiết siêu âm có thời gian ngắn hơn, hiệu quả hơn [87].

Xử lý *Sargassum muticum* trong nước bằng sóng siêu âm ở tần số 40 kHz, với công suất 150 W trong 5–30 phút ở 25°C dẫn đến việc sản xuất fucoidan với năng suất cao ($147,6 \pm 8,0$ g/kg nguyên liệu thô) [88]. Về đặc điểm cấu trúc, fucoidan được phân lập bằng siêu âm có hàm lượng fucose thấp hơn [89]. Fucoidan thu được bằng cách chiết siêu âm từ *Nizamuddiniana zanardinii* spp. ở tỷ lệ nước/nguyên liệu thô là 80:1 (công suất 196 W, nhiệt độ chiết xuất 70°C trong 58 phút) ức chế hiệu quả sự phát triển của tế bào ung thư HeLa (62,36%) và HepG2 (56,83%) [90].

Trong nghiên cứu của Okolie và cộng sự, chiết siêu âm ở tần số 20 kHz trong 35 phút với môi trường nước chứa HCl 0,01 M, sau đó là xử lý dịch chiết với 2% (w/v) CaCl₂ và 4 lần thể tích ethanol 95% [84]. Fucoidan thu được từ *Ascophyllum nodosum* spp. cho thấy một hoạt động prebiotic cao tương tự như inulin prebiotic tiêu chuẩn. Việc bổ sung chiết xuất fucoidan vào canh thang MRS (de Man, Rogosa và Sharpe), nồng độ cuối cùng là 0,1 và 0,5% đã cải thiện sự phát triển của *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* [84]. Khi sử dụng còn làm dung môi chiết siêu âm, hiệu suất thu fucoidan tăng 16,8% so với sử dụng nước nóng. Bằng cách này, fucoidan thu được từ *Sargassum mcclurei* với tỷ lệ dung môi/rong là 24:1, thời gian chiết xuất là 49 phút ở 54°C, với công suất siêu âm là 360 W [91].

Tiếp xúc với siêu âm cũng được biết là dẫn đến sự gia tăng hoạt động của enzyme khi được kết hợp cùng nhau. Phương pháp chiết siêu âm - enzyme cho phép thu được polysaccharit có trọng lượng phân tử thấp hơn, sản lượng fucoidan cao hơn so với phương pháp siêu âm (từ 3,6% đến 7,87%) [92]. Trọng lượng phân tử trung bình của fucoidan phân lập bằng phương pháp siêu âm là 1020,85 kDa và siêu âm- enzyme là 443,70 kDa [92].

Chiết siêu âm có thể được kết hợp với các tác động cơ học khác ngoài các tác nhân hóa học. Ví dụ, kết hợp giữa sóng siêu âm (200 W, 20 kHz, 55°C) và vi sóng (700 W, 90°C) dẫn đến sự gia tăng hàm lượng fucoidan sulfat lên 27,16% [83].

UAE được sử dụng phổ biến để chiết xuất các loại caroten và các hoạt tính sinh học có giá trị cao (ví dụ: lutein, astaxanthin, canthaxanthin, b-caroten, axit docosahexaenoic, axit eicosapentaenoic) từ nguyên liệu phức hợp [134]. UAE cũng được dùng để chiết xuất fucoxanthin từ *Padina tetrastromatica*. Điều kiện tối ưu hóa đối với nồng độ dung môi, nhiệt độ và thời gian lần lượt là EtOH 80%, 50 °C và 30 phút. Tại điều kiện này thu được 750 µg/g DW fucoxanthin, cao hơn so với hàm lượng fucoxanthin thu được bằng phương pháp chiết xuất thông thường [135].

Eom và các cộng sự đã thực hiện chiết xuất bào tử ở quy mô pilot (20 L, tối đa 60 L), bao gồm polysaccharit và fucoxanthin từ *U. pinnatifida* bằng cách sử dụng UAE tuần hoàn và so sánh hiệu suất với chiết xuất axit thông thường và UAE ở quy mô phòng thí nghiệm (1 L) [136]. UAE ở quy mô pilot được thực hiện với nước làm dung môi trong các điều kiện 960 W, biên độ 80%, 20 kHz, 30 °C và 3 giờ, trong khi UAE ở quy mô phòng thí nghiệm được thực hiện với HCl 0,1 M làm dung môi ở các

điều kiện 800 W, biên độ 80%, xung 20 giây bật/20 giây tắt, 25 °C và 6 giờ. Đối với chiết axit thông thường, trước tiên, mẫu được xử lý trước bằng etanol 85% với tỷ lệ rắn lỏng = 1:100, 70 °C và trong 2 giờ để loại bỏ lipid và sắc tố, sau đó kết tủa được chiết xuất bằng HCl 0,1 M ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Cả quy trình chiết axit thông thường và quy mô phòng thí nghiệm của UAE đều yêu cầu các bước trung hòa trước khi tinh chế tiếp theo. UAE quy mô pilot đạt năng suất cao nhất là 53% so với 24,7% và 33% của quy trình chiết xuất axit thông thường và quy mô phòng thí nghiệm của UAE với các ưu điểm bổ sung là loại bỏ bước tiền xử lý loại bỏ lipid và sắc tố, quy trình trung hòa và quy trình thẩm tách. Đây là một trong những báo cáo đầu tiên về UAE quy mô pilot của fucoxanthin, tuy nhiên, thời gian chiết (tính theo giờ) dài hơn đáng kể so với các tài liệu khác (tính theo phút).

1.2.2.2. Chiết xuất có hỗ trợ enzyme (EAE)

Chiết xuất polysaccharit bằng phương pháp EAE ngày càng được chú ý do đặc điểm thân thiện với môi trường, không độc hại và nhanh chóng. Enzyme có phản ứng đặc hiệu với một chất nền cụ thể hoặc một nhóm chất nền và giúp giữ cho các chất mục tiêu không bị ảnh hưởng trong gian bào sinh khối. Cellulase và protease (ví dụ: Alcalase) được sử dụng phổ biến để chiết xuất alginate (cũng như polysaccharit khác) từ rong nâu, tương ứng nhắm vào cellulose và protein. Borazjani và cộng sự (2017) đã thực hiện chiết alginate từ *Sargassum angustifolium* với sự hỗ trợ của enzyme [70]. Người ta kết luận rằng phương pháp tiền xử lý bằng enzym alcalase (5% w/w, pH 8, 50 °C, 24 h) hoặc cellulase (5% w/w, pH 4.5, 50 °C, 24 h) làm giảm đáng kể hàm lượng protein và polyphenol trong sản phẩm alginate so với phương pháp tiền xử lý bằng axit loãng (HCl 0,1 M, pH 2, 65 °C, 3h, 3 lần). Tuy nhiên, trọng lượng phân tử của alginate thu được từ quy trình có sự hỗ trợ của enzyme đã giảm từ 557 kDa xuống 356 kDa. Gần đây, Okolie và cộng sự (2020) đã so sánh UAE, MAE và EAE với quy trình chiết xuất alginate thông thường từ *Ascophyllum nodosum*. Chiết xuất với sự hỗ trợ của enzyme cho năng suất cao nhất, nhưng không có khác biệt đáng kể về tỷ lệ M/G của sản phẩm [71]. Nhìn chung, do chi phí cao của enzyme, lợi ích của EAE không hứa hẹn đối với việc sản xuất alginate, mặc dù quy trình EAE có thể được tối ưu hóa hơn nữa.

Enzyme có thể được sử dụng để thúc đẩy quá trình phá vỡ thành tế bào và quá trình chiết xuất sử dụng enzyme là một kỹ thuật thuận lợi do tính chọn lọc đối với các

hợp chất mục tiêu, điều này rất quan trọng đối với các chất bị phân huỷ và không ổn định. So với các phương pháp thông thường, EAE có thể thu được các chất có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn [118]. EAE có khả năng chiết xuất hiệu quả hoạt chất sinh học, đây là phương pháp “xanh”, không độc hại, có thể sử dụng để sản xuất thực phẩm quy mô lớn (sử dụng enzyme cấp thực phẩm) [113]. Chiết xuất từ rong biển nâu *Ecklonia cava* thu được sản lượng polyphenol là 20% với enzyme Celluclast (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Đan Mạch) [119]. Khi so sánh các enzyme được thử nghiệm trong tài liệu khoa học, viscozyme và alcalase là hiệu quả nhất để chiết xuất lượng polyphenol cao từ các loài rong biển theo các quy trình EAE [113, 120, 121]. Ngoài ra, sự hiệp đồng chiết xuất của hai enzyme cũng đã được quan tâm trong một số nghiên cứu và có thể được nghiên cứu nhiều hơn trong tương lai [113, 122].

Enzyme hỗ trợ quá trình phân hủy polysaccharit của thành tế bào được sử dụng rộng rãi để cải thiện hiệu quả chiết xuất đối với các hợp chất có hoạt tính sinh học. EAE cho năng suất chiết xuất cao hơn, điều kiện êm dịu hơn, tiêu thụ năng lượng thấp hơn và thu hồi đơn giản hơn với việc sử dụng dung môi giảm so với chiết thông thường. Thành tế bào rong biển không đồng nhất về mặt hóa học và cấu trúc nên việc sử dụng hỗn hợp enzyme được xác định rõ là cần thiết. Hơn nữa fucoidan được liên kết chặt chẽ với cellulose và protein, làm hạn chế khả năng chiết xuất của chúng bằng hóa chất, nên quá trình thủy phân của chúng bằng các enzyme thủy phân carbohydrate và protease có bán trên thị trường có thể tạo điều kiện làm suy yếu phức hợp thành tế bào và giải phóng chất mục tiêu mà không bị phân hủy đáng kể. Một số enzym có sẵn trên thị trường và thường được sử dụng là: Alcalase, Viscozyme, Celluclast, AMG, Termamyl và Ultraflo. Ngoài loại enzyme, các thông số quy trình khác (nhiệt độ, thời gian, pH, nồng độ và tỷ lệ enzyme trên mẫu...) đều rất quan trọng đối với quy trình chiết xuất và cần được tối ưu hóa.

Kết quả được chứng minh bởi Alboofetileh et al. [93] cho thấy Alcalase phá vỡ thành tế bào tốt hơn. Do đó, hiệu quả chiết xuất fucodian cao hơn (5,58%) thu được với sự hỗ trợ của enzym so với chiết nước nóng thông thường (5,2%). Sản lượng thu fucoidan bằng cách sử dụng Celluclast (4,8%) và Viscozyme (4,28%) thấp hơn so với chiết thường. Nguyên nhân có thể do các polysaccharit bị thủy phân một phần sau thời gian chiết xuất kéo dài (24 giờ) với sự có mặt của các enzym.

Nghiên cứu của Hammed et al. [94] tiết lộ rằng thời gian thủy phân, giai đoạn chiết xuất và nồng độ enzyme có tác động tích cực đáng kể đến sản lượng polysaccharit sunfat. Theo đó, hiệu suất fucoidan cao nhất (25,13%) trong điều kiện tối ưu với thời gian thủy phân là 19,5 giờ, 2 giai đoạn chiết xuất và nồng độ enzyme là 1,5 $\mu\text{l}/\text{mL}$.

Oh và cộng sự (2020) đã nghiên cứu fucoidan thu được từ bào tử *U. pinnatifida* chiết có sử dụng enzyme Celluclast. Fucoidan thu được chứa 30,4% sulfat và 52,3% fucose. Fucoidan giàu sulfat thu được từ quy trình thân thiện với môi trường, có thể được sử dụng như một tác nhân chống oxy hóa có lợi trong sản xuất thực phẩm chức năng [95].

Nguyen Thi Thuan và cộng sự (2020) đã so sánh fucoidan chiết bằng axit HCl 0,1M và chiết có sự hỗ trợ enzyme của *Fucus evanescens* và *Saccharina latissima*. Quy trình EAE này sử dụng kết hợp một bước chế phẩm cellulase thương mại (CellicfiCTec2) và lyase alginate từ *Sphingomonas* sp. (SALy), phản ứng ở pH 6,0, 40°C, loại bỏ các polysaccharit không phải fucoidan bằng kết tủa Ca^{2+} và kết tủa etanol của fucoidan thô. Fucoidan thô thu được từ EAE chứa alginate có trọng lượng phân tử thấp với một lượng đáng kể. Tuy nhiên, alginate còn lại này đã được loại bỏ hiệu quả bằng sắc ký trao đổi ion bổ sung để tạo ra fucoidan tinh khiết. Sản lượng fucoidan thu được bằng EAE tương đương hoặc cao hơn một chút so với chiết xuất hóa học đối với cả *F. evanescens* và *S. latissima*, nhưng kích thước phân tử của fucoidan lớn hơn đáng kể với quá trình EAE. Sự phân bố trọng lượng phân tử của các phần fucoidan là 400 đến 800 kDa đối với *F. evanescens* và 300 đến 800 kDa đối với *S. latissima*, trong khi trọng lượng phân tử của fucoidan được chiết xuất hóa học tương ứng từ các loại rong biển này là 10–100 kDa và 50–100 kDa [96].

Đây là kỹ thuật chiết xuất ít độc hại, an toàn với môi trường, được áp dụng để chiết xuất fucoxanthin từ rong với các bước tiền xử lý bằng enzyme và chiết xuất có sự hỗ trợ của enzyme (EAE). So với kỹ thuật chiết xuất khác, EAE không phụ thuộc vào thiết bị sử dụng nhiều năng lượng, có thể áp dụng ở quy mô lớn, không có chất thải độc hại [125, 130, 134].

Một nghiên cứu với *Fucus vesiculosus* cho thấy rằng bằng cách sử dụng enzyme Viscozyme, điều kiện tốt nhất là tỷ lệ enzyme/nước là 0,52%, tỷ lệ rong biển/nước là 5,37% và thời gian ủ enzyme là 3 giờ. Những điều kiện này cho phép thu được 0,657 mg fucoxanthin/g DW [137]. Chiết xuất fucoxanthin từ *U. pinnatifida*

bằng cách sử dụng tiền xử lý bằng enzym và sau đó là dimetyl ete (DME)+EtOH cho phép hiệu suất lên đến 96%, các thông số tối ưu cho quá trình tiền xử lý là 37 °C ở pH 6,2 trong 2 giờ, chất rắn 5% (w/v), với 0,05% trọng lượng enzyme sử dụng trộn liên tục [138].

Tuy nhiên, EAE có thể không phù hợp với các ứng dụng chiết fucoxanthin quy mô lớn do những nhược điểm chính như quá trình enzyme kéo dài, chi phí enzyme tương đối cao, tính chọn lọc thấp và năng suất kém.

1.2.2.3. Chiết xuất có hỗ trợ vi sóng (MAE)

Phương pháp này được sử dụng phổ biến để chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nguyên liệu tự nhiên. Bức xạ vi sóng được sử dụng để tăng tốc độ chiết bằng cách làm nóng dung môi hiệu quả và nhanh chóng. Có ý kiến cho rằng nhiệt do vi sóng tạo ra làm bay hơi nước trong các tế bào rong biển dẫn đến tăng áp suất lên thành tế bào khiến thành tế bào bị vỡ một cách hiệu quả và sau đó giải phóng các hợp chất giữa các tế bào vào dung môi chiết. Yuan và MacQuarrie (2015) đã giới thiệu phương pháp gia nhiệt vi sóng thay vì gia nhiệt thông thường trong quá trình chiết xuất alginate [68]. Chiếu xạ vi sóng được sử dụng trong ba giai đoạn, bước đầu làm khô rong biển tươi (*Ascophyllum nodosum*, 80–94 °C trong 24 phút với chân không), giai đoạn tiền xử lý bằng HCl (90 °C trong 15 phút) và giai đoạn chiết xuất bằng Na₂CO₃ (100°C trong 10 phút). Khi chiết xuất alginate cùng với thu hồi fucoidan, thu được hiệu suất 18,24% với trọng lượng phân tử trung bình là 75 kDa. Việc bỏ qua bước fucoidan đã làm tăng hiệu suất chiết xuất lên 23,13% với sự gia tăng đáng kể về trọng lượng phân tử của alginate (195 kDa). Gần đây, Torabi và cộng sự (2022) đã đánh giá tác động của nhiệt độ, thời gian chiết, công suất vi sóng và tỷ lệ nạp rong đến năng suất chiết xuất bằng MAE để chiết xuất *Nizimuddinia zanardini* [69]. Hiệu suất chiết xuất tốt nhất là 31,39% thu được ở nhiệt độ tiền xử lý là 67°C, công suất vi sóng là 400 W và tỷ lệ nạp sinh khối là ~1:30 (w/v) trong 19 phút. Trong nghiên cứu này, gia nhiệt vi sóng chỉ được sử dụng trong giai đoạn tiền xử lý với HCl ở pH=1.

MAE dựa trên sự gia nhiệt vi sóng gây ra bởi sự quay lưỡng cực của dung môi phân cực và sự dẫn ion của các ion hòa tan. MAE có thể làm tế bào phồng lên nhanh chóng gây vỡ và tăng áp suất bên trong tế bào đến một mức độ nhất định, điều này sẽ gây ra sự giải phóng nhanh chóng các polyphenol vào dung môi. Ưu điểm chính của MAE đối với chiết xuất polyphenol là hiệu quả cao và thời gian chiết xuất ngắn cần

thiết để thu được các hợp chất này. MAE có thể tăng sản lượng phlorotannins lên 70% so với chiết dung môi thông thường [114]. Việc sử dụng MAE để chuẩn bị các chiết xuất MeOH của *Ascophyllum nodosum*, *Lessonia nigrecens*, *Lessonia trabeculate* và *Saccharina japonica* dẫn đến hàm lượng phenolics cao hơn so với chiết xuất thu được bằng cách lắc ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ [115]. Tuy nhiên, MAE cũng có thể phân hủy các polyphenol rong nâu nhạy cảm với nhiệt ở một mức độ nhất định [113].

MAE là một trong những kỹ thuật chiết xuất hiệu quả, có thể khắc phục nhược điểm của các kỹ thuật chiết thông thường. Trong quá trình xử lý vi sóng, nhiệt được tạo ra trực tiếp bên trong vật liệu (gia nhiệt phân bố theo thể tích) bằng sự dẫn ion của các ion hòa tan và/hoặc sự quay lưỡng cực của dung môi phân cực. Do đó, các hợp chất không phân cực không được làm nóng khi tiếp xúc với vi sóng. Sự gia nhiệt nhanh bên trong trong quá trình MAE gây ra sự phá vỡ thành tế bào hiệu quả và giải phóng các hợp chất nội bào vào dung môi chiết.

Rodriguez-Jasso et al. đã chỉ ra rằng tương tác giữa áp suất và thời gian chiết MAE rất có ý nghĩa ($p < 0,01$) đối với lượng fucoidan từ *Fucus vesiculosus* và hiệu suất tối đa (18,22%) đạt được khi chiết 1 g rong/25 ml nước ở áp suất cao nhất (120 psi), thời gian chiết thấp nhất (1 phút) đã được áp dụng. Hàm lượng fucoidan thu được này tương đương với lượng polysaccharit thu được bằng nhiều lần chiết xuất ở 70°C [79].

Lorbeer và cộng sự (2015) đã chứng minh động học chiết xuất fucoidan từ *Ecklonia radiata* dùng HCl (pH 2.0) ở 60°C bằng cách sử dụng cả gia nhiệt đối lưu và vi sóng trong các bình hở trong tối đa 3 giờ. Các kết quả chỉ ra rằng việc tối đa hóa sản lượng fucoidan thường phải trả giá bằng độ tinh khiết và tính toàn vẹn cấu trúc. Vi sóng cung cấp một giải pháp thay thế hiệu quả cao và có thể kiểm soát được đối với hệ thống gia nhiệt đối lưu [80,81].

Hiện tại, phương pháp MAE đã được áp dụng phổ biến để chiết xuất polysaccharit. Yuan và Macquarrie (2015) đã chiết xuất fucoidan với sự hỗ trợ của vi sóng từ *Ascophyllum nodosum*. Hiệu suất fucoidan tối ưu là 16,08% thu được ở 120°C trong 15 phút chiết xuất. Bản chất trung gian vi sóng của phương pháp này làm cho nó hiệu quả về cả thời gian và nguyên liệu, đồng thời sử dụng nước làm dung môi [82].

Polysacarit thu được từ MAE có nồng độ nhóm sunfat cao hơn và MW thấp hơn. Alboofetileh và cộng sự [83] đã báo cáo hàm lượng sunfat cao hơn và MW cao hơn trong khi Yuan và Macquarrie [82] báo cáo rằng hàm lượng sunfat thấp hơn và MW của polysacarit được chiết xuất bởi MAE thấp hơn so với chiết nước nóng (HWE). MAE không có ảnh hưởng đáng kể đến loại liên kết glycosid và thành phần monosacarit trong fucoidan từ *Sargassum thunbergii* [85] trong khi hàm lượng fucose cao hơn đã được báo cáo đối với fucoidan *A. nodosum* và *N. zanardinii* cũng như hàm lượng axit uronic thấp hơn [82-84]. Hơn nữa, chiết xuất polysacarit thu được từ MAE cho thấy hoạt tính chống oxy hóa và thu hồi gốc hydroxyl cao hơn cũng như hoạt động hạ đường huyết tiềm ẩn do MW thấp hơn và hàm lượng nhóm sunfat cao hơn so với chiết thường [85]. Fucoidan được chiết xuất bởi MAE ở 90°C có tác dụng loại bỏ DPPH tương đương và khả năng khử thậm chí còn cao hơn so với fucoidan được chiết thường [82].

Các thông số MAE cũng có ảnh hưởng mạnh mẽ đến thành phần monosacarit fucoidan, mức độ sunfat hóa, MW và các hoạt động sinh học. Thành phần monosacarit của fucoidan từ *A. nodosum* chỉ ra rằng fucose là thành phần chính của fucoidan được chiết xuất ở 90 °C trong khi axit glucuronic là thành phần chính của fucoidan được phân lập ở 150 °C [82]. Tương tự, bằng cách tăng áp suất chiết xuất từ 30 psi lên 120 psi, hàm lượng fucose trong fucoidan từ *F. vesiculosus* giảm từ 100% xuống 27% và hàm lượng galactose tăng từ 0% lên 57% [79]. Ngoài mức độ sunfat hóa của fucoidan giảm khi tăng nhiệt độ chiết xuất trong MAE, tác dụng nhất rác đối với các gốc tự do DPPH và khả năng khử cũng giảm khi tăng nhiệt độ và thời gian [79, 82].

MAE được đánh giá là kỹ thuật chiết xuất nhanh, hiệu quả. Hiệu ứng nhiệt được tạo ra từ sóng điện từ thúc đẩy sự phân hủy nhanh chóng của màng quang hợp bằng cách đốt nóng có chọn lọc phần phân cực hơn của cellulose. Hiệu ứng làm nóng này rất hữu ích để giải phóng fucoxanthin từ phức hợp fucoxanthin-chl a/c-protein [134, 139]. Sử dụng MAE để chiết xuất fucoxanthin từ *L. japonica*, *U. pinnatifida* và *S. fusiforme* với dung môi EtOH và Aceton thu được hiệu suất tốt nhất. Vì lý do an toàn, EtOH đã được chọn để phân tích thêm, tỷ lệ dung môi/mẫu là 10:1 (mL/g) ở 50°C trong 10 phút. Sản lượng thu được lần lượt là 5.13, 109.30 và 2.12 mg/100 g đối với mỗi loại rong [140]. Hơn nữa, MAE với các điều kiện 300 W, 2,45 GHz và 30 giây đã được sử dụng như một bước tiền xử lý để tăng cường chiết xuất CO₂ siêu

tới hạn của fucoxanthin từ *U. pinnatifida* bằng cách phá vỡ màng tế bào và thúc đẩy khả năng khuếch tán của dung môi qua gian bào [141]. Xu và cộng sự kết hợp MAE-EAE để chiết xuất fucoxanthin từ *S. japonica* [142], điều kiện tối ưu hóa là nhiệt độ vi sóng 42,6 °C, phức hợp enzyme (pectinase hoặc cellulase) với tỷ lệ 1,12, hiệu suất chiết xuất fucoxanthin đạt 0,443 mg/g.

1.2.2.4. Một số phương pháp hiện đại khác

❖ Chiết chất lỏng điều áp (PLE)

Chiết chất lỏng điều áp (PLE) hay chiết dung môi điều áp (PSE) là kỹ thuật sử dụng dung môi lỏng để chiết xuất dưới áp suất cao. Dung môi có thể sử dụng ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ sôi của nó để tăng tốc độ truyền khối cũng như chiết xuất. Việc tăng nhiệt độ chiết xuất có thể thúc đẩy độ hòa tan, tốc độ truyền khối của phlorotannin, làm giảm độ nhớt và sức căng bề mặt của dung môi, dẫn đến tăng tính thấm của dung môi vào gian bào để chiết xuất hợp chất mục tiêu. Ngoài ra, PSE giúp giảm thời gian, tăng sản lượng chiết xuất của hợp chất mục tiêu, có thể áp dụng công nghệ tự động hóa để tiến tới sản xuất ở quy mô lớn. So với phương pháp truyền thống, PSE đắt hơn nhưng giảm đáng kể việc sử dụng dung môi, có thể nghiên cứu và áp dụng quy trình vận hành với quy mô công nghiệp [113]. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, việc áp dụng phương pháp PLE để chiết rong đều thu được hàm lượng phenolic cao hơn [106, 111, 123, 124]. Ngoài ra, sự kết hợp của PSE và EAE cũng cải thiện hiệu quả chiết xuất phlorotannins từ rong *Sargassum muticum* [111].

Bảng 1.4. Chiết xuất phenolic từ rong theo phương pháp PLE [106, 113]

Loài rong	Phương pháp và điều kiện chiết	Hàm lượng phenolic tổng
<i>Dictyota dichotoma</i>	PLE, dung môi dichlometan (DCM), MeOH, nhiệt độ 75°C, áp suất 1500 psi	18,8 mg PGE/g
<i>Padina sp.</i>	UAE, rong/ EtOH 70% = 1:50, 1 giờ, 150 W, 30°C	124,65 mg GAE/g
<i>Ascophyllum nodosum</i>	PLE Điều kiện 1: dung môi nước, 120°C, 1500 psi Điều kiện 2: dung môi EtOH 80%, 100°C, 1000 psi Điều kiện 3: dung môi aceton 80%, 60°C, 1000 psi	Điều kiện 1: 93,44 mg PGE/g Điều kiện 2: 101,30 mg PGE/g Điều kiện 3: 127,37 mg PGE/g

<i>Cystoseira abies-marina</i>	PLE, rong/nước = 1:10, 20 phút, 100°C hoặc 200°C, 1500 psi	6.81 mg GAE/g (100°C) 48.09 mg GAE/g (200°C)
<i>Fucus ceranoides</i>	PLE, dung môi DCM và MeOH, 75°C, 1500 psi	54,7 mg PGE/g

PLE sử dụng nhiệt độ và áp suất cao để chiết xuất các hợp chất từ mẫu trong môi trường không có oxy và ánh sáng, trong khoảng thời gian ngắn và sử dụng ít dung môi hơn. Nhiệt độ cao cho phép mẫu dễ hòa tan hơn và đạt được tốc độ khuếch tán cao hơn, trong khi áp suất cao giữ cho dung môi ở dưới điểm sôi của nó.

PLE chiết fucoidan cao hơn nhiều so với phương pháp truyền thống. Nhiệt độ cao (>100 °C) và áp suất (> 10 MPa) làm thay đổi tính chất vật lý của dung môi giúp cải thiện khả năng thâm nhập, hiệu ứng mao dẫn và phá hủy tế bào, dẫn đến tăng sản lượng fucoidan của PLE dùng nước làm dung môi (13,15%) so với phương pháp chiết thông thường (5,2%) từ *N. zanardinii* [83]. Cùng với năng suất được cải thiện, thời gian chiết xuất giảm từ 6 giờ (hai chu kỳ 3 giờ) xuống còn 20 phút (hai chu kỳ 10 phút). Trong một nghiên cứu khác, hiệu suất chiết xuất *S. japonica* cao hơn 4 lần bởi PLE (140°C, 50 bar) với NaOH 0,1% làm dung môi so với chiết thường bằng HCl 0,05M [97].

Bằng cách sử dụng NaOH 0,1%, axit formic 0,1% và nước làm dung môi chiết, nhiệt độ cao hơn ảnh hưởng tích cực đến hàm lượng sunfat. Fucoidan được chiết xuất bằng axit formic 0,1% có hàm lượng sunfat thấp nhất, tiếp theo là chiết xuất bằng nước và chiết xuất bằng NaOH 0,1%. Liên kết este giữa chuỗi polysaccharit và nhóm sunfat không dễ bị phá vỡ bởi NaOH trong khi nước ở nhiệt độ cao phá vỡ liên kết este hiệu quả hơn [97]. Hàm lượng axit uronic cao nhất trong fucoidan chiết xuất thu được bằng cách sử dụng axit formic ở 110°C và 25 bar, trong khi nồng độ đường tổng cao nhất thu được ở 140°C và 50 bar [97] và ở 180°C và 13 bar [99]. Khi nhiệt độ và áp suất tiếp tục tăng, nồng độ axit uronic và đường giảm dần cho thấy monosaccharit không ổn định ở nhiệt độ và áp suất cao hơn [99]. Fucose là monosaccharit chính của fucoidan được chiết xuất bởi PLE, trong khi mannose, galactose, xyloza và glucose cũng có mặt trong phần lớn các mẫu [97,98]. Fucoidan chiết xuất bằng axit formic thấp hơn đáng kể so với chiết xuất bằng NaOH 0,1%, nước hoặc ethanol, cho thấy rằng chiết xuất axit có thể đã gây ra sự phân hủy chuỗi polysaccharite [97]. Fucoidan

thu được cho thấy hoạt tính chống oxy hóa tốt, chống phân bào và chống tăng sinh vừa phải trong các dòng tế bào [74].

Kỹ thuật này dựa trên việc áp dụng nhiệt độ và áp suất cao bằng dung môi lỏng. Đây cũng là một phương pháp xanh vì nó sử dụng lượng dung môi thấp và thời gian ngắn. Hơn nữa, PLE có ưu điểm bổ sung là môi trường không có oxy và ánh sáng thuận lợi cho việc chiết xuất fucoxanthin. Thực hiện PLE với rong nâu *Eisenia bicyclis*, các thông số ảnh hưởng đến quá trình là nhiệt độ và nồng độ EtOH, giá trị tối ưu là 110°C và 90% EtOH, hiệu suất đạt được là 0,42 mg/g [143].

❖ Chiết xuất có hỗ trợ ép đùn (ExEA)

Ép đùn là một quá trình cơ nhiệt được sử dụng để sản xuất thực phẩm có hàm lượng tinh bột cao. Peggy Vauchel và cộng sự (2008) đã nghiên cứu quá trình ép đùn phản ứng để chiết xuất alginate từ *Laminaria digitata* [72]. Chiết kiềm ép đùn phản ứng dường như hiệu quả hơn so với chiết kiềm theo mẻ do thời gian chiết giảm từ khoảng một giờ xuống chỉ còn vài phút, yêu cầu về nước và chất phản ứng (Na_2CO_3 4%) đều giảm một nửa mà năng suất chiết xuất cao hơn 15% và các đặc tính lưu biến của sản phẩm đều được tăng cường.

Gần đây, Sugiono và cộng sự đã áp dụng công nghệ ép đùn trong chiết xuất alginate từ rong nâu *Sargassum cristaefolium* [73]. So với quy trình chiết xuất alginate thông thường, một máy đùn đã được đưa vào giai đoạn chiết xuất Na_2CO_3 để thay thế cốc/bể phản ứng. Các thông số vận hành, như nhiệt độ, tỷ lệ nạp rong, tốc độ cấp liệu của máy đùn và độ pH đã được nghiên cứu. Hiệu suất chiết xuất tốt nhất quan sát được là 45,54%, trong khi có thể đạt được trọng lượng phân tử lên tới 217,94 kDa. Điều thú vị là tỷ lệ M/G của sản phẩm là 0,29, cho thấy hàm lượng guluronate rất cao trong polysaccharit [73].

❖ Chiết chất lỏng siêu tới hạn (SFE)

Kỹ thuật SFE thường sử dụng CO_2 siêu tới hạn (sCO_2) do nhiệt độ và áp suất tới hạn thuận lợi là 304,1 K và 83,8 bar với các ưu điểm khác là không cháy, không độc hại, phổ biến rộng rãi, rẻ tiền, sức căng bề mặt thấp, độ nhớt thấp, độ khuếch tán cao và trở về mặt hóa học trong nhiều điều kiện. SFE có tính chọn lọc cao hơn so với chiết xuất bằng dung môi hữu cơ, do đó dịch chiết chứa ít tạp chất phân cực hơn và được ưu tiên xử lý các phân tử sinh học không bền với nhiệt. Sản phẩm trích ly sCO_2

thường ở dạng dầu và cô đặc. Có thể dễ dàng tách sCO₂ ra khỏi sản phẩm cuối cùng bằng cách điều chỉnh áp suất hoặc nhiệt độ [125].

CO₂ tinh khiết có năng suất chiết xuất fucoxanthin thấp do khả năng hòa tan kém của fucoxanthin trong CO₂ [144, 145]. Các đồng dung môi như ethanol được dùng để tăng độ phân cực của CO₂, nâng cao hiệu quả chiết xuất và thu hồi fucoxanthin. SFE đã được áp dụng chiết *U. pinnatifida*, sử dụng EtOH làm đồng dung môi và các phạm vi nhiệt độ khác nhau (30–60 °C) và áp suất (80–300 bar) đã được thử nghiệm. Nhiệt độ cao (50 °C) và áp suất (200 bar) cho giá trị 7,53 ng/g DW [146]. Nghiên cứu khác trên *U. pinnatifida* chỉ ra điều kiện tối ưu với SFE. Đối với phương pháp không có chất cuốn (70°C và 400 bar trong 3 giờ) cho phép thu được hiệu suất fucoxanthin là 60,12 µg/g. Phương pháp chiết yêu cầu sử dụng EtOH làm chất dẫn trong điều kiện tương tự (60 °C và 400 bar trong 3 giờ) hiệu quả hơn và cho phép đạt được hiệu suất fucoxanthin là 994,53 µg/g [133]. Kỹ thuật này cũng cho phép chiết xuất các phân đoạn dầu giàu fucoxanthin từ hai loại rong *S. japonica* và *S. horneri*. Các điều kiện được tối ưu gồm tốc độ dòng khí CO₂ là 27 mg/phút, 45°C, 250 bar trong 2 giờ, nồng độ của fucoxanthin là 0,41 ± 0,05 mg/g đối với *S. japonica* và 0,77 ± 0,07 mg/g đối với *S. Horneri* [147].

Getachew và cộng sự đã dùng SFE để chiết xuất đồng thời fucoxanthin từ *S. japonica* và dầu từ hạt cà phê rang (*Coffea arabica*) [132]. Dầu cà phê được chiết xuất hoạt động như một đồng dung môi để nâng cao hiệu quả chiết xuất của fucoxanthin. Trong điều kiện tối ưu: tỷ lệ rong : hạt cà phê là 3:1, 40 °C và 300 bar, hiệu suất dầu và độ thu hồi là 3,51% và 87,3% với hàm lượng fucoxanthin là 2,08 mg/g dầu đã đạt được. Một số nhược điểm trong sử dụng đồng dung môi để chiết xuất là phát sinh chi phí, có thể chiết xuất kèm một số hợp chất không mong muốn (như chlorophyll) và khó khăn trong việc tách đồng dung môi khỏi dịch chiết [141].

Tuy nhiên, các phương pháp chiết xuất này có một số vấn đề đặt ra như sau:

- Các phương pháp chiết xuất hiện đại thời gian chiết ngắn hơn, lượng dung môi tiêu thụ ít hơn, độ chọn lọc và hiệu quả chiết cao hơn, một số phương pháp an toàn và thân thiện với môi trường hơn so với phương pháp chiết xuất thông thường. Tuy nhiên, chi phí đầu tư cho phương pháp chiết xuất hiện đại tốn kém hơn.

- Đối với chiết xuất fucoxanthin, phlorotanin, fucoidan và alginate: Các kỹ thuật chiết xuất truyền thống gặp một số khó khăn liên quan đến tách phần còn lại

của rong biển không hòa tan. Độ dày của dung dịch cản trở quá trình lọc và dung dịch phải được pha loãng với một lượng lớn nước. Vì rong biển còn sót lại rất mịn và có thể làm tắc nghẽn bộ lọc, nên phải cung cấp chất hỗ trợ lọc khiến quá trình này trở nên tốn kém. Ngoài ra, hóa chất sử dụng để chiết xuất có thể ảnh hưởng đến tính chất hóa lý của fucoxanthin, phlorotannin, fucoidan và alginate [63]. Do đó, để hạn chế các vấn đề gặp phải khi sử dụng kỹ thuật chiết xuất truyền thống, cần có các kỹ thuật chiết xuất và chế biến hiện đại thay thế như siêu âm, enzyme, vi sóng,.... kết hợp với lọc và ly tâm.

- Để hạn chế việc chiết xuất đồng thời của các hợp chất khác trong rong biển, quá trình chiết các polysaccharide nói chung và fucoidan nói riêng, tiền xử lý rong là cần thiết. Trước khi chiết, chất béo, sắc tố và các hợp chất có trọng lượng phân tử thấp sẽ được loại bỏ khỏi nguyên liệu rong biển. Với mục đích đó, nhiều dung môi và hỗn hợp dung môi có độ phân cực khác nhau (*n*-hexan, *n*-hexan:axeton, *n*-hexan:etyl axetat, chloroform, dichloromethane,...), không gây ra bất kỳ thay đổi cấu trúc nào đối với hợp chất đích, đã được sử dụng. Tuy nhiên, vì chúng có tính độc nên các giải pháp thay thế tiền xử lý đã được đề xuất và sử dụng để tạo sản phẩm thân sạch.

- Trong quá trình chiết xuất sản phẩm (fucoxanthin hoặc phlorotannin hoặc fucoidan hoặc alginate) từ rong biển được trải qua các kỹ thuật chiết xuất khác nhau theo nguyên tắc là chiết xuất các hợp chất mục tiêu với sự đồng chiết xuất tối thiểu của các thành phần khác, ví dụ: chiết fucoidan từ alginate. Nếu alginate được đồng chiết xuất, cần thực hiện các bước tiếp theo để loại bỏ alginate khỏi fucoidan, làm tăng độ tinh khiết của fucoidan được chiết xuất. Vấn đề đặt ra, nếu kết hợp các công nghệ chiết xuất hiện đại nhằm thu được cùng lúc nhiều sản phẩm khác nhau và tích hợp các công nghệ chiết xuất hiện đại nhằm chế biến sâu các sản phẩm từ rong giúp tăng hiệu quả kinh tế là bước đi đúng và cần thiết.

- Tiềm năng phát triển của kỹ thuật lai siêu âm và enzyme: Ở cấp độ tế bào, siêu âm thúc đẩy sự phát triển của vi khuẩn bằng cách mất các chùm tế bào, tăng tính thấm của màng, điều chỉnh môi trường nuôi cấy và cung cấp các hiệu ứng trên các thành phần tế bào, chức năng tế bào và di truyền. Nó làm bất hoạt vi sinh vật bằng cách phá hủy thành tế bào và tế bào chất, cung cấp hiệu ứng thiệt hại cho viên nang hoặc thành phần nội bào và phát huy tác dụng gây hại cho vi sinh vật từ môi trường xung quanh. Ở cấp độ phân tử, siêu âm cung cấp các tác động thúc đẩy hoặc làm hỏng

các hoạt động của enzyme bằng cách thay đổi các đặc tính của enzyme, cơ chất và các phản ứng giữa enzyme và cơ chất và cung cấp một môi trường tối ưu cho các phản ứng. Hiệu quả tác động sinh học của siêu âm đối với sự phát triển của vi khuẩn và hoạt động của enzyme đã được báo cáo như quá trình phục hồi màng sau khi điều trị bằng siêu âm thúc đẩy sự phát triển của tế bào; Các cơ chế thay đổi các thành phần tế bào như tăng số lượng sợi nấm tế bào; Các cơ chế thay đổi chức năng tế bào như cường độ lên men của *S. cerevisiae* để sản xuất bia; Các cơ chế thay đổi enzyme như số lượng tryptophan tăng lên trên bề mặt alcalase.

Vì vậy, luận án đã đặt ra các mục tiêu và nội dung nghiên cứu chính như sau:

- Xây dựng quy trình công nghệ chế biến toàn diện rong mơ *Sargasum. sp.* thành các sản phẩm có giá trị cao như fucoxanthin, phlorotannin, fucoidan và alginate theo phương pháp tích hợp enzyme – siêu âm và các kỹ thuật tiên tiến (enzyme, siêu âm, ly tâm 3 pha và lọc màng).

- Nghiên cứu tối ưu hóa công nghệ chiết xuất phenolic từ rong nâu theo phương pháp vi sóng.

- Xây dựng quy trình công nghệ chiết xuất alginate từ rong mơ theo phương pháp tích hợp siêu âm và enzyme, đánh giá tác dụng sinh học, xây dựng tiêu chuẩn cơ sở sản phẩm.

Bên cạnh đó, các vấn đề về sắc tố da thường gây nhiều áp lực về mặt thẩm mỹ, đặc biệt là đối với phụ nữ. Ở châu Á, hàng năm người tiêu dùng tiêu tốn hàng tỷ USD cho các sản phẩm làm sáng da (làm giảm các đốm nắng, tàn nhang hay làm mờ các vết nám). Hiện nay nhiều sản phẩm làm sáng da, chống nám sử dụng hoạt chất là các chất ức chế enzym tyrosinase. Tyrosinase là một đích phân tử quan trọng tham gia vào quá trình hình thành các sắc tố melanin. Ức chế enzym tyrosinase có thể làm hạn chế việc sản sinh quá nhiều các sắc tố melanin từ đó giúp điều trị các rối loạn liên quan đến tăng sắc tố da. Một vấn đề đáng lưu ý là những hoạt chất ức chế enzym tyrosinase hiện nay như hydroquinon và arbutin lại có vấn đề về sự an toàn và tính hiệu quả [149, 150]. Chính vì thế tìm kiếm các hợp chất ức chế tyrosinase hiện vẫn là mối quan tâm của các ngành công nghệ dược phẩm và hóa mỹ phẩm. Rong biển chứa các vitamin và khoáng chất như vitamin, acid folic, niacin, acid pantothenic, calci, magie, phospho, sắt, kẽm... và dồi dào hoạt chất làm trắng da, chống lão hóa tự nhiên, giúp da trở nên tươi sáng, mịn màng. Trong các mô hình sàng lọc hoạt chất hiện đại, mới đây xuất hiện mô hình sàng lọc ảo (Virtual Screening - VS) và đã nhanh

chóng đóng một vai trò hết sức quan trọng trong các dự án nghiên cứu phát triển thuốc. Mô hình trên sử dụng các tiến bộ trong tin học để sàng lọc ảo, mô tả và dự đoán các cấu trúc mới được cho là có hoạt tính mạnh, làm giảm thiểu chi phí và thời gian trong quá trình phát hiện và phát triển thuốc [151, 152]. Luận án đã sàng lọc 71 hợp chất được tách chiết từ Rong mơ sử dụng hợp chất tropolone đã được chứng minh có cơ chế ức chế tyrosinase làm chất chuẩn nhằm bước đầu sàng lọc tìm kiếm các hoạt chất có tác dụng ức chế enzym tyrosinase, góp phần làm sáng tỏ tác dụng làm sáng da, chống nám của các loài rong trong thực tiễn.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu và trang thiết bị

2.1.1. Nguyên liệu

Mẫu rong nâu được thu mẫu bằng phương pháp lấy mẫu trực tiếp và phương pháp lặn sâu. Vị trí thu mẫu tại khu vực đảo Cô Tô trong Quý II năm 2019. Công việc này phải được tiến hành bởi các nhà khoa học lặn có trình độ chuyên môn tương ứng. Sau khi thu thập, mẫu rong được loại tạp và rửa sạch lại bằng nước biển sau đó phơi khô đến độ ẩm dưới 35%, đưa về lưu trữ tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên trước khi chế biến. Các mẫu được định danh bởi PGS. TS. Đàm Đức Tiến, Viện Tài nguyên và Môi trường biển.

Mẫu rong được sử dụng trong các nghiên cứu là chi rong mơ, tuy nhiên trong các nghiên cứu khảo sát, đánh giá nguyên liệu có sử dụng thêm các chi khác thuộc họ rong nâu.

Enzyme Viscozyme L: Là chế phẩm enzyme thương mại của hãng Novozymes Đan Mạch, là một phức hợp đa enzyme chuyên biệt về lignocellulose. Nó chứa nhiều loại carbohydrate, bao gồm arabanase, cellulase, β -glucanase, hemiaellulase và xylanase. Viscozyme L hỗ trợ phân hủy các phân tử hemicellulose, cellulose và pectin và bằng cách phá vỡ các thành phần thành tế bào. Hoạt độ của enzyme: ≥ 100 FBGU/g; Tỉ trọng $\sim 1,2$ g/mL ở 25°C ; Nhiệt độ lưu trữ $2-8^{\circ}\text{C}$.

Các hóa chất sử dụng được lấy từ phòng thí nghiệm của Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, nhập từ hãng Merck KGaA (Đức).

2.1.2. Thiết bị

- Thiết bị vi sóng: Sử dụng lò vi sóng của hãng Sharp, model R-20A1(S)VN, công suất tối đa 800W.

- Thiết bị siêu âm:

+ Máy siêu âm cầm tay UP200Ht (200W, 26kHz) của hãng Hielscher.

+ Bể siêu âm Elmasonic S100H (500W) của hãng Elma Schmidbauer.

- Các thiết bị khác của Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên.

2.2. Các phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xác định hàm lượng phenolic tổng

Nguyên tắc của phương pháp dựa trên phản ứng màu với thuốc thử Folin - Ciocalteu với phloroglucinol là chất chuẩn. Lấy 0,5 ml dịch mẫu bổ sung 2,5 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu 10 %. Sau 5 phút, thêm vào 2 ml Na_2CO_3 7,5%, lắc đều để phản ứng diễn ra trong bóng tối và nhiệt độ phòng. Sau 45 phút, hỗn hợp được ly tâm và phần nổi phía trên được thu thập và đo bằng máy quang phổ UV-Vis (Shimadzu UV-Vis 1800, Japan) ở bước sóng 730 nm. Hàm lượng phlorotannin/polyphenol được tính theo đương lượng phloroglucinol.

2.2.2. Phương pháp xác định alginate

Cân khoảng 10g rong khô, ngâm rong trong 500 ml dung dịch formaldehit 1%, khuấy nhẹ trong 12 giờ. Sau đó rửa sạch rong bằng nước cất. Tiếp tục ngâm rong trong dung dịch H_2SO_4 0,2N trong 4 giờ rồi lại rửa sạch bằng nước cất. Alginate được chiết bằng Na_2CO_3 1% trong 12 giờ, có khuấy nhẹ. Lọc thu phần dịch lọc. Kết tủa alginate bằng cồn 95⁰ theo tỉ lệ dịch chiết:cồn là 1:2, lọc thu tủa, rửa tủa bằng acetone, sấy khô ở 40⁰C. Cân sản phẩm và tính thành phần phần trăm.

Xác định hàm lượng axit alginic: Mẫu rong được khuấy với dung dịch Na_2CO_3 nồng độ 3% (25ml) trong vòng 1 giờ ở 70⁰C, dịch chiết được tách bằng ly tâm, và cặn được xử lý lần hai dưới điều kiện tương tự. Dịch chiết soda gộp lại xử lý ở nhiệt độ phòng với 5 giọt (110mg; 0,035ml) bromide (Br⁻); khuấy một vài phút cho đến khi bromide tan hoàn toàn và giữ qua đêm. Dung dịch đã loại màu được thẩm tách 3 ngày với nước cất chuyển vào trong bình thể tích 500ml, đưa về vạch bằng nước cất và lọc (nếu cần thiết) qua giấy lọc, hàm lượng alginic acid được xác định trong 0,5ml dung dịch mẫu bằng phản ứng so màu với 3,5-dimethylphenol và sulfuric acid. Dung dịch sodium alginate (100mg/l, BDH, UK) được sử dụng để vẽ đường chuẩn trong vùng 0-50 μg trên mẫu.

Phương pháp đánh giá hiệu suất chiết alginate: Hiệu suất chiết xác định theo phần trăm khối lượng alginate khô thu được trên khối lượng rong khô đem tách chiết.

Xác định hàm lượng canxi trao đổi: Cân 30 g rong khô đã cắt nhỏ, ngâm trong 270ml dung dịch 0,1% formalin để qua đêm, lấy dung dịch xác định hàm lượng Ca ban đầu. Sau đó bổ sung từ từ HCl 0,2M, sau mỗi 1ml dung dịch HCl thêm vào lại lấy ra 1ml dung dịch để xác định hàm lượng Ca trao đổi theo thời gian. Việc xác định Ca tiến

hành đồng thời cùng với thêm dung dịch HCl cho đến khi nồng độ Ca trong dung dịch không thay đổi.

Xác định màu của alginate: Màu của alginate xác định bằng cách tính % mật độ ánh sáng truyền qua dung dịch alginate 1% trên máy UV-VIS tại bước sóng 510 nm. Màu càng sáng độ truyền qua càng cao.

Phương pháp đánh giá độ nhớt: Xác định theo phương pháp nhớt kế Ôt-oan: Hút chính xác 10ml nước cất đổ vào nhớt kế. Dùng bơm cao su cho nước lên trên nhánh 2 qua ngấn A. Cho nước chảy từ nhánh 2 sang nhánh 1, đo thời gian t_0 khi chất lỏng chảy hết thể tích từ ngấn A đến B. Đổ nước đi, tráng sạch bằng dung dịch alginate 2% cần đo, rồi đổ 10ml dung dịch vào nhớt kế. Làm tương tự xác định t .

Thay t và t_0 vào công thức:

$$\eta = \frac{D.t.\eta_0}{D_0.t_0}$$

Trong đó: D_0 , D là khối lượng riêng của nước và của chất lỏng cần đo.

D_0 , η là hệ số nhớt của nước và của chất lỏng cần đo.

2.2.3. Phương pháp sàng lọc *in silico*

Qua tổng hợp tài liệu, có 71 hợp chất được phân lập từ chi Rong đã được các nhóm nghiên cứu và xác định cấu trúc, công thức và ký hiệu được biểu thị trong phụ lục. Công thức cấu tạo của các hợp chất được xây dựng trên phần mềm Chemdraw14 sau đó được chuyển sang dạng ba chiều bằng chem3D và tối ưu hóa năng lượng thông qua thuật toán MM2. Do bản chất của các hợp chất không phải là peptide, điện tích Gasteiger đã được bổ sung và sau đó gắn các hydrogens không phân cực. Việc xác định mạch chính của hợp chất được thực hiện tự động bởi phần mềm MGLTools. Các cấu trúc đã tối ưu năng lượng được chuyển sang dạng file pdbqt, là dạng file đầu vào cho docking phân tử. Có 9 loại nguyên tử xuất hiện trong cơ sở dữ liệu bao gồm: ['A', 'C', 'NA', 'OA', 'N', 'HD', 'SA', 'Cl', 'P']. Hợp chất tropolone đã được chứng minh có cơ chế ức chế tyrosinase làm chất chuẩn.

Cấu hình của hệ thống máy tính được sử dụng cho mô phỏng như sau: Intel®Core™ i7-9700K CPU@3.60 GHz, with 32GB DDR4 RAM, Ubuntu-Linux 14.04.6 LTS. Các kết quả thu được của quá trình mô phỏng được phân tích thông qua các phần mềm PyMOL, LigPlus, Discovery Studio Visualizer và Maestro (Schrödinger). Thời gian chạy mô phỏng thực tế thực hiện trong 120 tiếng.

2.2.4. Phương pháp xác định hàm lượng và thành phần lipid

Chiết lipid tổng theo phương pháp Blight-Dyer cải tiến.

Thành phần các lớp chất lipid được xác định trên TLC tráng sẵn (6 cm x 6 cm, Sorbfil, Krasnodar, LB Nga), hiện hình bằng dung dịch axit $H_2SO_4/MeOH$ 10%, sấy đến khi các lớp chất hiện hình hoàn toàn; scan trên máy Epson Perfection 2400 PHOTO (Nagano, Nhật Bản) với độ phân giải và kích thước tiêu chuẩn.

Hàm lượng các lớp chất lipid được xác định dựa trên sự đo diện tích và cường độ màu trong chương trình phân tích hình ảnh Sorbfil TLC Videodensitometer DV (Krasnodar, LB Nga).

2.2.5. Phương pháp xác định thành phần và hàm lượng các axit béo

Axit béo được methyl hóa sang dạng methyl este bằng tác nhân $H_2SO_4/MeOH$ 2%, hỗn hợp methyl este của axit béo được phân tích trên máy sắc ký khí GC và sắc ký khí kết nối khối phổ GC-MS, sử dụng thư viện phổ chuẩn NIST để so sánh.

2.2.6. Xác định hàm lượng Fucoidan bằng phương pháp so màu

2.2.6.1. Tinh chế fucoidan

Cân khoảng 5g mẫu Fucoidan thô hòa tan trong 400ml nước ấm, thêm 8g $CaCl_2$ vào dung dịch, khuấy để qua đêm và lọc loại tủa Calci Alginat. Thêm vào dung dịch sau lọc 100ml Cetavlon nồng độ 10% trong nước. Khuấy kỹ, để lắng, ly tâm (5000 vòng/phút trong 10 phút) tách lấy tủa, rửa tủa với 100ml nước. Thêm vào tủa mỗi lần 100ml $NaCl$ 20% trong ethanol tuyệt đối, khuấy kỹ, để lắng 3-4 giờ, tiến hành như vậy 5 lần. Lọc lấy tủa, rửa tủa với ethanol tuyệt đối. Hòa tan tủa vào trong 25ml nước. Cho dung dịch này vào màng thấm tách loại 10KDa, ngâm trong dòng nước chảy với tốc độ 1ml/phút liên tục trong 72 giờ. Tiếp tục cho nước chảy thêm qua 3h, hứng lấy toàn bộ lượng nước chảy trong 3h đó, cô cách thủy đến khô thu được mẫu trắng. Mẫu thử sau khi thấm tách, lấy toàn bộ dịch trong màng lọc cô cách thủy đến khô thu được fucoidan sạch.

2.2.6.2. Xác định hàm lượng L-fucose trong fucoidan thô

Hàm lượng L-fucose trong Fucoidan được xác định bằng phương pháp Gibbons dựa trên phản ứng tạo màu của L-fucose với acid thioglycolic trong môi trường acid H_2SO_4 rồi đo độ hấp thụ của dung dịch tạo thành.

Thuốc thử:

- Dung dịch acid H₂SO₄ pha mẫu: rót từ từ cẩn thận 6 thể tích acid H₂SO₄, vào 1 thể tích nước, để cho nguội. - Dung dịch acid H₂SO₄, 1M: lấy 5,4ml acid H₂SO₄, nhỏ từ từ vào 60ml nước, để nguội, thêm nước thành 100ml.

- Dung dịch acid Thioglycolic: pha loãng 1ml acid Thioglycolic thành 30ml với nước.

Chuẩn bị dung dịch thử:

Cân chính xác khoảng 0,1g chế phẩm vào bình định mức 100ml, thêm 70ml nước đun nóng để hòa tan hoàn toàn. Để nguội, thêm nước vừa đủ tới vạch, lắc đều. Hút chính xác 5ml dung dịch trên vào bình định mức 25ml, thêm 15ml dung dịch acid H₂SO₄, 1M đun cách thủy ở 95° C trong 2,5 giờ. Để nguội, thêm vừa đủ đến vạch bằng dung dịch H₂SO₄ 1M. Hút chính xác 2ml dung dịch trên cho vào ống nghiệm để trong nước đá, thêm từ từ chính xác 20ml acid H₂SO₄, đậy nút kín, lắc đều, đặt vào nồi cách thủy đang sôi trong 10 phút, lấy ra làm nguội ngâm vào nước lạnh. Thêm vào dung dịch lạnh chính xác 0,2ml dung dịch acid Thioglycolic (vừa thêm vừa lắc). Để yên trong chỗ tối 3 giờ trước khi đo độ hấp thụ tại bước sóng 400nm và 430nm.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn:

Cân chính xác khoảng 50mg chuẩn L-fucose vào bình định mức 50ml, hòa tan hoàn toàn trong nước, thêm nước vừa đủ đến vạch. Hút chính xác 2ml dung dịch trên cho vào bình định mức 100ml, thêm nước vừa đủ đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 2ml dung dịch chuẩn trên ống nghiệm để trong nước đá, thêm từ từ chính xác 20ml acid H₂SO₄, đậy nút kín, lắc đều, đặt vào nồi cách thủy đang sôi mạnh 10 phút, lấy ra làm nguội, ngâm vào nước lạnh. Thêm vào dung dịch lạnh chính xác 0,2 ml dung dịch acid Thioglycolic (vừa thêm vừa lắc). Để yên trong chỗ tối 3 giờ trước khi đo độ hấp thụ tại bước sóng 400nm và 430nm.

Chuẩn bị mẫu trắng:

Mẫu trắng acid H₂SO₄: Tiến hành tương tự như dung dịch thử nhưng thay 2ml dung dịch thử bằng 2ml nước cất. Mẫu trắng của dung dịch thử: Tiến hành tương tự như dung dịch thử nhưng không cho dung dịch acid Thioglycolic. Mẫu trắng của dung dịch chuẩn L-fucose: tiến hành tương tự như dung dịch chuẩn nhưng không cho dung dịch acid Thioglycolic.

Tiến hành

Đo độ hấp thụ (A) của dung dịch chuẩn, dung dịch thử, mẫu trắng của dung dịch thử và mẫu trắng dung dịch chuẩn ở bước sóng 400nm và 430nm. Hàm lượng L-fucose có trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$X(\%) = \frac{(A_{400} - A_{430})_{\text{dung dịch thử}} - (A_{400} - A_{430})_{\text{mẫu trắng của dung dịch thử}}}{(A_{400} - A_{430})_{\text{dung dịch chuẩn}} - (A_{400} - A_{430})_{\text{mẫu trắng của dung dịch chuẩn}}} \times \frac{mc \times 100}{5 \times mt}$$

Trong đó:

A_{400} là độ hấp thụ của các dung dịch ở bước sóng 400nm.

A_{430} là độ hấp thụ của các dung dịch ở bước sóng 430nm.

mc là khối lượng của chuẩn L-fucose (mg).

mt là khối lượng của mẫu thử (mg)

Xác định hàm lượng Fucoidan:

Lấy 0,1g mẫu đã được tinh chế fucoidan, tiến hành tương tự như xác định hàm lượng L-fucose trong mẫu Fucoidan thô.

Hàm lượng Fucoidan trong chế phẩm được tính theo công thức:

$$\% \text{ Fucoidan} = \frac{C_{\text{fucose thô}}}{C_{\text{fucose sạch}}} \times 100$$

Trong đó:

$C_{\text{fucose thô}}$: là hàm lượng (%) L-fucose trong Fucoidan thô.

$C_{\text{fucose sạch}}$: là hàm lượng (%) L-fucose trong Fucoidan sạch

2.2.7. Xác định hàm lượng fucoxanthin

Hàm lượng fucoxanthin được xác định bằng phương pháp quang phổ. Hàm lượng fucoxanthin được tính theo công thức như sau:

$$C_{\text{fuc}} = 6,39 \times A_{445} - 5,18 \times A_{663} + 0,312 \times A_{750} - 5,27$$

Trong đó: C_{fuc} : hàm lượng fucoxanthin (mg/l), A: độ hấp thụ quang ở bước sóng tương ứng.

Xử lý số liệu: Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, giá trị trung bình và độ lệch chuẩn được tính bằng Microsoft Excel 2013. Ngôn ngữ thống kê R (phiên bản 3.5.2) được sử dụng để kiểm định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hàm lượng fucoxanthin với các chữ cái thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

2.3. Phương pháp đánh giá tác dụng sinh học

2.3.1. Phương pháp đánh giá chỉ tiêu an toàn

- Xác định tổng số vi khuẩn yếu khí, nấm men, nấm men, nấm mốc trong các sản phẩm thực phẩm theo TCVN 4886-89;
- Xác định *E.coli*, theo TCVN 6846:2007;
- Xác định *Salmonella*, theo TCVN 4829:2005;
- Xác định *Staphylococcus aureus*, theo TCVN 4830:2005;
- Xác định *Clostridium perfringens*, theo TCVN 4991:2005;
- Xác định *Bacillus cereus*, theo TCVN 4992:89;
- Xác định aflatoxin, theo TCVN 7596:2007;
- Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí, theo TCVN 4884:2005;
- Tổng bào tử nấm men- mốc TCVN 6265:2007;
- Xác định *Coliforms*, theo TCVN 4882:2007;
- Xác định hàm lượng chì, theo AOAC 994.02;
- Xác định Asen, theo AOAC 952,13;
- Xác định hàm lượng cadimi, theo AOAC 2000;
- Xác định hàm lượng thủy ngân, theo AOAC 971,21;

2.3.2. Phương pháp xác định độc tính cấp

Nguyên tắc: Cho chuột thử nghiệm uống cùng liều mẫu nghiên cứu trong điều kiện ổn định như nhau, quan sát các phản ứng xảy ra trong 72 giờ.

Thử nghiệm sơ bộ: Cho 10 chuột (50% đực, 50% cái) nhịn đói ít nhất 12 giờ trước khi dùng mẫu nghiên cứu ở liều duy nhất, liều cao (từ 5000 - 6.000 mg/kg thể trọng), hoặc cao nhất qua đường uống (thể tích tối đa là 0,2ml-0,3 ml/10g trọng lượng chuột tham gia thử nghiệm được bố trí theo “Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu” của Bộ y tế ban hành theo quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015). Theo dõi và ghi nhận cử động tổng quát, biểu hiện về hành vi, trạng thái lông, ăn uống, đi tiêu và số lượng chết của chuột trong vòng 72 giờ, chuột không có dấu hiệu bất thường hoặc chết thì tiếp tục theo dõi đến 7 ngày.

Thử nghiệm chính thức: Có 3 trường hợp có thể xảy ra:

- Trường hợp 1: Sau khi cho uống mẫu, số chuột trong lô thử vẫn bảo toàn cho thấy liều cao nhất có thể qua kim mà không làm chuột chết. Liều này được kí hiệu là

Dmax và liều tương đối an toàn dùng trong các thử nghiệm dược lý có thể bằng hoặc lớn hơn $1/5D_{max}$.

- Trường hợp 2: Sau khi cho chuột uống mẫu nghiên cứu, tỉ lệ tử vong là 100% thì thử với liều giảm $\frac{1}{2}$ so với liều đầu. Tiếp tục thăm dò cho đến khi tìm được liều tối thiểu gây chết 100% chuột (LD_{100}) và liều tối đa không gây chết con nào (LD_0). Tiến hành thử nghiệm xác định LD_{50} theo phương pháp của Dodehe Yeo và cộng sự (2012), N'dia Kouadio Frédéri và cộng sự (2013), Aristide Traore và cộng sự (2014).

- Trường hợp 3: Sau khi uống mẫu thử, số chuột tử vong thấp hơn 100%, không xác định được liều gây chết tuyệt đối (LD_{100}) dẫn tới không thể xác định được LD_{50} . Tuy nhiên, trường hợp này có thể xác định được liều tối đa không gây chết chuột, gọi là liều dưới liều chết (LD_0). Khi đó liều tương đối an toàn D_s dùng trong các thử nghiệm dược lý có giá trị bằng $1/5$ hoặc $1/10$ liều LD_0 .

2.3.3. Nghiên cứu tính độc bán trường diễn

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn được tiến hành theo phương pháp của Cristiani Bürger và cộng sự (2005), Pillaia G và cộng sự (2011), Ramaswamy S R và cộng sự (2012). Bao gồm nghiên cứu sự thay đổi của lông, theo dõi về khả năng thu nhận thức ăn, khả năng di chuyển so với lô đối chứng, nghiên cứu quá trình thay đổi khối lượng chuột thí nghiệm cũng như ảnh hưởng của việc sử dụng mẫu nghiên cứu đến một số chỉ tiêu huyết học, enzym chức năng gan, thận.

Bố trí thí nghiệm

Căn cứ vào kết quả thử nghiệm độc tính cấp cho thấy chế phẩm eicosanoid nghiên cứu thuộc nhóm không có độc tính với liều thử cao nhất là 6000 mg/kg. Vậy LD_0 (liều an toàn không gây chết chuột nhất) trong thử nghiệm này là 6000 mg/kg. Trong khi đó, liều tương đối an toàn (D_s) dùng trong các thử nghiệm dược lý có giá trị bằng $1/5$ hoặc $1/10$ liều LD_0 nên mức liều được lựa chọn cho thử nghiệm độc bán trường diễn trên chuột trong thử nghiệm này cao nhất sẽ là 1000 mg/kg, sau đó giảm xuống là 500 mg/kg và 250 mg/kg.

40 chuột nhắt trắng dòng BALB/c, không phân biệt giống, khối lượng từ 19-24 gram, nuôi tại Khoa Dược lý sinh hóa – Viện Dược Liệu, được chia làm 4 lô (10 chuột/lô).

Thời gian cho uống mẩu là 28 ngày. Đến ngày thứ 29, thu máu để phân tích một số chỉ tiêu huyết học và hóa sinh, đồng thời mổ kiểm tra trực quan các cơ quan nội tạng gan, thận, lách.

Theo dõi biểu hiện bên ngoài của động vật thí nghiệm

Trong thời gian thí nghiệm chuột được theo dõi các biểu hiện bên ngoài như: trạng thái lông, khả năng di chuyển, khả năng thu nhận thức ăn, các hiện tượng đi ngoài (nếu có), phản xạ ánh sáng, âm thanh...

Theo dõi sự thay đổi khối lượng của động vật thí nghiệm

Trong thời gian thí nghiệm chuột được theo dõi sự thay đổi về trọng lượng chuột thí nghiệm 1 tuần/lần (thời điểm trước khi uống mẩu nghiên cứu gọi là thời điểm ngày 0) để theo dõi quá trình tăng trọng lượng động vật và qua đó đánh giá được tính độc (nếu có) khi cho uống trong thời gian dài liên tục.

Ảnh hưởng của mẩu nghiên cứu đến một số chỉ tiêu huyết học, sinh hoá máu

Sau quá trình thí nghiệm, toàn bộ động vật được lấy máu làm các xét nghiệm một số chỉ tiêu huyết học như: hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hemoglobin; một số chỉ tiêu hóa sinh trong huyết thanh là aspartate aminotransferase (AST/SGOT), alanine aminotransferase (ALT/SGPT) và creatinin, từ đó đánh giá chức năng gan, thận, theo phương pháp của Pillaia G và cộng sự (2011).

Sau quá trình thí nghiệm, động vật được mổ giải phẫu để kiểm tra trực quan nội tạng và so sánh với lô đối chứng.

Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý trên Excel, được trình bày dạng $\bar{M} \pm SE$. Các thuật toán thống kê *t*-test để kiểm tra sự sai khác có ý nghĩa so với Đối chứng bệnh lý, với $p < 0,05$ được coi là sai khác có ý nghĩa thống kê.

2.3.4. Phương pháp đánh giá tác dụng đào thải kim loại nặng

Nghiên cứu bao gồm ba thí nghiệm tương ứng là ước tính ảnh hưởng của canxi alginate và với sự hấp thụ chì, cadimi, thủy ngân trong ruột, loại bỏ chì, cadimi, thủy ngân trong các cơ quan bên trong và xương, và loại bỏ chì với phân.

Sau thời gian thích nghi, 70 con chuột đã được chia ngẫu nhiên thành 7 nhóm, mỗi nhóm 10 con. Các nhóm này bao gồm 1 nhóm đối chứng và 3 nhóm đã được gây độc chì, cadimin và thủy ngân và 3 nhóm sau khi được gây độc thì được tiếp tục cho ăn canxi alginate. Các nhóm đối chứng nhận hàng ngày 1 ml nước cất qua bơm dạ

dày (gastric gavage). Động vật của các nhóm khác được cung cấp hàng ngày 1 ml dung dịch chì axetat, cadimi axetate và thủy ngân axetate chứa lần lượt 50 mg Pb, Cd, Hg trên 1kg bằng bơm dạ dày. 3 tuần sau, các động vật thuộc nhóm giải độc được cung cấp một dịch có chứa tương ứng canxi alginate, với liều 0,1 g/kg thông qua bơm dạ dày. Để ngăn chặn sự tương tác của Pb, Cd, Hg và thành phần thức ăn, động vật thuộc tất cả các nhóm không được cho ăn trong 1 giờ sau khi sử dụng kim loại và alginate. Sau 6 tuần thí nghiệm, tất cả các con vật đều được gây mê nhẹ bằng ether và đem mổ. Gan, thận, tim và xương đùi đã được bỏ ra, cân, rửa và lưu trữ cho đến khi phân tích.

Bảng 2.1. Ký hiệu 7 nhóm chuột thử nghiệm

Nhóm đối chứng	Chế độ ăn bình thường
Nhóm 1	Gây độc bằng chì axetate
Nhóm 2	Gây độc bằng cadimi axetate
Nhóm 3	Gây độc bằng thủy ngân axetate
Nhóm 4	Gây độc bằng chì axetate + cho ăn canxi alginate
Nhóm 5	Gây độc bằng cadimi axetate + cho ăn canxi alginate
Nhóm 6	Gây độc bằng thủy ngân axetate + cho ăn canxi alginate

Phân tích nồng độ kim loại: Nồng độ chì trong dung dịch lọc được đánh giá bằng phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử AAS. Hàm lượng chì, cadimi, thủy ngân trong tim, thận, gan và xương đùi được lấy khỏi chuột cũng như trong phân được ước tính bằng Atomic absorption spectrometry (Parsons và Slavin 1993).

2.3.5. Phương pháp đánh giá khả năng chống loãng xương

Phương pháp nuôi cấy tế bào in vitro

Dòng tế bào **MC3T3-E1** được nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong môi trường nuôi cấy alpha-MEM có bổ sung 10% huyết thanh phôi bò (FBS), 1% kháng sinh PS ở điều kiện 37°C và 5% CO₂. Tế bào được cấy chuyển bằng Trypsin - EDTA (0,05%) sau 2 ngày nuôi cấy. Để xác định khả năng biệt hóa MC3T3-E1 thành nguyên bào xương, tế bào sau khi phủ 80% bề mặt nuôi cấy, được nuôi trong môi trường biệt hóa có bổ sung 10mM β -glycerophosphate và 50 μ g/ml ascorbic acid.

Xác định sự phát triển của tế bào MC3T3-E1[9]

Phương pháp MTT được sử dụng để xác định sự phát triển của tế bào MC3T3-E1 dưới tác động của chất nghiên cứu. Phương pháp này xác định sự phát triển của

tế bào thông qua sự hình thành sản phẩm formazan màu khi đưa MTT vào giếng tế bào dưới tác động của enzyme trong tế bào sống. Khả năng sống sót của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ TB sống sót} = \frac{[\text{OD}(\text{chất thử}) \times 100]}{[\text{OD}(\text{đối chứng âm})]}$$

Phương pháp xác định sự hoạt động của alkaline phosphatase (ALP) [10]

Tế bào được đưa ra đĩa 96 giếng. Khi tế bào phủ kín 80% bề mặt nuôi cấy, tế bào được nuôi trong môi trường biệt hóa có bổ sung 10mM β -glycerophosphate và 50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid. Sau đó mẫu thí nghiệm được đưa vào với các nồng độ khác nhau. Môi trường cũng như mẫu thử được thay mới 2- 3 ngày một lần. Hoạt động của ALP trong tế bào vào ngày thứ 7 được xác định bằng ALP Assay Kit (Abcam, Cambridge, England) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Xác định khả năng kích thích tạo Collagen [10]

Tế bào được nuôi trong môi trường biệt hóa và ủ với mẫu thử. Sau 10 ngày ủ hoạt chất, tế bào được rửa bằng PBS, cố định bằng dung dịch Bouin's fluid trong 1 giờ. Sau khi cố định, đĩa thí nghiệm được rửa dưới vòi nước trong 15 phút và để khô. Sau đó tế bào được nhuộm bằng Sirius red 0,1% trong acid picric trong 1 h và rửa bằng HCl 0,01M để loại bỏ thuốc nhuộm còn dư; Cuối cùng, màu nhuộm đã gắn với collagen tế bào được hòa lại trong NaOH 0,1M. Mật độ quang OD được xác định bằng máy đo ELISA (Bio-Rad) ở bước sóng 550nm. Khả năng kích thích tạo collagen dưới tác động của mẫu thử được so sánh với đối chứng âm theo công thức:

$$\% \text{ tạo collagen} = \frac{[\text{D}(\text{chất thử}) \times 100]}{[\text{OD}(\text{đối chứng âm})]}$$

Xác định khả năng kích thích tạo khoáng

Khả năng tạo khoáng dưới tác động của mẫu thử được xác định theo phương pháp nhuộm Anizarin red. Sau 15 ngày ủ mẫu, tế bào được rửa 2 lần với PBS và cố định với ethanol 70% trong 1 giờ. Tế bào sau đó được nhuộm với alirazin Red S 40 mM (pH 4,4) trong 15 phút và rửa lại bằng nước cất khử ion. Lượng màu nhuộm gắn với canxi được hòa tan với cetylpyridinium chloride 10% và lắc nhẹ trong 15 phút. Đo mật độ quang học ở bước sóng 561 nm bằng máy đo Microplate

Reader (Biorad). Khả năng kích thích tạo khoáng dưới tác động của mẫu thí nghiệm được so sánh với đối chứng âm.

2.3.6. Phương pháp thử hoạt tính chống oxy hóa

Phân tích khả năng bắt các gốc tự do tạo bởi DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; Brand- Williams et al. 1995, Shela et al. 2003, Kumar et al. 2013) là phương pháp đã được công nhận để xác định nhanh hoạt tính chống oxy hóa. Chất thử được hòa trong dimethyl sulfoxide (DMSO 100%) và DPPH được pha trong ethanol 96%. Sự hấp thụ của DPPH ở $\lambda = 515$ nm được xác định sau khi nhỏ DPPH vào dung dịch mẫu thử trên phiến vi lượng 96 giếng. Kết quả các thử nghiệm được thể hiện là giá trị trung bình của ít nhất 3 phép thử lặp lại \pm độ lệch chuẩn ($p \leq 0,05$).

2.3.7. Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào

Hoạt tính gây độc và ức chế sự tăng sinh tế bào theo phương pháp MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] được Viện nghiên cứu ung thư quốc gia Mỹ (NCI) đánh giá là phương pháp quy chuẩn và hiệu quả cho sàng lọc nhanh các chất có hoạt tính gây độc hoặc ức chế sự tăng sinh tế bào. Nguyên tắc của phương pháp là gián tiếp xác định hoạt tính của chất thử qua khả năng ức chế enzyme oxidoreductase phụ thuộc NAD(P)H của tế bào. Enzyme trong ty thể này xúc tác phản ứng khử thuốc nhuộm tetrazolium MTT thành dạng formazan không hoà tan, có màu tím, qua đó có thể phản ánh tương quan số lượng các tế bào đang phát triển khi đo ở bước sóng $\lambda = 540/720$ nm.

Dòng tế bào: Các dòng tế bào cung cấp bởi ATCC (American Type Culture Collection, USA; <https://www.atcc.org>) và CLS (Cell Lines Service GmbH, CHLB Đức (<https://clsgmbh.de>) được lưu giữ tại Phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên (Viện Hàn lâm KHCVN): MCF-7 (Tế bào ung thư vú), HeLa (Tế bào ung thư cổ tử cung), PC-3 (Tế bào ung thư tuyến tiền liệt).

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

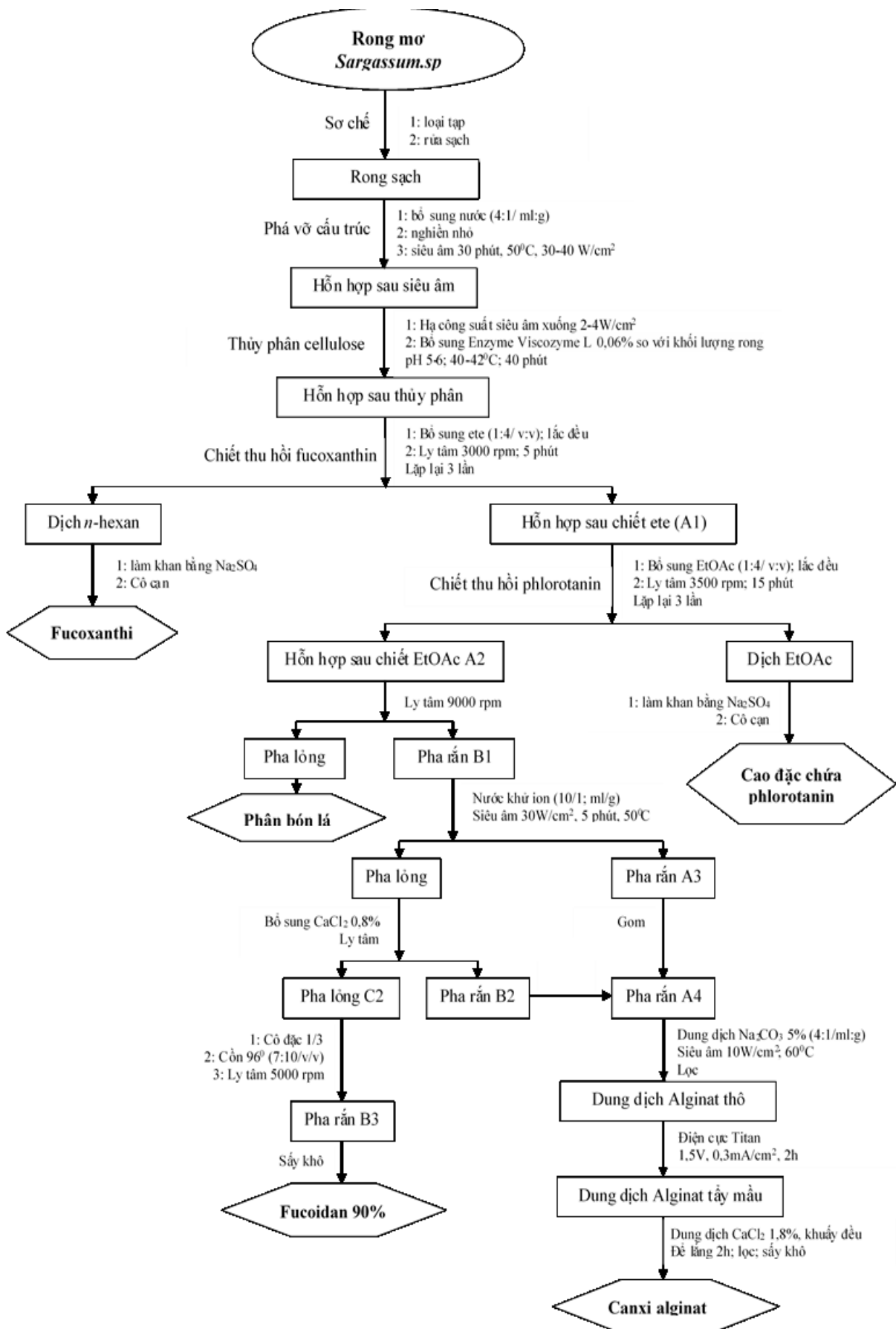
3.1. Sử dụng kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp chế biến rong mơ

3.1.1. Sơ đồ và thuyết minh quy trình

Luận án đã đưa ra quy trình công nghệ chế biến toàn diện rong mơ *Sargasum sp.* thành các sản phẩm có giá trị cao như fucoxanthin, phlorotanin, fucoidan và alginat theo phương pháp tích hợp enzyme – siêu âm và các kỹ thuật tiên tiến (enzyme, siêu âm, ly tâm 3 pha và lọc màng) (hình 3.1). Quy trình được mô tả là hiệu quả với khả năng thu hồi đồng bộ và hiệu suất cao các sản phẩm và hạn chế tối đa chất thải từ nguồn nguyên liệu rất dồi dào, có sẵn trong tự nhiên.

Quy trình dựa trên đặc tính của nguyên liệu và các sản phẩm, sử dụng nền tảng công nghệ sóng siêu âm để phá hủy các cấu trúc tế bào và sử dụng sóng siêu âm kết hợp enzyme – áp dụng trên đối tượng rong mơ để thu được các sản phẩm fucoxanthin, phlorotanin, fucoidan và alginat. Việc sử dụng sóng siêu âm cường độ cao trong giai đoạn đầu và sự kết hợp sóng siêu âm cường độ thấp với enzyme ở giai đoạn tiếp theo đã giúp giảm một lượng lớn enzyme cần sử dụng (3-4 lần), đồng thời thời gian cần để thủy phân cũng giảm. Chính điều này đã hạn chế được sự oxy hóa một số thành phần nhạy cảm như fucoxanthin và phlorotanin. Mặt khác, quy trình sử dụng sóng siêu âm và enzyme trong giai đoạn xử lý nguyên liệu giúp phá vỡ được mạng lưới liên kết giữa alginat, fucoidan với xenlulozơ; do đó không cần sử dụng acid trong giai đoạn xử lý nguyên liệu trước khi chiết tách fucoidan và alginat nên các cấu trúc của fucoidan và alginat được bảo toàn, tránh sự cắt đứt mạch polime một phần bởi acid. Ngoài ra, quá trình chiết tách fucoxanthin và phlorotanin trước khi chiết tách alginat đã làm giảm một lượng lớn các chất màu, bên cạnh đó việc sử dụng quá trình điện phân để tẩy màu cũng giúp tránh được việc phải sử dụng một lượng lớn các chất oxy hóa để tẩy màu như javen hoặc H_2O_2 nên tránh được việc tồn dư các hóa chất không mong muốn cũng như hạ giá thành sản phẩm alginat. Các phần chất thải còn lại được điều chỉnh pH trung tính, bổ sung vi sinh vật để ủ lên men tạo thành phân bón hữu cơ đa vi lượng.

Mặt khác, công nghệ hoàn toàn có khả năng triển khai thực hiện ở quy mô công nghiệp. Do đó, đảm bảo cung cấp một lượng lớn sản phẩm fucoxanthin, phlorotanin, fucoidan và alginat có giá trị chăm sóc sức khỏe cộng đồng với hiệu quả kinh tế cao.



Hình 3.1. Sơ đồ quy trình sử dụng kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến rong mơ

Thuyết minh quy trình

Bước 1: Sơ chế nguyên liệu

Mẫu rong mơ *Sargassum. sp* sau khi thu hoạch được làm sạch, loại bỏ rong lạ và sinh vật bám trên rong, rửa sạch bằng nước biển sau đó rửa sạch lại bằng nước ngọt, bảo quản ở nhiệt độ -20°C trước khi sử dụng

Bước 2: Siêu âm phá vỡ tế bào nguyên liệu

Rong biển sau sơ chế sạch được bổ sung nước theo tỉ lệ 4/1 (nước/ rong: V/m); nghiền nhỏ bằng máy nghiền chuyên dụng đến kích thước $< 0,1\text{mm}$

Rong biển sau khi nghiền được tiến hành siêu âm ở mức công suất 30-40 W/cm² trong 30 phút ở nhiệt độ 50°C .

Bước 3: Thủy phân xenlulozơ trong rong

Hỗn hợp sau siêu âm được bổ sung enzyme phân giải xenlulozơ có nguồn gốc từ chủng nấm men *Aspergillus aculeatus* (Enzyme Viscozyme L) theo tỉ lệ 0,06% (enzyme/ cơ chất) tại pH 5-6, hạ mức công suất siêu âm xuống còn 2-4W/ cm², tiến hành trong 40 phút ở nhiệt độ $40-42^{\circ}\text{C}$ sau đó nâng công suất siêu âm lên 50 W/cm² trong vòng 5 phút để bất hoạt enzyme. Hạ nhiệt độ hỗn hợp về nhiệt độ phòng

Bước 4: Chiết thu hồi fucoxanthin

Bổ sung diethylene vào hỗn hợp sau thủy phân (1/4, thể tích/thể tích), lắc đều sau đó đưa vào ống ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/ phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, thu lấy pha hữu cơ; lặp lại quá trình 3 lần. Gom pha hữu cơ, làm khan bằng Na₂SO₄, cô cạn thu được phần cặn chiết dạng dầu chứa ~ 1% fucoxanthin. Phần còn lại sau khi chiết diethylene là hỗn hợp bao gồm phần nước và chất rắn (Hỗn hợp A1)

Bước 5: Chiết thu hồi phlorotanin

Hỗn hợp A1 sau khi chiết diethylene được bổ sung etyl axetat (1/4, thể tích/thể tích), khuấy đều trong 10 phút sau đó đưa vào ống ly tâm ở tốc độ 3500 vòng/ phút trong 15 phút, thu lấy pha hữu cơ; lặp lại quá trình 3 lần. Gom pha hữu cơ làm khan bằng Na₂SO₄, cô cạn thu được phần cặn chiết chứa phlorotanin. Phần còn lại sau khi chiết etyl axetat là hỗn hợp bao gồm phần nước và chất rắn (Hỗn hợp A2). Pha nước bao gồm các thành phần như khoáng vi lượng, carbohydrat, axit amin, peptide, kích thích tố thực vật hòa tan, có thể sử dụng ngay làm phân bón lá.

Bước 6: Chiết xuất fucoidan

Hỗn hợp A2 được ly tâm ở tốc độ 9000 vòng/ phút thu được phần chất rắn B1 và phần lỏng C1. Phần chất rắn B1 được bổ sung nước khử ion theo tỉ lệ 10/1 (ml/g), khuấy đều sau đó siêu âm ở mức công suất 30W/cm² trong 5 phút ở 50⁰C, lọc thu dung dịch; tiến hành lặp lại 2 lần thu được dịch lọc và phần chất rắn A3. Gom phần dịch lọc, bổ sung CaCl₂ theo tỉ lệ 0,8g/lít, ly tâm được phần chất rắn B2 và phần lỏng C2. Phần chất lỏng C2 sau đó cô cạn còn 1/3 thể tích dưới áp suất giảm. Bổ sung etanol 96⁰ theo tỉ lệ 7/10 (thể tích/thể tích), ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/ phút thu được phần chất rắn B3, sấy khô thu được sản phẩm là fucoidan với hàm lượng > 90%.

Bước 7: Chiết xuất alginat

Phần chất rắn A3 gom chung với phần chất rắn B2 được chất rắn A4. Khấy đều chất rắn A4 trong dung dịch Na₂CO₃ 5% (1: 4/ mg:ml), siêu âm ở mức công suất 10W/cm² ở 60⁰C trong 10 phút sau đó lọc loại bỏ chất rắn thu lấy phần chất lỏng. Phần chất lỏng được đưa vào bình điện phân với điện cực titan trong điều kiện 1,5V & 0,3mA/cm² trong 2h. Dung dịch thu được đem rót từ từ vào dung dịch CaCl₂ 1,8% (2:1, thể tích:thể tích) trong điều kiện khuấy mạnh ở nhiệt độ thường. Sau đó để lắng dung dịch trong 2h, lọc thu lấy phần kết tủa và sấy khô ta thu được sản phẩm là canxi

Trong quy trình này, việc lọc thẩm tách được thực hiện bằng màng có kích thước 100-300 kDa để thu nhận fucoidan. Pha rắn được chiết alginat bằng dung dịch kiềm, sử dụng kỹ thuật điện hóa để tẩy màu, thu được alginat sạch. Các phần chất còn lại được điều chỉnh pH trung tính, bổ sung vi sinh vật để ủ lên men tạo thành phân bón hữu cơ đa vi lượng.

3.1.2. Đánh giá hiệu quả các quá trình chiết xuất

Đây là lần đầu tiên quy trình đề cập đến sử dụng công nghệ tích hợp kỹ thuật enzyme – siêu âm và các kỹ thuật tiên tiến (enzyme, siêu âm, ly tâm 3 pha và lọc màng) tạo đồng thời các sản phẩm có giá trị từ nguồn nguyên liệu rong mơ.

Ngoài ra, luận án tiến hành khảo sát một số phương án nhằm mục đích nghiên cứu sự ảnh hưởng của tích hợp các kỹ thuật tiên tiến khác nhau đến hiệu quả quá trình chiết xuất tạo các sản phẩm.

- *Phương án 1*: Quy trình chiết như sơ đồ 3.1, mục đích chỉ thu fucoxanthin.
- *Phương án 2*: Quy trình chiết như sơ đồ 3.1, mục đích chỉ thu phlorotantin.
- *Phương án 3*: Quy trình chiết như sơ đồ 3.1, mục đích chỉ thu fucoidan.
- *Phương án 4*: Quy trình chiết như sơ đồ 3.1, mục đích chỉ thu alginat.

- *Phương án 5*: Quy trình chiết như sơ đồ 3.1, mục đích thu đồng thời các sản phẩm fucoxanthin, phlorotantin, fucoidan và alginat không dùng siêu âm và enzyme

- *Phương án 6*: Quy trình chiết như sơ đồ 3.1, mục đích thu đồng thời fucoxanthin, phlorotantin, fucoidan và alginat sử dụng enzym không dùng siêu âm.

- *Phương án 7*: Quy trình chiết như sơ đồ 3.1, mục đích thu đồng thời fucoxanthin, phlorotantin, fucoidan và alginat sử dụng siêu âm không dùng enzym.

- *Phương án 8*: Quy trình chiết như sơ đồ 3.1, mục đích thu đồng thời fucoxanthin, phlorotantin, fucoidan và alginat sử dụng tích hợp kỹ thuật vi sóng và enzyme.

- *Phương án 9*: Quy trình chiết như sơ đồ 3.1, mục đích thu đồng thời fucoxanthin, phlorotantin, fucoidan và alginat sử dụng tích hợp kỹ thuật siêu âm và enzyme.

Bảng 3.1. Hiệu quả quá trình chiết xuất theo các phương án

Phương án	Hàm lượng sản phẩm (% tính theo lượng khô của nguyên liệu)			
	fucoxanthin	phlorotantin	fucoidan	alginat
1: Chiết fucoxanthin	0,80	-	-	-
2: Chiết phlorotantin	-	1,75	-	-
3: Chiết fucoidan	-	-	3,30	-
4: Chiết alginat	-	-	-	32,5
5: Chiết không dùng siêu âm và enzyme	0,08	0,15	1,23	8,24
6: Chiết sử dụng enzyme không dùng siêu âm	0,21	0,88	1,97	16,6
7: Chiết sử dụng siêu âm không dùng enzyme	0,56	1,12	2,81	24,5
8: Chiết tích hợp dùng siêu âm và vi sóng	0,72	1,80	3,01	28,7
9: Chiết tích hợp dùng siêu âm và enzyme	0,78	1,74	3,28	32,2

Kết quả cho thấy:

- Phương án 1,2,3,4 thu được các sản phẩm riêng lẻ có hàm lượng các sản phẩm tốt nhất, tuy nhiên, hàm lượng cao hơn không nhiều so với phương án 9 tích hợp, mà chỉ thu được duy nhất từng sản phẩm nên hiệu quả không cao.

- Phương án có sử dụng hỗ trợ của kỹ thuật siêu âm (phương án 7) hoặc enzyme (phương án 6) cho hiệu suất cao hơn so với ngâm chiết thông thường (phương án 5), tuy nhiên kém nhiều hơn so với phương pháp tích hợp siêu âm/vi sóng với enzyme (phương án 8 và 9).

- Phương án sử dụng tích hợp vi sóng và enzyme (phương án 8) nhìn chung cho hàm lượng các sản phẩm kém hiệu quả hơn so với phương án sử dụng tích hợp siêu âm và enzyme (phương án 9), ngoại trừ hàm lượng phlorotanin (phenolic) cao hơn. Điều này có thể gợi ý đến sử dụng tích hợp vi sóng và enzyme để chiết xuất các hợp chất phlorotanin (phenolic) và chiết xuất các sản phẩm khác sử dụng tích hợp siêu âm và enzyme.

- Phương án sử dụng tích hợp siêu âm và enzyme (phương án 9) cho kết quả tối ưu nhất, thu được đồng thời các sản phẩm fucoxanthin, phlorotanin, fucoidan và alginat với hàm lượng các hoạt chất cao, qua đó giảm thời gian, dung môi, hao phí máy móc thiết bị, do đó giảm giá thành sản phẩm và mang lại giá trị kinh tế cao.

Ngoài ra, các nghiên cứu về sử dụng tích hợp kỹ thuật ly tâm 3 pha và lọc màng đã làm giảm thời gian thu các sản phẩm so với phương pháp thông thường là 30%.

Nghiên cứu của tác giả Lê Đức Giang và Lê Thị Thùy đăng trên tạp chí Khoa học ĐHSPTHCM (2016) về việc sử dụng một số phương pháp khác nhau để chiết xuất Alginate từ rong nâu, kết quả cho thấy hiệu suất chiết alginate dao động trong khoảng từ 12,13 - 35,87%. Nghiên cứu của tác giả Bùi Văn Nguyên (Luận án Tiến sĩ, 2018), chiết xuất Fucoidan theo phương pháp của Bilan và Cs, kết quả cho thấy hiệu suất chiết Fucoidan dao động trong khoảng từ 1,98-3,7%. Nghiên cứu của tác giả Võ Mai Như Hiếu (Luận án Tiến sĩ, 2014), chiết xuất Phenolic từ một số loài rong nâu khác nhau, kết quả cho thấy hàm lượng phenolic dao động từ 0,089 đến 0,44 % tùy theo loài rong và vị trí lấy mẫu.

Bảng 3.2. So sánh kết quả thu nhận các hợp chất

	Phenolic tổng	Fucoidan	Alginate
Sử dụng công nghệ tích hợp	0,1704%	2,87 ± 0,04%	29,57 ± 2,27%
Theo kết quả nghiên cứu của tác giả Lê Đức Giang, Lê Thị Thùy	-	-	12,13-35,87%
Theo kết quả nghiên cứu của tác giả Bùi Văn Nguyên	-	1,98-3,7%	-
Theo kết quả nghiên cứu của tác giả Võ Mai Như Hiếu	0,089 - 0,44 %	-	-

Kết luận: Do hàm lượng, thành phần các hợp chất Phenolic, Fuciudan, Alginate ở rong nâu có sự biến động theo loài, theo mùa... nên chưa thể đánh giá và so sánh chính xác về hiệu quả chiết xuất theo các phương pháp khác nhau. Tuy nhiên, việc ứng dụng tích hợp các kỹ thuật tiên tiến có lợi thế giúp chiết toàn bộ các hợp chất hữu ích trong rong nâu, đồng thời tận dụng bã thải làm phân bón, đem lại lợi ích về kinh tế và bảo vệ môi trường.

3.2. Nghiên cứu khảo sát đánh giá nguyên liệu

3.2.1. Nghiên cứu khảo sát hàm lượng alginate một số loài rong nâu thu hoạch tại biển Việt Nam

Tại Việt Nam, các loài rong thuộc chi rong mơ là nguồn nguyên liệu chính để sản xuất gel alginate. Vì vậy chúng tôi tập trung vào phân tích đánh giá một số các mẫu rong để xác định được nguồn nguyên liệu tiềm năng. Thời gian thu hoạch tùy thuộc vào từng loài, thường vào khoảng từ tháng 3 - 7 hàng năm. Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy hàm lượng alginate đạt khoảng 28 – 35% trọng lượng khô. Các khu vực vịnh Nha Trang, quần đảo Cô Tô – Hải Phòng, Hòn La – Quảng Bình, Vĩnh Mốc, Cồn Cỏ - Quảng Trị là những vùng có tiềm năng về khai thác.

Bảng 3.3. Hàm lượng alginate của một số mẫu khảo sát

TT	Ký hiệu mẫu	Tên KH	Địa điểm thu mẫu	Hàm lượng alginate (%)
1	RB01 QN-CT	<i>S. polycystum</i>	Quảng Ninh – Cô Tô	34,2 ± 0,5
2	RB02 QN-CT	<i>S. mcclurei</i>	Quảng Ninh – Cô Tô	36,1 ± 0,3
3	RB03 QN-CT	<i>S. swartzii</i>	Quảng Ninh – Cô Tô	34,5 ± 0,7
4	RB04 QN-CT	<i>S. polycystum</i>	Quảng Ninh – Cô Tô	32,5 ± 0,4
5	RB02 QB-HL	<i>P. boryana</i>	QB-Hòn La	25,6 ± 0,9
6	RB03 QB-HL	<i>S. polycystum</i>	QB-Hòn La	28,7 ± 0,5
7	RB04 QB-HL	<i>Sargassum</i> sp.	QB-Hòn La	33,5 ± 0,3
8	RB01 VM-RD	<i>Sargassum</i> sp.	Vĩnh Mốc – Rạn Đá	31,6 ± 0,2
9	RB02 VM-RD	<i>P. boryama</i>	Vĩnh Mốc – Rạn Đá	26,7 ± 0,7
10	RB03 VM-RD	<i>S. gracillimum</i>	Vĩnh Mốc – Rạn Đá	36,2 ± 0,6
11	RB04 VM-RD	<i>D. dichotoma</i>	Vĩnh Mốc – Rạn Đá	27,5 ± 0,6
12	RB 01 MC1-HM	<i>Laminaria</i> sp.	Mặt Cắt I – Hòn Mê	28,1 ± 0,9
13	RB 02 MC1-HM	<i>Sargassum</i> sp.	Mặt Cắt I – Hòn Mê	34,8 ± 0,3

14	RB 04 HV-SC-BC	<i>Sargassum</i> sp. 1	Hải Vân-Sơn Chà- Bãi Chuối	29,2 ± 0,4
15	RB 02 HV-SC-MTL	<i>Laminaria</i> sp. 1	Hải Vân-Sơn Chà- Mũi Thô Lô	32,7 ± 0,5
15	RB 1(1)HT-CLC	<i>Turbinaria</i> sp.	Hòn Tai-Cù Lao Chàm	37,3 ± 0,3
17	RB 03 LS	<i>S. kjellmanianum</i>	Lý Sơn	38,6 ± 0,6
18	RB 06 LS	<i>Sargassum</i> sp. 3	Lý Sơn	34,2 ± 0,4
19	RB 07 LS	<i>D. dichotoma</i>	Lý Sơn	25,8 ± 0,8
20	RB 08 LS	<i>T. turbinata</i>	Lý Sơn	40,5 ± 0,9
21	RB 09 LS	<i>S. tenerrimum</i>	Lý Sơn	29,7 ± 0,4
22	RB 01 - NT	<i>S. mcclurei</i>	Nha Trang	35,1 ± 0,2
23	RB 02 - NT	<i>S. polycystum</i>	Nha Trang	32,9 ± 0,5
24	RB 03 - NT	<i>S. swartzii</i>	Nha Trang	36,0 ± 0,5
25	RB 04 - NT	<i>S. quinhoneness</i>	Nha Trang	38,7 ± 0,3
26	RB 05 - NT	<i>Sargassum</i> sp. 4	Nha Trang	33,8 ± 0,7
27	RB 06 - NT	<i>S. swartzii</i>	Nha Trang	34,5 ± 0,4
28	RB 06 - NT	<i>S. mcclurei</i>	Nha Trang	32,8 ± 0,5
29	RB 01 - TS	<i>D. dichotoma</i>	Trường Sa	27,5 ± 0,2
30	RB 02 - TS	<i>T. turbinata</i>	Trường Sa	38,6 ± 0,5
31	RB 02 - TS	<i>Sargassum</i> sp. 5	Trường Sa	32,5 ± 0,3
32	RB 02 - TS	<i>S. swartzii</i>	Trường Sa	35,0 ± 0,6

Nhận xét: Trong các mẫu rong nâu thu thập được tại vùng biển Việt Nam có 5 chi là *Padina*, *Sargassum*, *Dictyota*, *Turbinaria* và *Laminaria*; chi *Sargassum* có mật độ xuất hiện nhiều hơn, tìm thấy ở hầu hết các vùng biển nước ta. Các loài rong có hàm lượng axit Alginic và Mannitol cao là *Sargassum mcclurei*, *Sargassum kjellmanianum*, *Sargassum quinhoneness* Dai, *Sargassum polycystum*. Cao nhất là loài *Turbinaria turbinata* Trong đó loài *Sargassum mcclurei* có trữ lượng lớn nhất, và *Turbinaria turbinata* có trữ lượng không đáng kể.

Kết quả phân tích hàm lượng axit Alginic trong các loài rong nâu biến động theo tháng của một số tác giả cho thấy: Hàm lượng axit Alginic tích lũy trong các loài rong khác nhau có sự sai khác nhau rõ rệt. Hàm lượng axit Alginic cao nhất thường vào tháng 4 và tháng 5 là lúc các loài rong đã trưởng thành, phóng thích giao tử và

kích thước của cây rong là lớn nhất sau đó từ tháng 6 trở đi thì có hiện tượng hàm lượng axit Alginic giảm dần theo sự tàn lụi của rong. Từ đó cho thấy nên khai thác rong vào tháng 4 và đầu tháng 5 là lúc rong nâu đã trưởng thành, có kích thước lớn nhất, hàm lượng axit Alginic và Mannitol cao nhất. Mặt khác lúc này rong đã phóng thích các giao tử vào nước biển do vậy ta vừa thu vừa bảo vệ được lợi ích lâu dài, tránh được nạn hủy diệt nguồn lợi.

Kết quả phân tích hàm lượng axit alginic của một số loài rong nâu vào các thời gian khác nhau của năm trình bày trong bảng 3.4.

Bảng 3.4. Biến động theo tháng của hàm lượng axit alginic (%) trong một số loài rong mơ

Tên loài	Tháng				
	2	3	4	5	6
<i>S. tenerrium</i>	28,00	33,00	34,74	35,60	30,87
<i>S. vachellianum</i>	27,08	29,63	30,21	33,40	31,18
<i>S. Gracillimum</i>	34,41	34,96	35,83	33,27	29,13
<i>S. mcclurei</i>	34,18	35,02	36,27	35,81	29,45
<i>S. polycystum</i>	27,41	28,72	29,56	26,92	22,7
<i>S. swartzii</i>	34,71	36,22	37,48	39,17	33,92

Kết luận: Thời gian thu hoạch rong mơ thích hợp là tháng 4 -5 hàng năm. Các kết quả nghiên cứu về sự tích lũy polysacarit và đặc điểm sinh học cho thấy rong Mơ sau khi hoàn thành nhiệm vụ phóng thích các giao tử vào môi trường nước thì rong tàn lụi và chết đi. Vì vậy, việc thu hoạch rong mơ là cần thiết để giảm ô nhiễm môi trường nước. Tuy nhiên, việc khai thác phải được quản lý nhằm bảo vệ nguồn lợi rong Mơ. Cách làm cụ thể như sau:

- Khi cắt rong hoặc thu hoạch cần thiết phải để lại gốc bám và một đoạn thân dài khoảng 10cm, để giúp rong có phần tán che cho giao tử tránh bị các động vật ăn, giảm bớt ánh sáng tác động trực tiếp, phát triển thêm các thoi sinh sản và cung cấp thêm nguồn giống giao tử.

- Để lại khoảng 20% trữ lượng của bãi theo các luống, khoảng cách giữa các luống khoảng 100m để còn nơi cư trú và nơi đẻ cho động vật thủy sản.

- Khi cắt không được giẫm đạp lên san hô cũng như không neo tàu bè làm hủy diệt hệ sinh thái san hô.

Qua nghiên cứu, đánh giá sơ bộ hàm lượng alginate và sản lượng của các loài rong nâu, chúng tôi lựa chọn các loài có tiềm năng nguyên liệu lớn để tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học. Kết quả phân tích chỉ tiêu của 03 loài rong nâu được đưa ra trên bảng 3.5 và 3.6.

Bảng 3.5. Thành phần hóa học chính của các loài rong mơ

STT	Tên loài rong	Thành phần hóa học chính (%)						
		Protein	Lipit	Tro	Sulfat	Alginate	Laminaran	Fucoidan
1	<i>Sargassum mcclurei</i>	5,5	1,9	37,8	4,9	32,1	0,08	2,4
2	<i>Sargassum swartzii</i>	7,0	0,5	30,2	5,8	29,5	0,29	0,82
3	<i>Sargassum polycystum</i>	3,1	0,6	46,3	3,9	29,7	0	2,7

Bảng 3.6. Thành phần đường đơn của polysacarit rong mơ

STT	Tên loài rong	Thành phần polysacarit chính (%)				
		Xylose	Fucose	Mannose	Glucose	Galactose
1	<i>Sargassum mcclurei</i>	3,4	2,8	1,4	2,6	4,0
2	<i>Sargassum swartzii</i>	0,1	0,4	0,05	0,5	0,1
3	<i>Sargassum polycystum</i>	1,2	3,1	1,0	1,2	2,3

Phân tích thành phần hóa học chính của 3 loài rong mơ cho thấy hàm lượng protein trong các mẫu rong biển biến động trong khoảng từ 1,7 đến 7,0%, hàm lượng lipit < 2 %, hàm lượng tro từ 20,4% đến 46,3%. Hàm lượng tro cao chứng tỏ nguyên liệu rong chứa hàm lượng muối khoáng cao, vì vậy trước khi chế biến cần thiết phải rửa sạch các chất khoáng còn bám trên cây rong.

Sự có mặt đồng thời alginate và các chất polyme sinh học như fucoidan, laminaran và polyuromanin trong rong nâu cho thấy rong nâu không chỉ là nguồn nguyên liệu để sản xuất alginate mà còn là nguyên liệu sản xuất các polyme sinh học.

Bảng 3.7. Thành phần hóa học và tính chất lý hóa của alginate canxi chiết từ rong mơ

STT	Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu đối chứng của Nga
01	Dạng		Bột đồng nhất	Bột đồng nhất	Bột đồng nhất	Bột đồng nhất
02	Màu sắc		Trắng ngà	Trắng ngà	Trắng xám	Trắng đến xám
03	Mùi vị		Đặc trưng	Đặc trưng	Đặc trưng	Đặc trưng

04	Độ ẩm	%	4,2	4,7	4,3	< 10
05	Hàm lượng tro	%	20,5	19,7	21,0	19-21
06	Axit alginic	%	73,0	74,0	73,5	73-74
07	Canxi	%	10,3	10,7	11,7	≥ 9
08	Độ tan trong nước	%	0,04	0,02	0,03	Không tan
09	Độ trương trong nước	%	150-200	150-200	150-200	200

Ghi chú: Mẫu 1: Alginate chiết từ loài rong *Sargassum mcclurei*; Mẫu 2: Alginate chiết từ loài rong *Sargassum swartzii*; Mẫu 3: Alginate chiết từ loài rong *Sargassum polycystum*.

Thành phần hóa học và tính chất lý hóa của alginate canxi chiết từ rong nâu được đưa ra trên bảng 3.7. So với canxi alginate của Nga thì canxi alginate sản xuất từ một số loài rong nâu Việt Nam có độ trương trong nước kém hơn và hòa tan một lượng nhỏ trong nước. Điều này được giải thích là do rong nâu sinh trưởng tại Nga có tỷ lệ M/G cao từ 1,6 đến 2,6 và trọng lượng phân tử trung bình lên tới 204 KDa đối loài rong thuộc chi *Laminaria*. Trong khi rong nâu sinh trưởng tại Việt Nam có tỷ lệ M/G thấp hơn từ 0,6 đến 1,3 và trọng lượng phân tử vào khoảng 100 KDa.

3.2.2. Nghiên cứu khảo sát hàm lượng các acid béo và lớp chất lipid

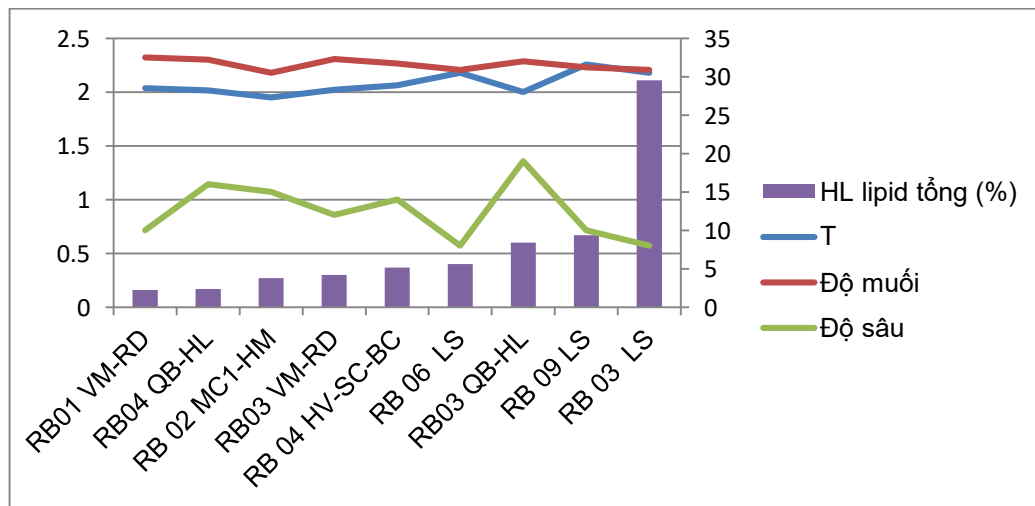
❖ Kết quả về hàm lượng lipid tổng trong các mẫu rong nâu

Bảng 3.8. Kết quả về hàm lượng lipid tổng các mẫu rong nâu

TT	Ký hiệu mẫu	Ngày thu mẫu	Nhiệt độ	Độ muối	Độ sâu	Hàm lượng lipid tổng (%)
1	RB02 QB-HL	29/04/2016	27,9	31,5	21	0,32
2	RB03 QB-HL	29/04/2016	28	32	19	0,6
3	RB04 QB-HL	29/04/2016	28,2	32,2	16	0,17
4	RB01 VM-RD	27/04/2016	28,5	32,5	10	0,16
5	RB02 VM-RD	27/04/2016	28,5	31,6	9	0,93
6	RB03 VM-RD	26/04/2016	28,3	32,3	12	0,3
7	RB04 VM-RD	26/04/2016	28	31,2	20	1,28
8	RB 01 MC1-HM	24/04/2016	27,4	30,8	13	0,55
9	RB 02 MC1-HM	24/04/2016	27,3	30,5	15	0,27
10	RB 04 HV-SC-BC	08/07/2017	28,9	31,7	14	0,37

11	RB 02 HV-SC-MTL	07/07/2017	29,3	32,3	9	0,4
12	RB 1(1) HT-CLC	13/07/2017	28,8	31,1	10	0,27
13	RB 03 LS	04/09/2017	30,5	30,9	8	2,11
14	RB 06 LS	06/09/2017	30,5	30,9	8	0,4
15	RB 07 LS	06/09/2017	30,5	30,9	8	0,9
16	RB 08 LS	07/09/2017	31,5	31,2	11	1,58
17	RB 09 LS	07/09/2017	31,6	31,2	10	0,67

Hàm lượng lipid thu được trong các mẫu rong nâu đạt 0,07-2,11%. Các mẫu chủ yếu có hàm lượng trên 0,5% chiếm hơn một nửa tổng số mẫu nghiên cứu. Có 5 mẫu Rong có hàm lượng lipid tổng ở mức trung bình 0,5-1% và 3 mẫu ở mức cao tới 1-2% là *Dictyota dichotoma* (RB04 VM-RD); *Sargassum* sp. 2 (RB 03 LS); *Turbinaria turbinata* (RB 08 LS) với hàm lượng lần lượt là 1,28%; 2,11% và 1,58%.



Hình 3.2. Biểu đồ hàm lượng lipid tổng trong các mẫu Rong mơ *Sargassum*

Trong các mẫu nghiên cứu, loài rong nâu thuộc chi Rong mơ *Sargassum* được quan tâm nhất do được nuôi trồng và khai thác nhiều nhất trong các loài rong nâu ở nước ta. Hàm lượng lipid của các mẫu rong mơ *Sargassum* trong nghiên cứu này là từ 0,17-2,11% (Hình 3.2). Các mẫu được thu thập ở độ sâu từ 8 tới 16m, nhiệt độ từ 27,3 đến 31,6°C. Trong đó, mẫu *Sargassum* sp. 2 (RB 03 LS) có hàm lượng lipid cao nhất và cao hơn đáng kể so với các khảo sát trước đây của nhóm nghiên cứu, cao gấp đôi so với công bố gần đây của nhóm tác giả Phạm Thu Huệ và cộng sự.

❖ Thành phần các acid béo trong lipid tổng

Nghiên cứu về thành phần và hàm lượng acid béo có trong lipid tổng của các mẫu rong biển chúng tôi nhận thấy có sự đa dạng các acid béo trong thành phần lipid

tổng của các mẫu nghiên cứu, phổ biến từ C14-C24. Đặc biệt trong đó mẫu Rong nâu RB 03 LS *Sargassum* sp. 2 có sự xuất hiện của acid béo no hexacosanoic (26:0) với hàm lượng lần lượt là 0,41%. Các acid béo xuất hiện với thành phần lipid của các mẫu rong biển trong đó có một số acid béo có mặt trong gần như toàn bộ các mẫu nghiên cứu như các acid béo no 14:0; 15:0; 16:0 và 18:0 hay các acid béo không no như 16:1n-9; 18:2n-6; 18:1n-9; 20:4n-6; 20:3n-6. Tuy nhiên, hàm lượng của các acid béo lại không đồng đều mà tập trung chủ yếu ở các acid 14:0; 16:0; 18:2n-6; 18:1n-9 và 20:4n-6 với hàm lượng cao nhất đạt từ 14,66-79,43%.

Bảng 3.9. Kết quả các acid béo trong lipid tổng các mẫu rong nâu

Mã	SFA	USFA	MUFA	PUFA	Acid n-3	Acid n-6	Acid n-9	Acid n-7	Khác
RB02 QB-HL	30,01	69,99	33,43	36,56	13,63	22,93	28,82	4,61	0
RB03 QB-HL	35,15	59,82	51,32	8,5	3,06	5,44	8,97	42,35	5,03
RB04 QB-HL	37,27	62,73	28,5	34,23	15,86	18,37	28,5	0	0
RB01 VM- RD	85,26	14,74	3,86	10,88	0	10,88	1,69	2,17	0
RB02 VM- RD	22,89	77,11	28,94	48,17	14,55	33,62	25,26	3,68	0
RB03 VM- RD	36,56	63,44	23,72	39,72	13,37	26,35	21,42	2,3	0
RB04 VM- RD	17,01	82,99	24,47	58,52	22,92	35,6	16,26	8,21	0
RB 01 MC1- HM	20,83	79,17	23,51	55,66	19,88	35,78	19,72	3,79	0
RB 02 MC1- HM	25,27	74,73	22,64	52,09	9,06	43,03	22,64	0	0
RB 04 HV- SC-BC	54,68	45,32	26,04	19,28	5,26	14,02	26,04	0	0
RB 02 HV- SC-MTL	25,19	74,81	25,02	49,79	23,37	26,42	25,02	0	0
RB 1(1)HT- CLC	86,69	11,52	10,83	0,69	0	0,69	4,25	6,58	1,79
RB 03 LS	27,24	67,5	33,12	34,38	28,81	5,57	14,44	18,68	5,26

RB 06 LS	48,07	50,01	24,34	25,67	5,92	19,75	24,34	0	1,92
RB 07 LS	6,99	93,01	15,93	77,08	40,21	36,87	15,62	0,31	0
RB 08 LS	25,75	73,53	9,67	63,86	41,51	22,35	7,03	2,64	0,72
RB 09 LS	74,19	24,87	15,22	9,65	4,63	5,02	9,6	5,62	0,94

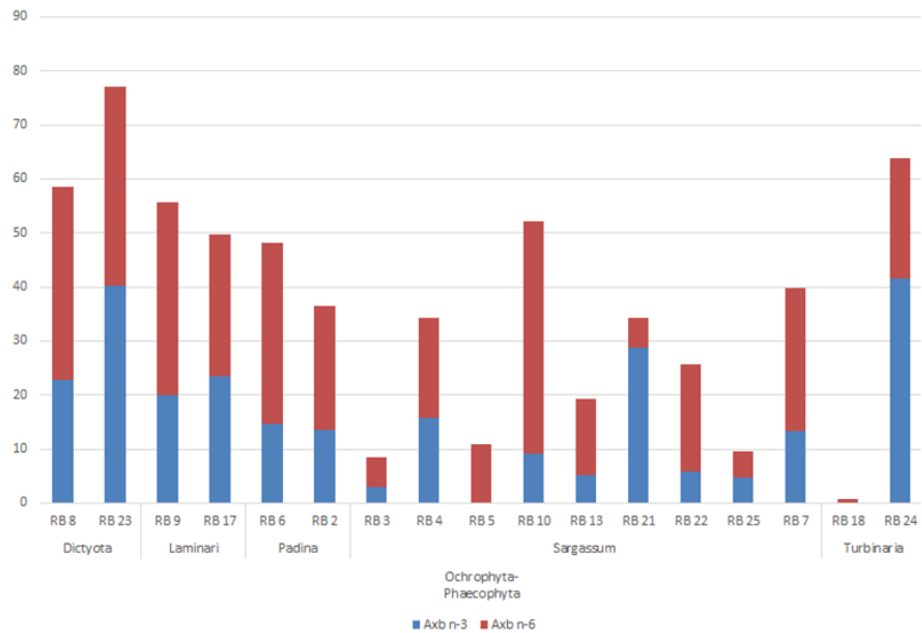
Hàm lượng các acid béo không no (MUFA và PUFA): Trong khi hàm lượng MUFA được hình thành chủ yếu từ các acid béo C16 và C18 có một nối đôi thì PUFA được hình thành chính từ các acid béo C20. Các acid béo nhóm PUFA này có hoạt tính tốt đối với sức khỏe, là dạng tiền chất cho nhiều hoạt chất sinh học khác trong cơ thể. Số liệu phân tích đã cho thấy hàm lượng MUFA trong các mẫu nghiên cứu đạt 1,87-51,32%, hàm lượng PUFA là 0,69-77,08%. Có tới 7 mẫu có hàm lượng PUFA đạt trên 50% tổng acid béo, đây là những con số rất có ý nghĩa trong việc nghiên cứu thành phần acid béo của Rong cỏ biển. Bởi các nghiên cứu trước đây chỉ cho thấy hàm lượng các acid béo PUFA trên 50% ở các loài động vật biển và VSV phân lập từ biển.

Hàm lượng các acid béo n-3/n-6: Hàm lượng acid béo n-3 dao động trong khoảng từ 0 đến 41,51% tổng các acid béo. Trong đó 13 mẫu có hàm lượng n-3 cao hơn 10%, cho thấy tiềm năng thu nhận các acid béo omega3 giàu hoạt tính từ các đối tượng thực vật có khả năng tái tạo nhanh sẽ trở thành hiện thực trong tương lai rất gần. Các acid n-3, đóng góp vào thành phần nhóm acid này chủ yếu là ba acid béo C20:5n-3 (EPA), 20:6n-3 và acid C22:6n-3 (DHA). Đây là các acid béo không no quan trọng nhất trong các quá trình sinh tổng hợp liên quan tới lipid của các sinh vật. Hàm lượng hai acid béo C20:5n-3 (EPA), 20:6n-3 cá biệt trong hai mẫu RB04 VM-RD *Dictyota dichotoma* và RB 03 LS *Sargassum* sp. 2 đạt tới 20,0% và 17,25%.

Trong đa số các mẫu Rong cỏ biển được nghiên cứu, hàm lượng n-6 cao hơn so với các acid béo n-3. Hàm lượng các n-6 chủ yếu do acid béo 18:2n-6/acid béo đặc trưng của nhóm thực vật và acid béo 20:4n-6 (AA) tạo thành. Đây là những tiền chất quan trọng trong quá trình hình thành các dạng hormone có khả năng tác động lên hệ cơ phẳng, hệ bài tiết và hệ tuần hoàn trong cơ thể sống.

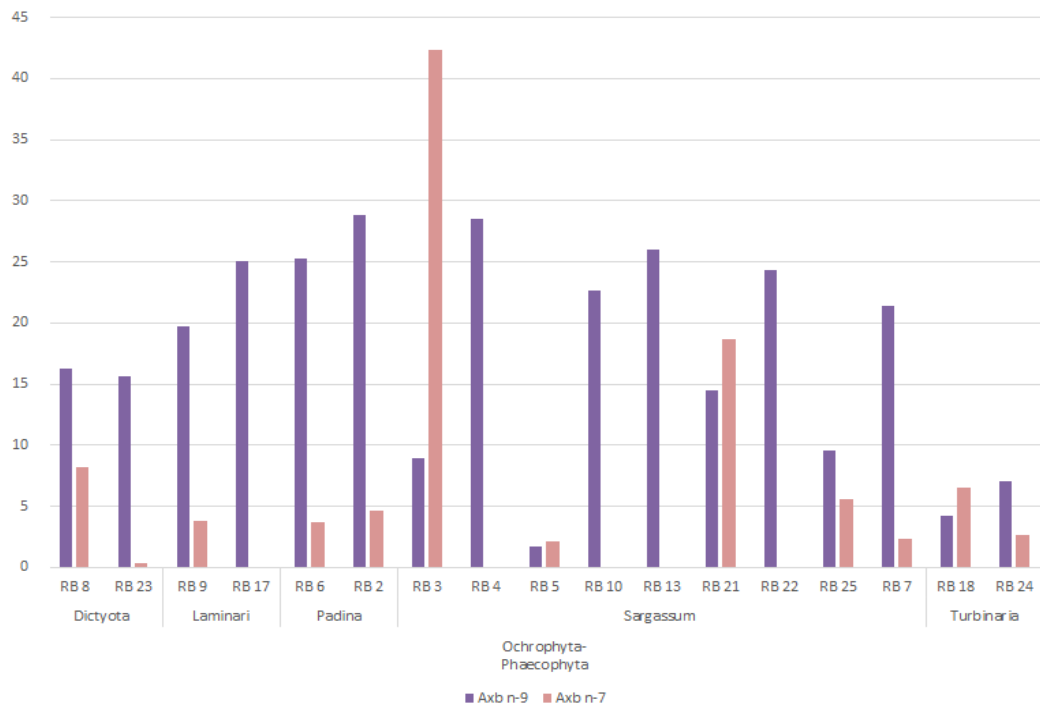
Trong các mẫu thuộc chi *Sargassum*, mẫu RB01 VM-RD *Sargassum* sp. chỉ có mặt acid béo n-6. Các mẫu còn lại có tổng hàm lượng acid béo n-3/n-6 dao động từ 8,5 đến 52,09% tổng acid béo. Ở hai mẫu thuộc chi *Turbinaria* có thành phần n-3/n-6 trái ngược nhau, mẫu RB 08 LS *Turbinaria turbinata* có tổng hàm lượng n-3

và n-6 rất cao, lên tới 63,86% còn ở mẫu *Turbinaria* sp. chỉ có 0,69% n-6, không có mặt các acid béo n-3. Các kết quả này có ý nghĩa bổ sung số liệu cho những nghiên cứu trước đây về lipid và acid béo trên đối tượng Rong biển.



Hình 3.3. Biểu đồ hàm lượng các acid béo n-3 và n-6 trong các mẫu nghiên cứu

Hàm lượng các acid béo n-7 và n-9: Không giống như các acid béo n-3 và n-6, nhóm các acid béo n-7 và n-9 là những acid béo không thiết yếu nhưng có vai trò là tác nhân điều hòa quá trình tổng hợp CRP (C - reactive protein, xuất hiện nhiều sau khi bị nhồi máu cơ tim), điều hòa lượng triglyceride và các cholesterol xấu.



Hình 3.4. Biểu đồ hàm lượng acid béo n-7 và n-9 trong các mẫu nghiên cứu

Nghiên cứu cho thấy hàm lượng n-9 trong các mẫu Rong nâu dao động từ 0,19 đến 28,82%. Hàm lượng n-9 trung bình là 17,62%, mẫu Rong nâu có hàm lượng n-9 thấp nhất cũng chỉ đạt 1,69%. Hàm lượng n-7 của các mẫu nghiên cứu chủ yếu ở mức nhỏ hơn 10%, chỉ có hai mẫu RB03 QB-HL *Sargassum polycystum* và RB 03 LS *Sargassum* sp. 2 có hàm lượng acid béo n-7 là 42,35% và 18,68%.

Sự xuất hiện của các acid béo n-7 và n-9 trong thành phần lipid được đánh giá là rất quan trọng, bởi trong các nghiên cứu gần đây đang chỉ rõ ra vai trò của chúng ở một số quá trình sinh tổng hợp ở người. Chúng đóng vai trò như là các hormone kìm hãm hoặc chuyển hóa các thành phần lipid xấu giúp con người cải thiện được những bệnh lý liên quan đến tim mạch, mỡ máu...

3.2.3. Nghiên cứu dự đoán khả năng ức chế enzym tyrosinase của một số hợp chất phân lập từ rong mơ

3.2.3.1. Kết quả chuẩn bị cấu trúc các hợp chất phân lập từ loài Rong mơ

Qua tổng hợp tài liệu, có 71 chất được tách chiết từ Rong mơ đã được các nhóm nghiên cứu và xác định cấu trúc, công thức và ký hiệu được biểu thị trong phụ lục. Công thức cấu tạo của các hợp chất được xây dựng trên phần mềm Chemdraw14 sau đó được chuyển sang dạng ba chiều bằng chem3D và tối ưu hóa năng lượng thông qua thuật toán MM2. Do bản chất của các hợp chất không phải là peptide, điện tích Gasteiger đã được bổ sung và sau đó gắn các hydrogens không phân cực. Việc xác định mạch chính của hợp chất được thực hiện tự động bởi phần mềm MGLTools. Các cấu trúc đã tối ưu năng lượng được chuyển sang dạng file pdbqt, là dạng file đầu vào cho docking phân tử. Có 9 loại nguyên tử xuất hiện trong cơ sở dữ liệu bao gồm: ['A', 'C', 'NA', 'OA', 'N', 'HD', 'SA', 'Cl', 'P'].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hợp chất tropolone đã được chứng minh có cơ chế ức chế tyrosinase làm chất chuẩn.

3.2.3.2. Kết quả mô phỏng lắp ghép phân tử và phân tích chỉ số dược động học

Cấu hình của hệ thống máy tính được sử dụng cho mô phỏng như sau: Intel®Core™ i7-9700K CPU@3.60 GHz, with 32GB DDR4 RAM, Ubuntu-Linux 14.04.6 LTS. Các kết quả thu được của quá trình mô phỏng được phân tích thông qua các phần mềm PyMOL, LigPlus, Discovery Studio Visualizer và Maestro (Schrödinger). Thời gian chạy mô phỏng thực tế thực hiện trong 120 tiếng.

Kết quả docking của 71 hợp chất với enzyme tyrosinase được trình bày trong bảng 3.1. Theo thuật toán của AutoDock4, giá trị năng lượng tự do liên kết càng âm nhiều có nghĩa ái lực liên kết giữa phối tử và enzyme đích thụ thể càng mạnh. Từ bảng số liệu cho thấy chất chuẩn tropolone có điểm năng lượng liên kết với tyrosinase là -12,35 kcal/mol, do đó có thể coi đây là giá trị chuẩn để so sánh, các hợp chất có điểm năng lượng tự do liên kết gần bằng hoặc âm nhiều hơn giá trị này có thể được giả thuyết là tiềm năng liên kết tốt với enzyme tyrosinase.

Tổng hợp số liệu đã chỉ ra, các hợp chất **3**, **11**, **16**, **18**, **38** và **45** được xác định có tiềm năng tạo ái lực liên kết mạnh với enzyme tyrosinase với giá trị năng lượng liên kết lần lượt là -14,06; -13,62; -12,02 và -12,13; -12,15 và -13,99 kcal/mol. Trong đó, năng lượng tự do liên kết của ba chất **3**, **11** và **45** vượt trội so với giá trị thu được của phối tử chuẩn tropolone.

Bảng 3.10. Kết quả dự đoán năng lượng liên kết của các hợp chất với enzyme tyrosinase

Ký hiệu	Năng lượng liên kết ΔG_{pred} (kcal/mol)	Ký hiệu	Năng lượng liên kết ΔG_{pred} (kcal/mol)
Dock 1	-7,40	Dock 37	-6,23
Dock 2	-6,53	Dock 38	-12,15
Dock 3	-14,06	Dock 39	-9,27
Dock 4	-11,73	Dock 40	-9,68
Dock 5	-10,85	Dock 41	-6,22
Dock 6	-9,09	Dock 42	-6,81
Dock 7	-10,40	Dock 43	-5,73
Dock 8	-9,56	Dock 44	-11,78
Dock 9	-9,50	Dock 45	-13,99
Dock 10	-8,42	Dock 46	-11,28
Dock 11	-13,62	Dock 47	-11,00
Dock 12	-8,65	Dock 48	-9,58
Dock 13	-5,82	Dock 49	-9,01
Dock 14	-5,85	Dock 50	-8,55
Dock 15	-4,67	Dock 51	-8,16

Dock 16	-12,02	Dock 52	-7,76
Dock 17	-11,86	Dock 53	-9,85
Dock 18	-12,13	Dock 54	-7,40
Dock 19	-10,27	Dock 55	-11,04
Dock 20	-4,79	Dock 56	-7,93
Dock 21	-4,83	Dock 57	-7,51
Dock 22	-5,04	Dock 58	-9,03
Dock 23	-6,32	Dock 59	-8,94
Dock 24	-7,12	Dock 60	-10,13
Dock 25	-6,53	Dock 61	-9,42
Dock 26	-6,34	Dock 62	-9,23
Dock 27	-7,28	Dock 63	-10,15
Dock 28	-7,30	Dock 64	-10,22
Dock 29	-5,74	Dock 65	-11,04
Dock 30	-6,00	Dock 66	-9,81
Dock 31	-6,59	Dock 67	-6,75
Dock 32	-5,53	Dock 68	-6,80
Dock 33	-5,80	Dock 69	-8,30
Dock 34	-7,24	Dock 70	-7,42
Dock 35	-7,57	Dock 71	-10,40
Dock 36	-8,12	Tropolone	-12,35

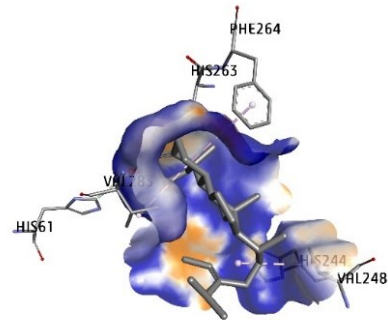
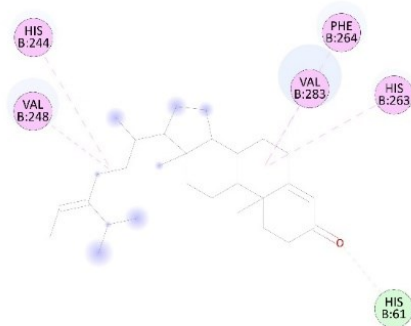
Phân tích tương tác tạo thành của ba hợp chất có ái lực liên kết mạnh nhất với đích sinh học mục tiêu, kết quả được trình bày trong bảng 3.10. Số liệu thu được cho thấy đa số các axit amin quan trọng hình thành nên vùng hoạt động của enzyme (His259, His263, Met280, Ser282, Ala286) có tham gia tạo liên kết với chất ức chế chuẩn tropolone.

Bảng 3.11. Kết quả mô phỏng docking phân tử các hợp chất tiềm năng với enzyme sEH

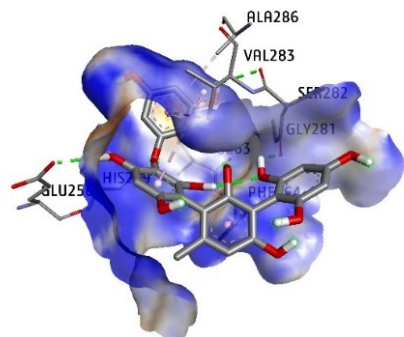
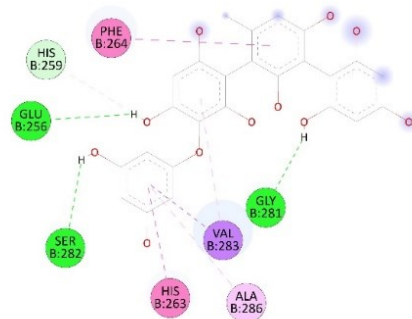
Hợp chất	Số lượng liên kết Hydro	Amino acid tham gia tạo tương tác Hydro	Amino acid tham gia tạo tương tác kỵ nước
Dock 3	0	-	His61, His244, Val248, His263, Phe264, Val283

Dock 11	3	Glu256, Gly281, Ser282	His259, His263, Phe264, Val283, Ala286
Dock 45	4	Asn260, Arg268, Met280, Val283	His263, Phe264, Pro284, Ala286
tropolone	2	Met280, Ser282	His263, Val283, Ala286

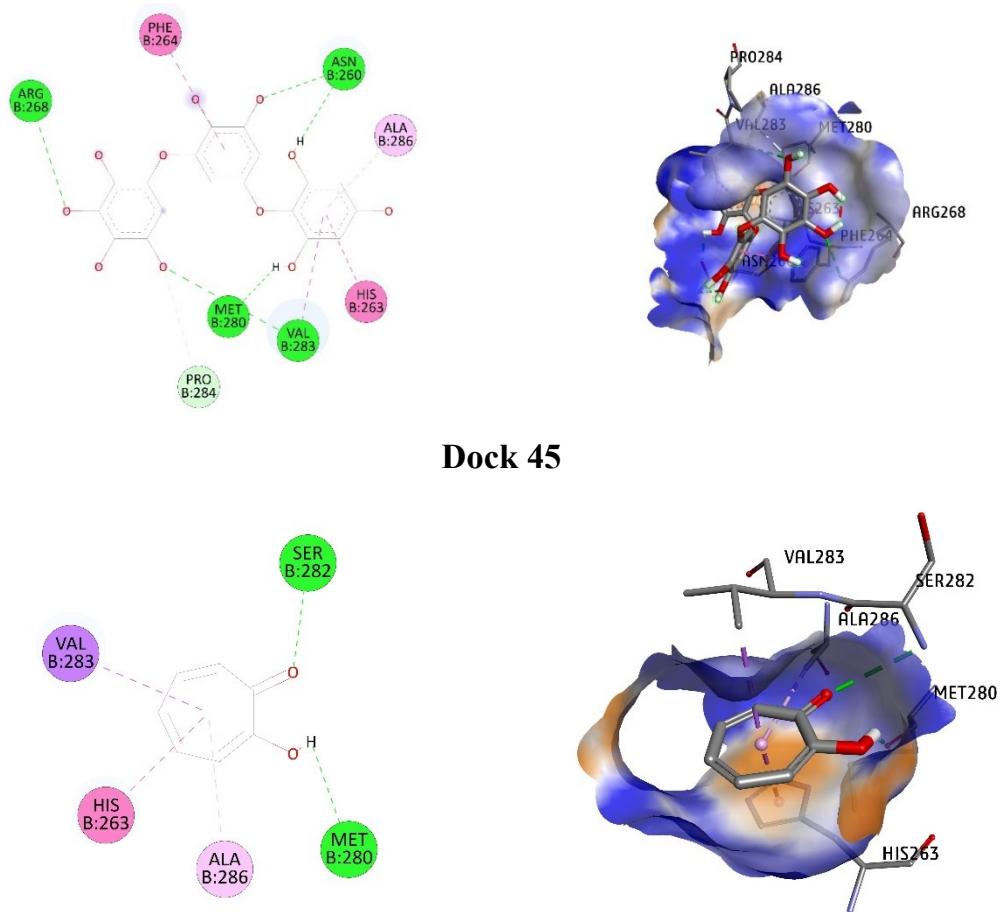
Hình ảnh tương tác không gian hai chiều và ba chiều của các hợp chất **3**, **11** và **45** được trình bày trong hình 3.5. Kết quả cho thấy, trong số ba hợp chất thể hiện ái lực liên kết mạnh với sEH, chỉ có hợp chất **11** và **45** có tiềm năng ức chế hoạt động của enzyme này thông qua các tương tác tạo thành trực tiếp với những amino axit quan trọng cấu thành nên vùng hoạt động của enzyme. Hợp chất **3** được quan sát không hình thành liên kết hydro với enzyme tyrosinase, các tương tác yếu tham gia vào tương tác giữa phối tử và enzyme gồm có His61, His244, Val248, His263, Phe264, Val283. Do đó, có thể định hướng rằng hợp chất **3** không phải là chất ức chế tiềm năng với đích thụ thể nghiên cứu.



Dock 3














Dock 11



Dock 45

tropolone

Interactions

	Van der Waals		Pi-Sigma
	Unfavorable Bump		Pi-Pi T-shaped
	Salt Bridge		Alkyl
	Carbon Hydrogen Bond		Pi-Alkyl
	Pi-Anion		Conventional Hydrogen Bond
	Pi-Sulfur		

Hình 3.5. Cấu hình liên kết trong không gian hai chiều và ba chiều được dự đoán bởi phần mềm AutoDock4.2.6 của các hợp chất

Phân tích cấu hình liên kết của hợp chất **11** cho thấy tạo ba liên kết hydro với các amino axit Glu256, Gly281, Ser282 và tương tác với enzyme được hỗ trợ bởi các liên kết kỵ nước với His259, His263, Phe264, Val283, Ala286. Những amino axit hình thành liên kết với hợp chất **11** này có sự tương đồng cao so với chất chuẩn tropolone, đáng chú ý là liên kết hydro với Ser282. Đây là một trong những axit amin đã được chứng minh đóng vai trò chính trong hình thành chức năng hoạt động của

enzyme tyrosinase. Có thể nhận định hợp chất **11** có tiềm năng cao trong việc ức chế enzyme nghiên cứu.

Kết hợp dữ liệu từ bảng 3.11 và hình ảnh tương tác (Hình 3.5) đã chỉ ra hợp chất **45** gắn kết với đích thụ thể bằng việc hình thành bốn liên kết hydro với Asn260, Arg268, Met280 và Val283, trong đó, Met280 là một trong những axit amin cấu thành nên vùng chức năng của enzyme tyrosinase. Bên cạnh đó, các liên kết yếu hỗ trợ cho tương tác với các amino axit khác được quan sát gồm His263, Phe264, Pro284, Ala286. Như vậy, có thể giả thuyết rằng hợp chất **45** là chất ức chế tiềm năng của enzyme tyrosinase.

Các đặc tính giống thuốc của hai hợp chất ức chế tiềm năng **11** và **45** được sử dụng bộ quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski (Ro5) nhằm xác định hợp chất phù hợp cho các giai đoạn nghiên cứu phát triển thuốc tiếp theo. Bên cạnh đó, các hợp chất được đánh giá thêm về các đặc tính dược động học và dự đoán độc tính bằng cách sử dụng webserver Molinspiration và ProTox-II cheminformatic (Bảng 3.12).

Bảng 3.12 Chỉ số ADMET và dự đoán độc tính của các chất ức chế tiềm năng

Hợp chất	MW	HBD	HBA	LogP	MR (cm ³ /mol)	LD ₅₀ (mg/kg)	Toxicity prediction ^a	HIA
Dock 11	496	10	11	4,17	125,21	600	4	0.9897
Dock 45	406	9	11	2,19	94,24	550	4	0.8692
tropolone	122	1	2	1,12	33,99	385	4	0.9923

^a Tổng diện tích bề mặt phân cực của phân tử

^b Dự đoán độc tính: 1 => 6 (Độc tính cao đến không độc)

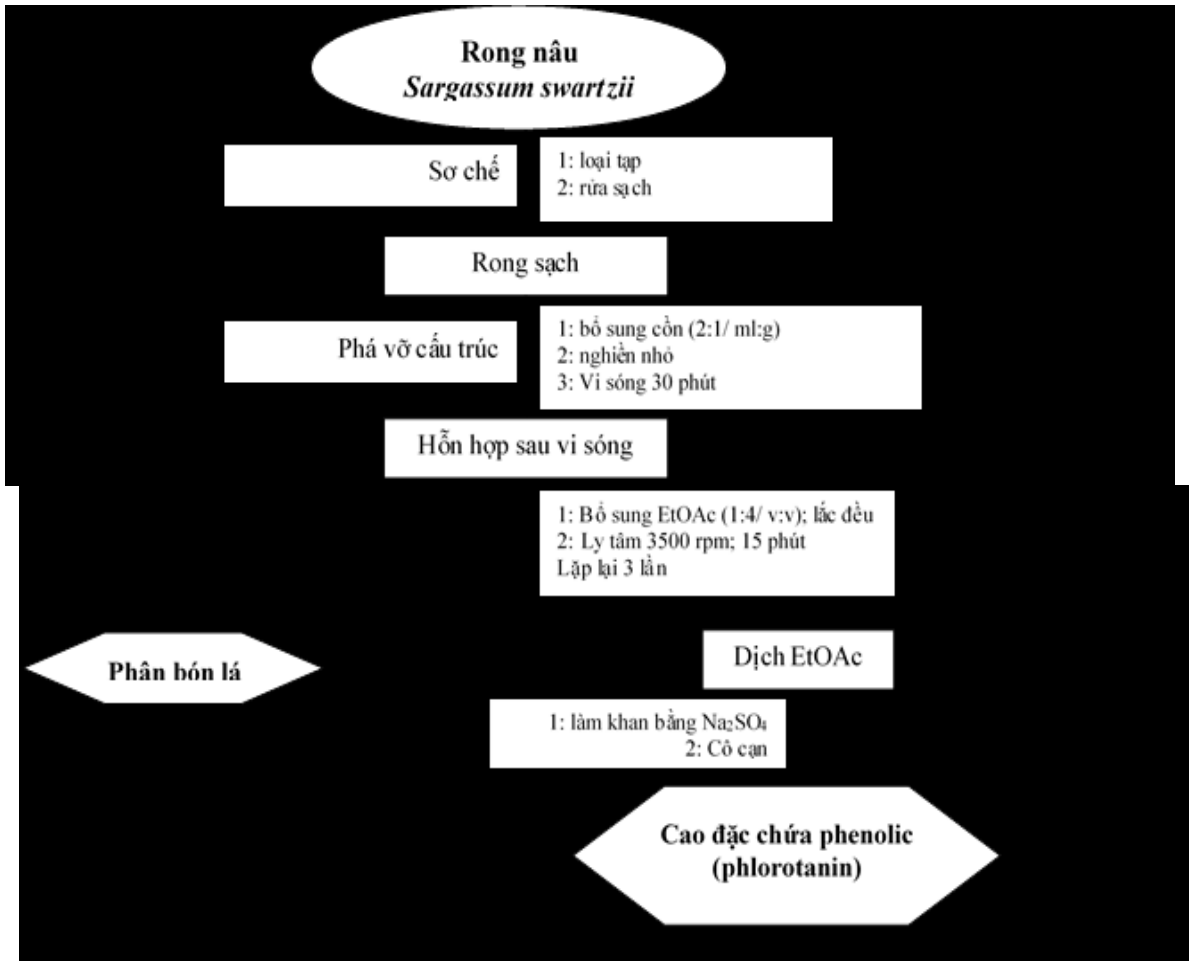
Kết quả thu được chỉ ra rằng, cả hai hợp chất **11** và **45** được xác định sở hữu những đặc tính thuận lợi cho việc phát triển thuốc đường uống, với ít hơn ba lần vi phạm các chỉ tiêu của quy tắc Lipinski. Thông số dược động học và dữ liệu độc tính dự đoán kết hợp với kết quả mô phỏng docking phân tử đã đóng góp hữu ích cho việc đánh giá các hợp chất tiềm năng có khả năng ức chế enzyme tyrosinase và các đặc tính giống thuốc để tiến hành nghiên cứu phát triển thuốc. Kết quả tính toán các đặc tính cho thấy các hợp chất **11** và **45** được phân loại là ít độc (hạng 4), an toàn tương đương chất chuẩn tropolone và có giá trị LD₅₀ dự đoán cao hơn so với chất chuẩn.

Trong nghiên cứu ADMET, một trong những thách thức quan trọng nhất ảnh hưởng đến sinh khả dụng của thuốc là sự di chuyển qua hàng rào biểu mô ruột, điều

này quyết định tốc độ và mức độ hấp thu thuốc của người. Theo phân tích giá trị HIA, hợp chất **11** và **45** có giá trị lần lượt là 0,9897 và 0,8692. Điều này cho thấy khả năng hấp thu cao trong đường ruột, có thể nhận định hợp chất **11** có tiềm năng trong phát triển thuốc cao hơn so với hợp chất **45** nhờ vượt trội ở các chỉ số ADMET.

3.3. Kết quả nghiên cứu chiết xuất phenolic từ rong mơ

3.3.1. Quy trình công nghệ chiết xuất phenolic từ rong mơ theo phương pháp vi sóng



Hình 3.6. Quy trình chiết xuất phenolic từ rong nâu

Thuyết minh quy trình

Bước 1: Sơ chế nguyên liệu

Mẫu rong mơ sau khi thu hoạch được làm sạch, loại bỏ rong lạ và sinh vật bám trên rong, rửa sạch bằng nước biển sau đó rửa sạch lại bằng nước ngọt, bảo quản ở nhiệt độ -20°C trước khi sử dụng

Bước 2: Sử dụng vi sóng phá vỡ tế bào nguyên liệu

Rong nâu sau sơ chế sạch được bổ sung nước theo tỉ lệ 4/1 (nước/ rong: V/m); nghiền nhỏ bằng máy nghiền chuyên dụng đến kích thước $< 0,1\text{mm}$

Rong nâu sau khi nghiền được tiến hành chiết vi sóng (Sharp, 800 W) trong Thời gian chiết 65 phút, nồng độ ethanol 52%, công suất vi sóng 613 W, và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 33/1.

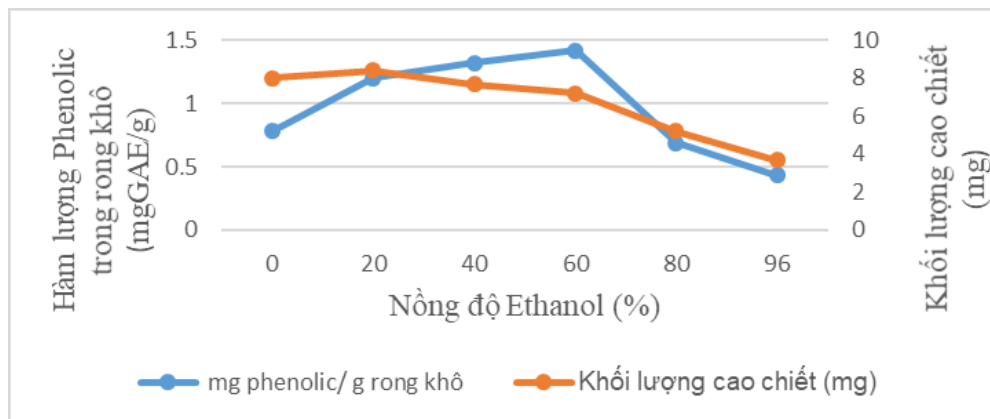
Bước 4: Chiết thu hồi Cao đặc chứa phenolic (phlorotannin)

Hỗn hợp A1 sau khi chiết diethylene được bổ sung ethyl axetat (1/4, thể tích/thể tích), khuấy đều trong 10 phút sau đó đưa vào ống ly tâm ở tốc độ 3500 vòng/ phút trong 15 phút, thu lấy pha hữu cơ; lặp lại quá trình 3 lần. Gom pha hữu cơ làm khan bằng Na_2SO_4 , cô cạn thu được phần cặn chiết chứa Cao đặc chứa phenolic (phlorotannin).

3.3.2. Kết quả nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết phenolic từ rong nâu theo phương pháp chiết vi sóng

a. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hàm lượng phenolic

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm, mỗi mẫu lấy chính xác 5g rong đã xay nhỏ để nghiên cứu chiết rút phenolic bằng dung môi ethanol với các nồng độ là 0%, 30%, 50%, 75% và 96%; tỷ lệ dung môi:nguyên liệu là 30:1, và thực hiện ở trong lò vi sóng với công suất trung bình (400W), vi sóng trong thời gian 60 phút. Tiến hành lọc thu dịch chiết để xác định hàm lượng phenolic, lấy khoảng 10 ml đi cô quay thu cặn chiết. Kết quả thu được thể hiện ở hình sau.



Hình 3.7. Biểu đồ ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hàm lượng phenolic

Nhận xét: Từ hình 3.7. cho thấy:

Về hàm lượng phenolic: Kết quả phân tích cho thấy nồng độ EtOH có ảnh hưởng tới hàm lượng phenolic thu được. Cụ thể hàm lượng phenolic tăng mạnh từ 0,78 mgGAE/g lên 1,42 mgGAE/g khi nồng độ dung môi tăng từ 0% - 60%. Chiết với dung môi nồng độ 60% thu được hàm lượng phlorotannin cao nhất 1,42

mgGAE/g. Nồng độ dung môi tiếp tục từ 60% - 96% nhưng hàm lượng phenolic giảm dần.

Về khối lượng cặn chiết: Khối lượng cặn chiết thu được cao nhất là 8,4 mg/g rong khi chiết bằng EtOH 20%. Khi nồng độ dung môi chiết tăng dần từ 20% - 96% thì khối lượng cặn chiết thu được giảm dần từ 8,4 mg đến 3,68 mg.

Có thể giải thích kết quả trên như sau:

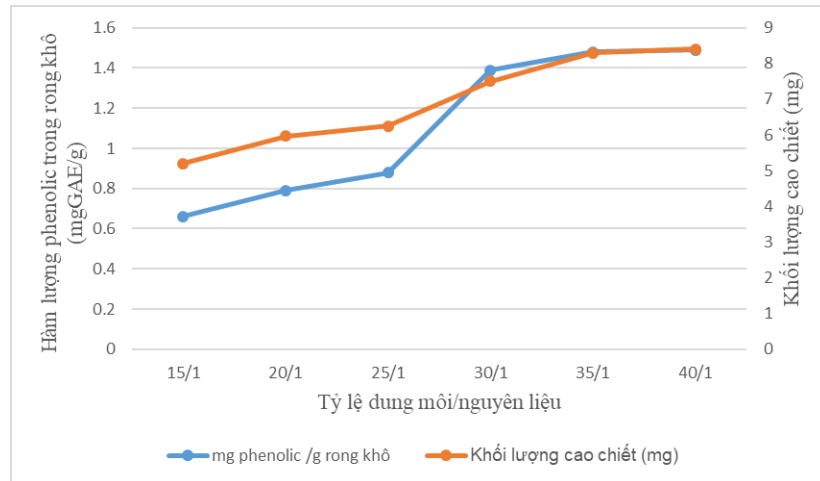
Do hệ dung môi là một trong các yếu tố quan trọng để chiết tách polyphenol thực vật. Việc lựa chọn dung môi sẽ ảnh hưởng đến cả loại và hàm lượng các hợp chất phenol chiết tách được. Vì vậy độ hòa tan của phenolic chịu ảnh hưởng lớn bởi độ phân cực của dung môi sử dụng.

Trong rong nâu, phenolic tồn tại trong màng tế bào thông qua liên kết cộng hóa trị với polysaccharide, protein. Điều này dẫn đến là khi chiết phenolic các chất chiết đi kèm luôn lớn hơn phenolic rất nhiều. Vì vậy khi khảo sát dung môi chiết một yếu tố quan trọng cần quan tâm là cặn chiết.

Nước là dung môi có tính phân cực mạnh nên ngoài khả năng hòa tan phenolic, nó còn có thể hòa tan được nhiều hợp chất khác trong rong, đặc biệt là những thành phần tan được trong nước lại chiếm một phần lớn. Chính vì vậy, khi chiết bằng dung môi với các nồng độ 0%, 20% hàm lượng phenolic thu được tăng dần và cao nhất khi chiết bằng dung môi có tính phân cực trung bình (EtOH nồng độ 60%). Khối lượng cặn chiết giảm dần vì độ phân cực dung môi giảm dần thì khả năng hòa tan các chất khác cũng giảm. Khi chiết bằng dung môi nồng độ 80% - 96%, độ phân cực giảm dần thì đồng thời khả năng hòa tan các chất cũng giảm, do đó, lượng cặn chiết giảm dần và chỉ có một lượng nhỏ phenolic được hòa tan.

Dựa trên mục tiêu nghiên cứu để ứng dụng trong thực phẩm, ta chọn dung môi ethanol. Vì khả năng chiết của dung môi ethanol đạt giá trị cao nhất tại nồng độ ethanol 60% tương ứng với hàm lượng phenolic là 1,42 mg nên chọn nồng độ ethanol cho các thí nghiệm sau là 60%.

b. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu đến hàm lượng phenolic



Hình 3.8. Biểu đồ ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu đến hàm lượng phenolic

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm, mỗi mẫu lấy khoảng 5g rong đã xay nhỏ để nghiên cứu chiết rút phenolic ở các tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 15/1, 20/1, 25/1, 30/1, 35/1 và 40/1 khác nhau lần lượt là ; nồng độ ethanol là 60% và thực hiện ở trong lò vi sóng với công suất trung bình (400W); vi sóng trong thời gian 60 phút . Tiến hành lọc thu dịch chiết để xác định hàm lượng phenolic, lấy khoảng 10 ml đi cô quay thu cặn chiết.

Nhận xét:

Về hàm lượng phenolic: Tỉ lệ dung môi/nguyên liệu tăng thì hàm lượng phenolic chiết xuất cũng tăng dần. Tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu tăng từ 15/1 đến 35/1 thì hàm lượng phenolic tăng từ 0,66 mgGAE/g lên 1,48 mgGAE/g. Tỉ lệ dung môi/nguyên liệu tăng đến 40/1 thì hàm lượng phenolic tăng không đáng kể.

Về khối lượng cao chiết: Cũng giống với hàm lượng phenolic, khi tỉ lệ dung môi/nguyên liệu tăng thì khối lượng cao chiết cũng tăng. Khối lượng cao chiết tăng rõ rệt từ 5,2 mg lên 8,3 mg khi tỉ lệ dung môi/nguyên liệu từ 15/1 đến 35/1. Tuy nhiên, khi tỉ lệ dung môi/nguyên liệu lên tới 40/1, khối lượng cao chiết thu được tăng không đáng kể so với tỉ lệ 40/1, chỉ được 8,4 mg.

Có thể giải thích kết quả trên như sau:

Tăng tỉ lệ dung môi/nguyên liệu thì phenolic và các chất có trong rong nguyên liệu sẽ hoà tan tốt hơn vào dung môi, bởi lượng dung môi lớn sẽ làm tăng khả năng tiếp xúc của dung môi và chất tan, từ đó làm tăng chênh lệch áp suất thẩm thấu và sự khuếch tán của các chất tan có trong rong ra dung môi chiết, làm cho hàm lượng chất tan và phenolic có trong dịch chiết tăng lên. Tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 15/1, 20/1

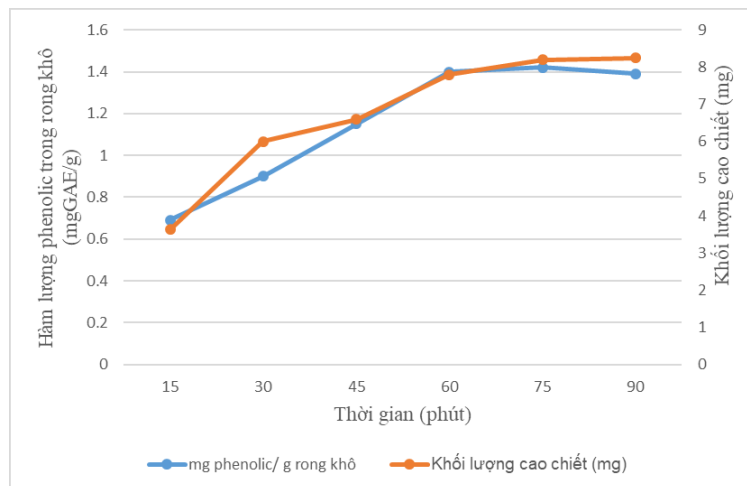
dung môi ít, phenolic khuếch tán ra chưa nhiều nên hàm lượng phenolic chiết được tương ứng với các tỉ lệ này thấp.

Từ tỉ lệ 35/1 - 40/1, tạo ra sự chênh lệch nồng độ lớn nhất, lượng phenolic dịch chuyển qua màng tế bào và thoát ra ngoài nhiều, vì vậy cho hàm lượng phenolic cao nhất. Khi tỉ lệ dung môi/nguyên liệu quá cao sẽ nhanh dẫn đến sự cân bằng pha. Trong dịch chiết còn có nhiều chất hoà tan khác. Do đó, lượng phenolic tăng lên không đáng kể.

Mặc dù với tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 40/1 thu được hàm lượng phenolic và khối lượng cao chiết lớn nhất nhưng tỷ lệ dung môi/nguyên liệu cao sẽ gây tốn kém và khó khăn cho quá trình tinh chế về sau. Mặt khác tại tỉ lệ 35/1 hay 40/1 thì hàm lượng phenolic và khối lượng cao thu được chênh lệch không nhiều. Do đó, xét về yếu tố kinh tế, chọn tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 35/1 cho các thí nghiệm về sau.

c. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng phenolic

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm, mỗi mẫu lấy khoảng 5g rong đã xay nhỏ để nghiên cứu chiết rút phenolic trong khoảng thời gian khác nhau lần lượt là 15, 30, 45, 60, 75, 90 phút với tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 35/1, nồng độ ethanol là 60% và thực hiện ở trong lò vi sóng với công suất trung bình (400W). Tiến hành lọc thu dịch chiết để xác định hàm lượng phenolic, lấy khoảng 10 ml đi cô quay thu cặn chiết.



Hình 3.9. Biểu đồ ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng phenolic

Nhận xét:

Về hàm lượng phenolic: Tăng dần thời gian chiết từ 15 phút đến 60 phút thì phenolic thu được tăng mạnh từ 0,69 mgGAE/g lên tới 1,40 mgGAE/g. Tuy nhiên khi thời gian chiết là 75 phút thì hàm lượng phenolic tăng không đáng kể và đến 90 phút thì hàm lượng giảm xuống còn 1,39 mgGAE/g.

Về khối lượng cặn chiết: Cũng giống như hàm lượng phenolic, khối lượng cao chiết tăng từ 3,63 mg lên 7,8 mg khi tăng thời gian chiết từ 15 phút lên 60 phút. Tuy nhiên, khi thời gian tăng đến 75 phút và 90 phút thì khối lượng cao có tăng nhưng không đáng kể.

Có thể giải thích kết quả trên như sau:

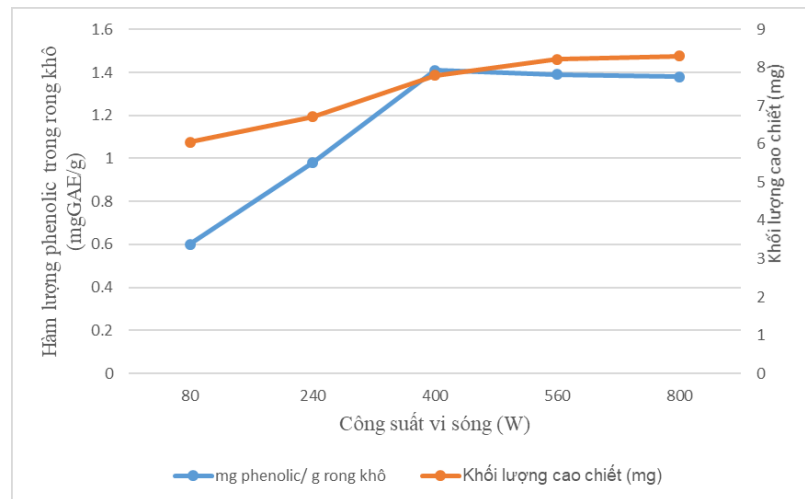
Các chất có phân tử nhỏ thường là hoạt chất hòa tan và khuếch tán vào môi trường nước trong thời gian đầu, sau đó mới là hỗn hợp phenol phân tử lớn. Do đó, khi thời gian chiết quá ngắn thì chưa chiết được hết phenolic. Lượng chất tan trong rong còn rất nhiều.

Kéo dài thời gian chiết dài sẽ tăng thời gian khuếch tán cơ chất ra khỏi rong, giúp dung môi thẩm thấu vào trong tế bào rong qua các mao quản, tăng sự hòa tan và khuếch tán, do đó thu được hàm lượng phenolic cao hơn. Tuy nhiên, phenolic trong rong có mức giới hạn nhất định, nên tăng thời gian chiết thì cũng không thu thêm được phlorotanin cần thiết mà còn lẫn nhiều tạp chất, gây bất lợi cho quá trình tinh chế và bảo quản, tốn kém chi phí và thời gian. Đồng thời, phenolic còn bị phân hủy một phần do nhiều điều kiện khác.

Để tránh làm kéo dài thời gian, gây hao tổn năng lượng và hiệu suất chiết, ta sẽ chọn thời gian chiết thích hợp cho quá trình chiết là 60 phút.

d. Ảnh hưởng của công suất lò vi sóng đến hàm lượng phenolic

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm, mỗi mẫu lấy khoảng 5g rong đã xay nhỏ để nghiên cứu chiết rút phenolic ở trong lò vi sóng với công suất khác nhau lần lượt là: thấp (80W), trung bình thấp (240W), trung bình (400W), trung bình cao (560W), cao (800W), với tỉ lệ dung môi/nguyên liệu 35/1 (v/w), thời gian là 60 phút, nồng độ ethanol là 60%. Tiến hành lọc thu dịch chiết để xác định hàm lượng phenolic, lấy khoảng 10 ml đi cô quay thu cặn chiết. Kết quả thu được thể hiện trong hình sau.



Hình 3.10. Biểu đồ ảnh hưởng của công suất vi sóng đến hàm lượng phenolic

Nhận xét:

Về hàm lượng phenolic: khi tăng công suất lò vi sóng từ mức thấp (80W) lên mức trung bình (400W), hàm lượng phenolic tăng mạnh từ 0,6 mgGAE/g lên 1,41 mgGAE/g và khi công suất lò vi sóng ở mức trung bình (400W) thì thu được hàm lượng phenolic cao nhất là 1,41 mgGAE/g. Tuy nhiên khi tăng công suất lò vi sóng lên mức trung bình cao (560) và mức cao (800W), hàm lượng phenolic giảm xuống 1,39 mgGAE/g và 1,38 mgGAE/g.

Về khối lượng cao chiết: Cũng giống như hàm lượng phenolic, lượng cao chiết tăng từ 6,05 mg lên 7,8 mg khi tăng công suất lò vi sóng từ mức thấp (80W) lên trung bình (400W). Khối lượng cao chiết thu được cao nhất là 8,3 mg ở công suất cao (800W). Tuy nhiên với công suất lò vi sóng ở ba mức là trung bình, trung bình cao và cao thì khối lượng cao chiết thu được chênh lệch nhau không nhiều.

Có thể giải thích kết quả trên như sau:

Ở công suất trung bình (400W), các phân tử của dung môi xáo trộn ma sát với vận tốc rất lớn dưới tác động của điện trường làm cho nhiệt độ dung môi nóng lên, thuận lợi cho việc phá hủy màng tế bào thực vật và tăng tốc độ hòa tan của phenolic. Độ nhớt của dung dịch giảm, tốc độ phản ứng giữa các thành phần hóa học trong rong tăng, dẫn đến tốc độ khuếch tán của các chất tan cũng như phenolic từ bên trong tế bào ra môi trường chiết tăng, đồng thời sự thẩm thấu giữa dung môi và tế bào nguyên liệu cũng tăng. Do đó, hàm lượng phenolic thu được nhiều hơn.

Công suất lò vi sóng càng lớn (tăng đến mức 560W và 800W) thì dung môi nóng càng nhanh, dễ sôi và bay hơi. Tuy nhiên, nhiệt độ tăng cao sẽ xảy ra các phản

ứng không mong muốn. Tốc độ biến tính và phân rã của thành tế bào rong lớn, do tác dụng của nhiệt độ làm đông tụ, chuyển gốc của các lớp màng tế bào như glycoprotein, lipoprotein làm thay đổi cấu trúc tế bào. Phenolic dễ bị phân hủy bởi nhiệt độ nên khi nhiệt độ tăng cao thì hàm lượng phenolic càng giảm.

Từ các kết quả nghiên cứu thu được, ta chọn công suất chiết thích hợp là mức trung bình (400W).

3.3.3. Kết quả tối ưu hóa điều kiện chiết xuất phenolic từ rong nâu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM)

Sau khi khảo sát từng yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thu nhận phenolic ở trên, em sử dụng mô hình tối ưu theo phương pháp Box-behnken cho 4 yếu tố công nghệ với các mức khảo sát được thể hiện như ở bảng sau

Bảng 3.13. Các mức thí nghiệm của các biến công nghệ

Biến thực	Biến mã	Khoảng biến thiên (Δ)	Mức nghiên cứu		
			-1	0	1
Z1: Nồng độ ethanol (%)	A	15	45	60	75
Z2: Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (v/w)	B	10	20	30	40
Z3: Thời gian chiết (phút)	C	30	30	60	90
Z4: Công suất siêu âm (W)	D	160	240	400	560

a. Ảnh hưởng của thông số công nghệ quá trình chiết xuất tới hàm lượng phenolic

Sử dụng phần mềm Design expert 7.0 để xây dựng ma trận kế hoạch thực nghiệm với 27 thí nghiệm theo mô hình của Box-Behnken. Các hàm mục tiêu lần lượt là Y1 (mg GAE/g) Hàm lượng phenolic tổng và Y2 (mg) Khối lượng cao chiết tổng.

Bảng 3.14. Ma trận kế hoạch hóa thực nghiệm của quá trình chiết xuất

TT	Biến mã hóa				Hàm mục tiêu	
	A	B	C	D	Y1 (mg GAE/g)	Y2 (mg)
1	-1	-1	0	0	1.06	4.62
2	+1	-1	0	0	1.18	1.63
3	-1	+1	0	0	1.29	8.61
4	+1	+1	0	0	1.22	3.59
5	0	0	-1	-1	1.23	4.75

6	0	0	+1	-1	0.95	3.53
7	0	0	-1	+1	1.22	6.19
8	0	0	+1	+1	1.25	6.44
9	-1	0	0	-1	1.20	6.01
10	+1	0	0	-1	1.18	2.67
11	-1	0	0	+1	1.31	7.82
12	+1	0	0	+1	1.38	3.24
13	0	-1	-1	0	1.20	2.98
14	0	+1	-1	0	1.26	4.57
15	0	-1	+1	0	0.79	2.04
16	0	+1	+1	0	1.15	8.20
17	-1	0	-1	0	1.11	5.67
18	+1	0	-1	0	1.26	2.31
19	-1	0	+1	0	1.25	7.34
20	+1	0	+1	0	1.12	2.39
21	0	-1	0	-1	1.18	3.17
22	0	+1	0	-1	1.04	5.80
23	0	-1	0	+1	1.01	3.67
24	0	+1	0	+1	1.31	7.89
25	0	0	0	0	1.60	6.82
26	0	0	0	0	1.51	6.89
27	0	0	0	0	1.50	6.85

Sử dụng phần mềm Design expert 7.0 để đánh giá tính tương hợp của mô hình thông qua bảng kết quả phân tích ANOVA như sau:

Bảng 3.15. Bảng kết quả phân tích ANOVA của 2 hàm mục tiêu

Nguồn	Y1 (mg GAE/g)		Y2 (mg)	
	F - Value	P - Value	F - Value	P - Value
Model	10.21	0.0001*	32.27	< 0.0001*
A	0.34	0.5724 ^{NS}	193.43	< 0.0001*
B	12.42	0.0042*	139.0	< 0.0001*
C	10.19	0.0077*	3.97	0.0697 ^{NS}
D	8.91	0.0114*	28.62	0.0002*
AB	1.86	0.1975 ^{NS}	4.03	0.0677 ^{NS}
AC	4.04	0.0674 ^{NS}	2.50	0.1399 ^{NS}
AD	0.25	0.6243 ^{NS}	1.52	0.2413 ^{NS}
BC	4.84	0.0492*	20.64	0.0007*
BD	9.98	0.0082*	2.50	0.1399 ^{NS}
CD	4.96	0.0459*	2.14	0.1696 ^{NS}
A ²	16.62	0.0015*	32.27	0.0001*
B ²	57.78	< 0.0001*	26.84	0.0002*
C ²	51.64	< 0.0001*	28.97	0.0002*
D ²	28.31	0.0002*	6.99	0.0214*
R ²	0.9225		0.9741	
Adj-R ²	0.8807		0.9439	
Adeq-Precision	12.637		19.905	

* $p < 0,05$: Các giá trị có ý nghĩa; ^{NS} $p > 0,05$: các giá trị không có ý nghĩa

Bảng trên biểu diễn các kết quả của ANOVA cho 2 mô hình hồi quy bậc hai (second order regression model) của phenolic chiết tách từ rong quạt với 4 tham số được phân tích. Giá trị p liên quan đến kiểm định F của 2 mô hình ở bảng 3.3.3 có giá trị nhỏ hơn 0,05 (< 0,0001) cho thấy độ tương thích của phương trình hồi quy với thực nghiệm từ đó cho thấy mô hình xây dựng là có ý nghĩa. Trong trường hợp này, các yếu tố A, B, C, D, AD, BC, B² đều có nghĩa ($p < 0.05$). Hệ số xác định R² của mô hình 1 cho biết 92,25% sự biến đổi của hàm lượng phenolic thu được là do ảnh hưởng của các biến độc lập như thời gian chiết, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, nồng độ dung môi, công suất vi sóng và ảnh hưởng giữa các biến thời gian với nồng độ ethanol; tỉ lệ dung môi/nguyên liệu với công suất lò vi sóng, có 7,73% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được gây ra (sai số ngẫu nhiên). Tương tự, với mô hình 2 hệ số R² cho biết 97,41% sự biến đổi của

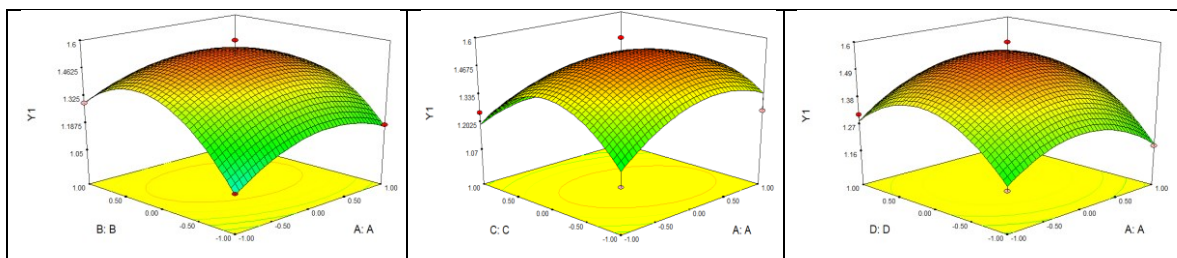
hàm lượng phenolic thu được là do ảnh hưởng của các biến độc lập và ảnh hưởng giữa các biến thời gian với nồng độ ethanol; tỉ lệ dung môi/nguyên liệu với công suất lò vi sóng, chỉ có 2,59% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được gây ra (sai số ngẫu nhiên). Giá trị R^2 của mô hình 1 bằng 0,9225 và mô hình 2 là 0,9741 cho thấy mô hình có tính hội tụ rất cao. Hệ số tương quan R^2 càng gần giá trị 1 thì sai số của thí nghiệm càng nhỏ và tính tương hợp của mô hình càng cao.

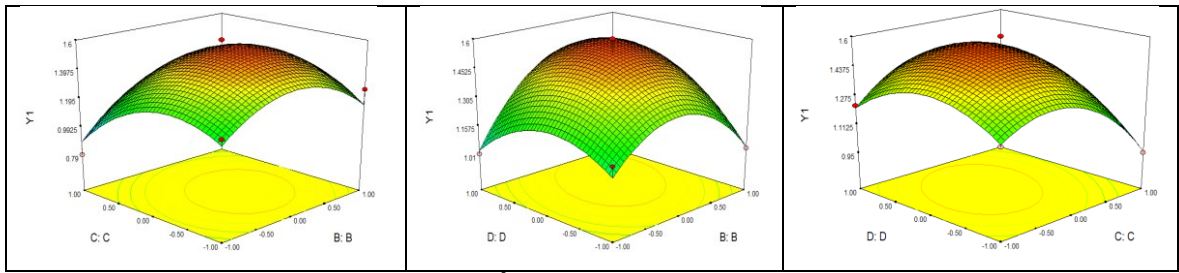
Phương trình hồi quy mô tả mô tả ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ ảnh hưởng đến hàm lượng phenolic tổng và khối lượng cao chiết được xác định sau khi loại bỏ các yếu tố không có ý nghĩa ($p > 0.05$) trong bảng phân tích ANOVA. Phương trình hồi quy của 2 hàm mục tiêu được thể hiện ở bảng sau

Bảng 3.16. Bảng kết quả các hàm mục tiêu Y1, Y2

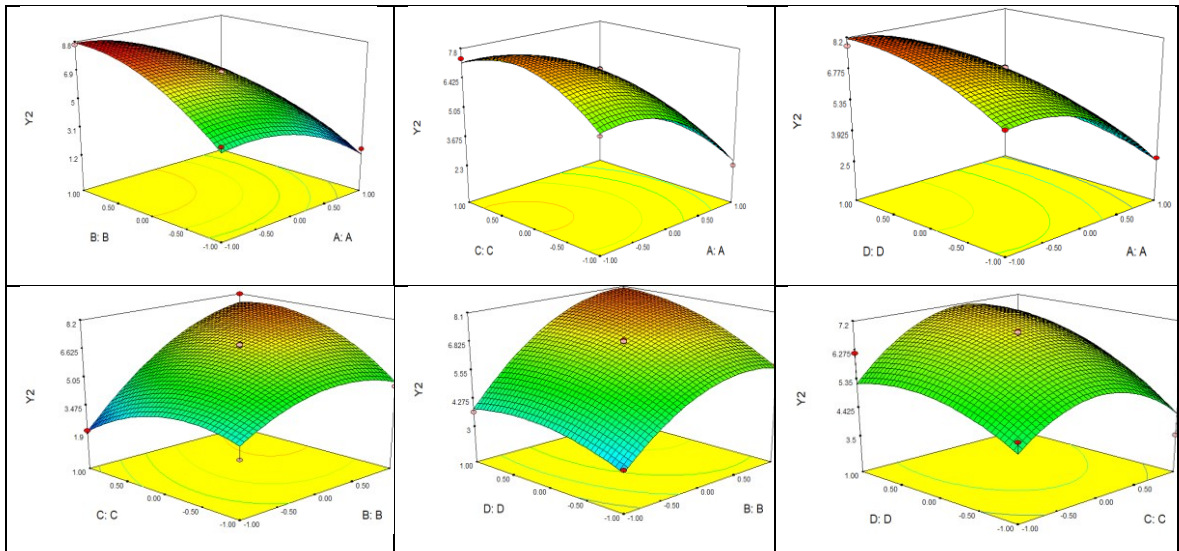
Hàm mục tiêu	Mô tả toán học
Y1	$Y1 = 1.54 + 0.071B - 0.064C + 0.06D + 0.075BC + 0.11BD + 0.077CD - 0.12A^2 - 0.23B^2 - 0.22C^2 - 0.16D^2$
Y2	$Y2 = 6.85 - 2.02A + 1.71B + 0.78D + 1.14BC - 1.24A^2 - 1.13B^2 - 1.17C^2 - 0.58D^2$

Dựa trên mô hình đa thức bậc hai, dữ liệu thử nghiệm được phân tích bằng phần mềm Design Expert 7.0. Ảnh hưởng tương tác đôi của các cặp yếu tố công nghệ tác động lên hàm mục tiêu Y1 và Y2 được thể hiện thông qua các bề mặt đáp ứng như hình 3.3.5 và hình 3.3.6. Trong đó Các trục X và Y của bề mặt đáp ứng đại diện cho hai yếu tố tương tác, lần lượt là: nồng độ dung môi với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu; nồng độ dung môi với thời gian chiết xuất; nồng độ dung môi với công suất vi sóng; tỉ lệ dung môi/nguyên liệu với thời gian chiết; tỉ lệ dung môi/nguyên liệu với công suất vi sóng; thời gian vi sóng với công suất vi sóng. Các trục Z đại diện cho hàm mục tiêu (hàm lượng phenolic; khối lượng cao chiết thu được).





Hình 3.11. Mô hình bề mặt đáp ứng của hàm mục tiêu Y1



Hình 3.12. Mô hình bề mặt đáp ứng của hàm mục tiêu Y2

Phân tích cụ thể từng bề mặt đáp ứng cho thấy các thông số trong phương trình hồi quy của các bề mặt đáp ứng hoàn toàn phù hợp và có ý nghĩa thống kê; mô hình bậc 2 hoàn toàn phù hợp với lý thuyết và thực nghiệm $p < 0,0001 < 0,05$. Các hệ số của mô hình cũng có $p < 0,05$ nên chúng hoàn toàn có ý nghĩa về mặt thống kê và phù hợp với mô hình. Kết quả phân tích dữ liệu và mô hình hóa dưới dạng bề mặt đáp ứng có bề mặt tương tác giữa các yếu tố nồng độ ethanol, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu, thời gian và công suất vi sóng đối với các hàm mục tiêu của quá trình chiết Y1, Y2 thể hiện ở dạng bề mặt với đỉnh cực đại nằm trong miền nghiên cứu các yếu tố tác động.

b. Tối ưu hóa hàm mục tiêu

Tiến hành tối ưu hóa hàm mục tiêu bằng phần mềm Design expert 7.0.. Lựa chọn tối ưu cho hàm Y1 và Y2 đều đạt giá trị lớn nhất với mức độ ưu tiên đều ở mức 3 ta thu được kết quả như bảng sau:

Bảng 3.17. Giá trị biến mã hóa và biến thực tại điều kiện tối ưu

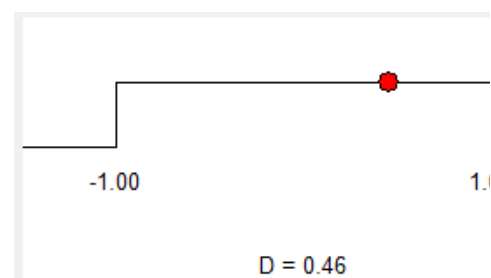
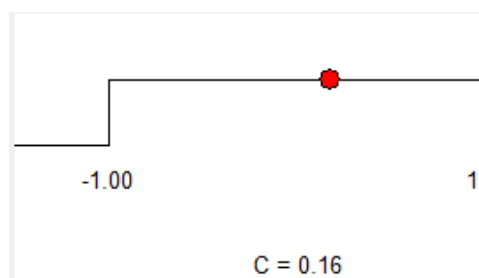
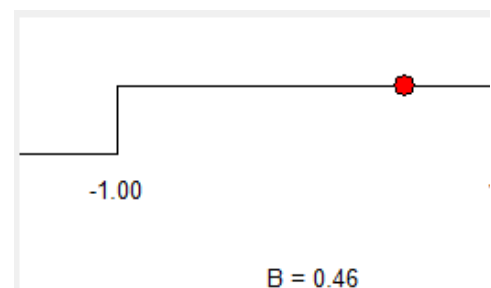
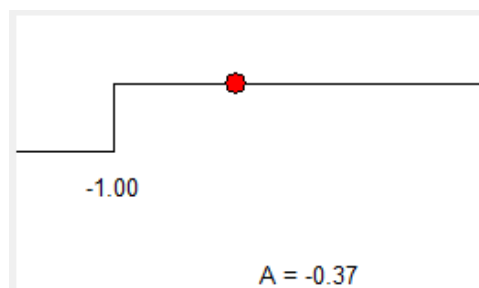
Biến mã hóa				Biến thực			
A	B	C	D	Nồng độ ethanol (%)	Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (v/w)	Thời gian (phút)	Công suất vi sóng (W)
-0,37	0,46	0,16	0,46	54,5	34,6	64,8	473,6

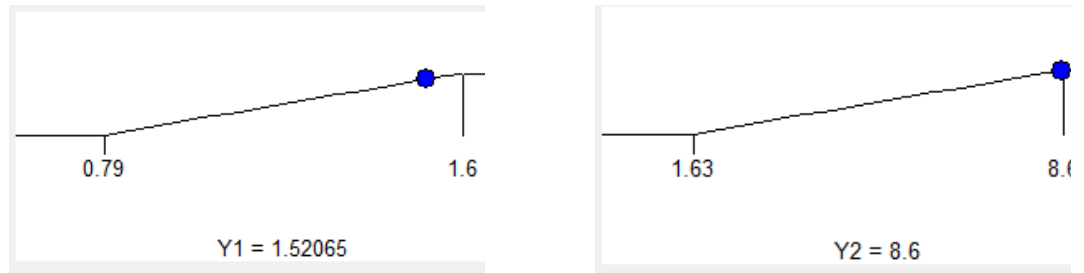
Dữ liệu cho thấy lượng phenolic và cao chiết thu được đạt giá trị lớn với các thông số: Nồng độ ethanol 54,5%; tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 34/6; thời gian chiết xuất 64,8 phút, công suất vi sóng là 473,6W. Để phù hợp điều kiện thực tế, các điều kiện chiết tối ưu được dự đoán như sau: Nồng độ ethanol là 55%; tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 35/1; thời gian chiết là 65 (phút) và công suất lò vi sóng là 475(W).

Tiến hành thực hiện lại 3 thí nghiệm tại điều kiện tối ưu vừa tìm được. Ta thu được các giá trị thực nghiệm của hàm mục tiêu như ở bảng 3.16.

Bảng 3.18. Giá trị các hàm mục tiêu tại điều kiện tối ưu

Hàm mục tiêu	Giá trị	
	Thực nghiệm	Lý thuyết
Y1 (mgGAE/g)	1,50 ± 0,12	1,52
Y2 (mg)	8,52 ± 0.13	8,60





Hình 3.13. Điều kiện tối ưu và kết quả hàm mục tiêu

Kết quả bảng 3.18 và hình 3.13 cho thấy lượng phenolic tối ưu của dịch chiết được dự đoán là 1,52 mgGAE/g, khối lượng cao chiết tối ưu dự đoán là 8,6 mg. Thông số tối ưu của quá trình chiết được dự đoán là: Nồng độ ethanol 54,5%; tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 34,6; thời gian chiết 64,28 phút và công suất máy vi sóng là 473,6W. Thực nghiệm chiết xuất ở điều kiện nồng độ etanol 55%, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu = 35; thời gian chiết 65 phút và công suất lò vi sóng là 640W; Kết quả cho thấy: Hàm lượng phlorotannin thu được là $1,50 \pm 0,12$ mgGAE/g; khối lượng cao chiết là $8,52 \pm 0,11$ mg, chênh lệch không đáng kể so với dự đoán. Như vậy, thực nghiệm cho thấy kết quả thực nghiệm hoàn toàn phù hợp với những phân tích dự đoán từ phần mềm Design expert 7.0.

3.3.4. Đánh giá hoạt chất cao chiết phenolic

02 mẫu cao chiết phenolic (bằng chiết vi sóng và siêu âm) từ rong *P. crassa* đã được đánh giá hoạt tính sinh học bao gồm:

- Hoạt tính chống oxy hóa: Đánh giá bằng thử nghiệm DPPH.
- Khả năng gây độc tế bào: Thử nghiệm với 3 dòng tế bào là tế bào ung thư vú MCF-7, ung thư cổ tử cung HeLa và ung thư tuyến tiền liệt PC3.

Kết quả đánh giá được thể hiện trong Bảng 3.19. và Bảng 3.20.

Bảng 3.19. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của mẫu cao chiết phenolic từ rong *Padina crassa*

TT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ ức chế 50% tế bào (IC ₅₀ , µg/mL)		
		MCF-7	HeLa	PC3
1	Mẫu siêu âm	12.80	27.83	57.40
2	Mẫu vi sóng	12.78	42.68	67.25

Bảng 3.19 cho thấy, 02 mẫu thử nghiệm đều có khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư MCF-7, HeLa và PC3 với giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng 12.78 đến 67.25 µg/ml. Trong số 2 mẫu thử nghiệm, cao chiết rong có siêu âm (rong SA) cho thấy

hoạt tính ức chế 2 dòng tế bào HeLa và PC3 tốt hơn mẫu rong được hỗ trợ vi sóng (rong VS) do có IC₅₀ thấp hơn, cụ thể: tế bào HeLa với 27.83 µg/ml (SA) thấp hơn 42.68 µg/ml (VS); tế bào PC3 cũng tương tự 57.40 µg/ml thấp hơn 67.25 µg/ml. Đối với dòng tế bào ung thư vú MCF-7 thì 2 mẫu có hoạt tính tương đương nhau. Trong thí nghiệm này, hiệu quả ức chế tế bào MCF-7 của *P. crassa* chiết vi sóng tốt hơn so với mẫu rong *Cystoseira sedoides* cũng được chiết vi sóng trong nghiên cứu của Abdelhamid et al., (phần giàu phlorotanin của cao chiết vi sóng có giá trị IC₅₀ là 78 µg/ml, lớn hơn 12.78 µg/ml của mẫu rong vi sóng trong nghiên cứu của chúng tôi).

Bảng 3.20. Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa

STT	Mẫu	SC ₅₀ (µg/mL)
1	Chứng (+) [ascorbic acid]	12.6
2	Chứng (-) [DPPH/EtOH+ DMSO]	-
3	Mẫu vi sóng	683
4	Mẫu siêu âm	590

Bảng 3.20. cho thấy, hoạt tính chống oxy hóa của mẫu thử nghiệm với khả năng trung hòa 50% gốc tự do DPPH (SC₅₀) trong khoảng 590 µg/ml đến 683 µg/ml. So với mẫu kiểm chứng dương (ascorbic acid) thì các giá trị này đều lớn hơn (kiểm chứng dương là 12.6 µg/ml) cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của mẫu thử nghiệm kém hơn acid ascorbic. Giá trị SC₅₀ của mẫu siêu âm xác định được là 590 µg/ml thấp hơn (đồng nghĩa hoạt tính cao hơn) so với mẫu vi sóng (683 µg/ml).

3.4. Nghiên cứu quá trình thu nhận fucoidan

3.4.1. Quy trình công nghệ chiết xuất Fucoidan bằng phương pháp siêu âm

Tiến hành xác định một số thành phần hóa học của rong mơ và bã thải rong mơ trong quy trình sản xuất fucoxanthin để đánh giá chất lượng của bã thải rong mơ.

Bảng 3.21. Thành phần hóa học của rong mơ và bã rong mơ thu hồi trong quá trình sản xuất fucoxanthin

Mẫu	Thành phần hóa học (% tính theo lượng khô của nguyên liệu)				Độ ẩm	Hàm lượng Ca trao đổi mg/g
	Fucoidan	Alginate	Protein	Tro		
Nguyên liệu ban đầu	3,28	32,2	5,1	18,2	8,03	30,6
Bã rong sau chiết etanol	3,06	28,6	3,0	12,9	62,5	28,9

Sau khi chiết fucoxanthin bã rong còn lại hàm lượng alginate, protein và tro giảm không đáng kể do các chất này không tan trong ethanol, vì vậy có thể sử dụng bã rong này để chiết lấy fucoidan và alginate.

Thuyết minh quy trình

Mẫu rong nâu *Sargassum swartzii* được xử lý theo quy trình chiết xuất phlorotanin (mục 3.3.1). Phần còn lại sau khi chiết etyl axetat là hỗn hợp bao gồm phần nước và chất rắn (Hỗn hợp A2) sẽ được xử lý để chiết thu hồi fucoidan.

Bước 1: Hỗn hợp A2 được ly tâm ở tốc độ 9000 vòng/ phút thu được phần chất rắn B1 và phần lỏng C1.

Bước 2: Phần chất rắn B1 được bổ sung nước khử ion theo tỉ lệ 10/1 (ml/g), khuấy đều sau đó siêu âm ở mức công suất 30W/cm² trong 5 phút ở 50⁰C, lọc thu dung dịch; tiến hành lặp lại 2 lần thu được dịch lọc và phần chất rắn A3.

Bước 3: Gom phần dịch lọc, bổ sung CaCl₂ theo tỉ lệ 0,8g/lít, ly tâm được phần chất rắn B2 và phần lỏng C2. Phần chất lỏng C2 được cô cạn còn 1/3 thể tích dưới áp suất giảm. Bổ sung ethanol 96⁰ theo tỉ lệ 7/10 (thể tích/thể tích), ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/ phút thu được phần chất rắn B3.

Bước 4: Phần chất rắn B3 sau khi sấy khô thu được Fucoidan 90%.

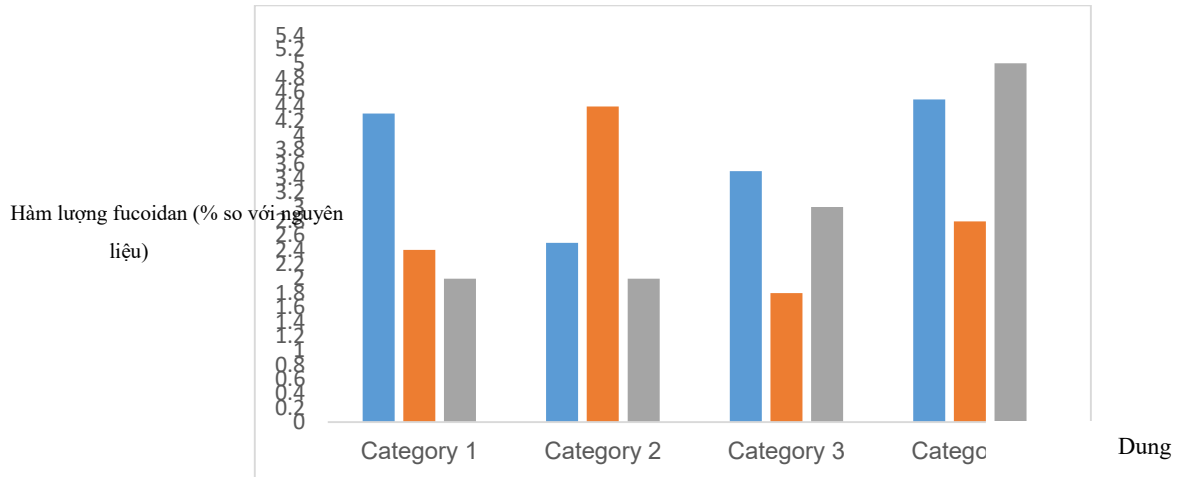


Hình 3.14. Quy trình chiết xuất Fucoidan từ rong nâu

3.4.2. Các yếu tố tác động tới quá trình chiết tách fucoidan

a. Xác định dung môi cho chiết tách fucoidan từ bã rong

Dựa trên các nghiên cứu đã được công bố, chúng tôi tiến hành thí nghiệm khảo sát với: Dung môi HCl 0,1 N (pH 2-3); dung môi là nước khử ion và dung môi CaCl₂ (0,55 kg CaCl₂ / 20 lít).

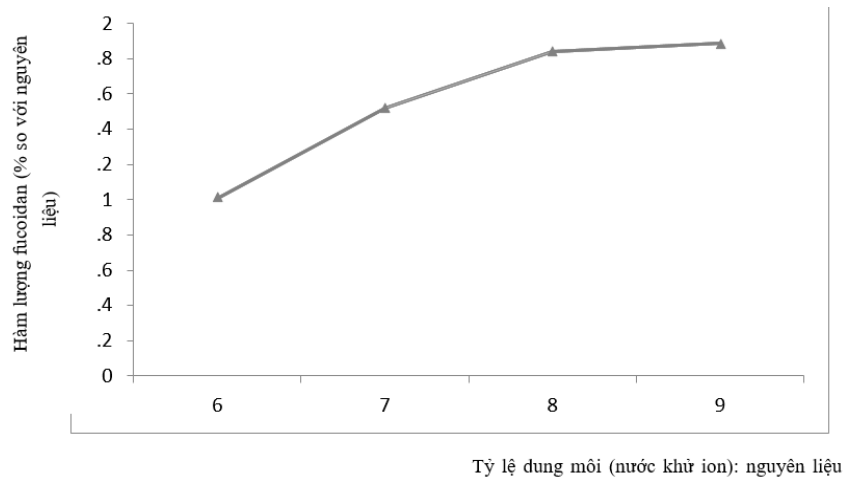


Hình 3.15. Ảnh hưởng của loại dung môi đến hàm lượng fucoidan của dịch chiết

Kết quả cho thấy: Chiết xuất bằng các dung môi khác nhau cho hàm lượng fucoidan thu được khác nhau. Cụ thể, nếu chiết xuất fucoidan từ rong bằng HCl 0,1N thì cho hiệu suất cao nhất ($1,88 \pm 0,06$ % fucoidan so với nguyên liệu), sau đó là nước khử ion ($1,85 \pm 0,05$ % fucoidan) và cuối cùng là dung môi CaCl₂ ($1,06 \pm 0,07$ % fucoidan). Thực nghiệm cũng cho thấy khi chiết tách bằng môi CaCl₂ thì thu được dịch chiết tách trong và dễ lọc, để làm sạch, dịch chiết tách phần lớn là fucoidan, còn axit alginic của nguyên liệu đã chuyển thành alginate calcium kết tủa. Tuy nhiên khi alginate bị kết tủa trong màng tế bào làm ngăn cản quá trình khuếch tán fucoidan. Chính vì vậy, hàm lượng fucoidan thu được không cao, đồng nghĩa với hiệu suất chiết tách fucoidan của dung môi CaCl₂ sẽ thấp.

Kết quả thực nghiệm cho thấy dung môi HCl 0,1N và nước khử ion cho hàm lượng fucoidan của dịch chiết tách lệch nhau không nhiều. Nước khử ion dễ sản xuất, không độc hại, chi phí thấp. Vì thế, nghiên cứu chọn nước khử ion làm dung môi để chiết tách fucoidan của rong mơ bằng sóng siêu âm.

b. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi: nguyên liệu (bã rong mơ) đến khả năng chiết tách Fucoidan bằng sóng siêu âm



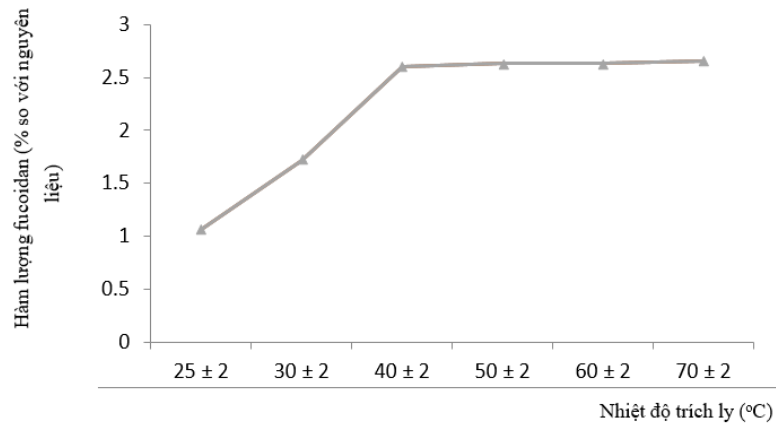
Hình 3.16. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi (nước khử ion) : nguyên liệu đến hàm lượng fucoidan thu được của dịch chiết tách bằng sóng siêu âm

Việc tìm ra tỷ lệ hỗn hợp dung môi là rất cần thiết vì lượng hỗn hợp dung môi sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả chiết tách các chất trong nguyên liệu. Tỷ lệ dung môi nước khử ion/nguyên liệu càng lớn thì hiệu quả chiết tách càng tăng. Có thể thấy với tỷ lệ dung môi tỷ lệ dung môi (nước khử ion): nguyên liệu là 6 (1/kg) thì hàm lượng đạt hiệu quả thấp nhất là $1,01 \pm 0,09$ % fucoidan so với nguyên liệu. Ở tỷ lệ dung môi nước khử ion: nguyên liệu là 7 (1/kg) thì hàm lượng có sự tăng lên rõ rệt đạt hiệu quả tương đối cao là $1,52 \pm 0,07$ % fucoidan so với nguyên liệu. Hiệu quả cao nhất ở tỷ lệ nước khử ion: nguyên liệu là 8 và 9 (1/kg) tương ứng là $1,84 \pm 0,06$ và $1,89 \pm 0,05$ % fucoidan so với nguyên liệu, ở 2 tỷ lệ dung môi nước khử ion: nguyên liệu này cho hàm lượng fucoidan thu được không có sai khác nhiều.

Thực nghiệm cho thấy tỷ lệ dung môi: nguyên liệu là 8 (1/kg) phù hợp để chiết xuất fucoidan từ bã rong nâu bằng sóng siêu âm, giúp đảm bảo hiệu suất quy trình cũng như tối ưu hiệu quả kinh tế (giảm chi phí nguyên liệu, năng lượng...).

c. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng chiết tách fucoidan bằng sóng siêu âm

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết tách fucoidan ở các mức 25, 30, 40, 50, 60 và 70°C. Kết quả được thể hiện ở hình sau.

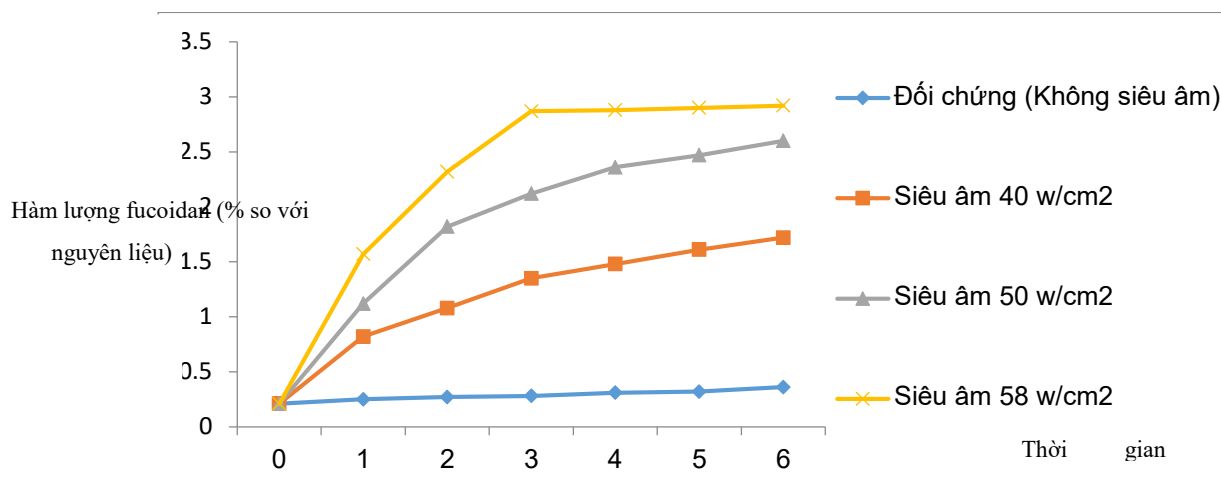


Hình 3.17. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tách đến hàm lượng fucoidan của dịch chiết tách rong mơ bằng sóng siêu âm

Kết quả phân tích ở Hình 3.17. cho thấy khi nhiệt độ tăng, hàm lượng fucoidan thu được ở dịch chiết tăng. Ở các nhiệt độ khảo sát cho hàm lượng fucoidan thu được lần lượt là: $1,08 \pm 0,03$; $1,75 \pm 0,06$; $2,62 \pm 0,04$; $2,64 \pm 0,02$; $2,64 \pm 0,07$ và $2,66 \pm 0,05$ % fucoidan so với nguyên liệu. Do khả năng hòa tan của các chất trong dung dịch, nhất là các polysaccharide hoàn toàn phụ thuộc vào nhiệt độ. Hơn nữa, fucoidan nằm trong cấu trúc trong mà cấu trúc bên ngoài là lớp cellulose, pectin, polysaccharide không tan. Vì vậy, cần xử lý nhiệt độ cao để phá vỡ lớp màng, cũng như làm hòa tan các polysaccharide trong đó có fucoidan. Khi tăng nhiệt độ bằng sóng siêu âm từ 25°C lên 40°C , lượng fucoidan thu được cũng tăng lên. Tuy nhiên, khi nhiệt tăng từ 40 lên đến 70°C thì lượng fucoidan thu được bắt đầu tăng chậm, mức độ chênh lệch ở các mức nhiệt 40°C , 50°C , 60°C , 70°C là không nhiều. Nếu sản xuất lớn mà khoảng nhiệt độ chênh lệch giữa 50°C , 60°C với 70°C thì sẽ ảnh hưởng tới giá thành sản phẩm trong khi chênh lệch lượng fucoidan thu được là không đáng kể. Vì vậy, nhiệt độ 40°C là thích hợp cho chiết tách fucoidan từ bã rong bằng sóng siêu âm.

d. Ảnh hưởng của thời gian và cường độ sóng siêu âm đến khả năng chiết tách fucoidan

Thời gian chiết ảnh hưởng rất lớn tới chất lượng và hiệu quả chiết tách. Nếu kéo dài đến một thời gian nào đó hàm lượng hoạt chất trong dịch chiết không tăng nhưng sẽ tăng tỷ lệ tạp chất khuếch tán vào dịch chiết. Kết quả thu được như bảng và đồ thị sau:



Hình 3.18. Ảnh hưởng của thời gian và cường độ sóng siêu âm đến hàm lượng fucoxanthin của dịch chiết tách bã rong nâu

Kết quả trình bày (Hình 3.18.) cho thấy:

- Chiết tách không sử dụng sóng siêu âm (đối chứng), khi điều chỉnh với thời gian chiết tách theo thứ tự 0, 1, 2, 3, 4, 5 và 6 phút cho dịch chiết tách có hàm lượng fucoxanthin lần lượt tương ứng $0,22 \pm 0,03$; $0,25 \pm 0,04$; $0,27 \pm 0,05$; $0,28 \pm 0,03$; $0,31 \pm 0,03$; $0,33 \pm 0,05$ và $0,36 \pm 0,05$ % fucoxanthin so với nguyên liệu.

- Chiết tách với phương pháp sóng siêu âm (20 KHZ), khi điều chỉnh với thời gian chiết tách theo thứ tự 1, 2, 3, 4, 5 và 6 phút, ở cường độ siêu âm:

+ Cường độ 40 w/cm^2 , fucoxanthin tăng lần lượt tương ứng là: $0,21 \pm 0,04$; $0,82 \pm 0,05$; $1,08 \pm 0,06$; $1,35 \pm 0,07$; $1,48 \pm 0,04$; $1,61 \pm 0,05$ và $1,72 \pm 0,06$ % fucoxanthin trong dịch chiết tách so với nguyên liệu.

+ Cường độ 50 w/cm^2 , fucoxanthin tăng lần lượt tương ứng là: $0,21 \pm 0,04$; $1,12 \pm 0,06$; $1,82 \pm 0,04$; $2,124 \pm 0,05$; $2,36 \pm 0,04$; $2,47 \pm 0,07$ và $2,60 \pm 0,04$ % fucoxanthin trong dịch chiết tách so với nguyên liệu .

+ Cường độ 58 w/cm^2 , thời gian siêu âm 0, 1, 2 và 3 phút, siêu âm cho fucoxanthin tăng tương ứng là $0,21 \pm 0,04$; $1,57 \pm 0,05$; $2,32 \pm 0,05$ và $2,87 \pm 0,04$ % fucoxanthin, sau 4; 5 và 6 phút siêu âm chiết tách cho thấy fucoxanthin vẫn tăng, nhưng tăng không đáng kể, tương ứng là $2,88 \pm 0,05$; $2,90 \pm 0,03$ và $2,92 \pm 0,06$ % fucoxanthin trong dịch chiết tách so với nguyên liệu.

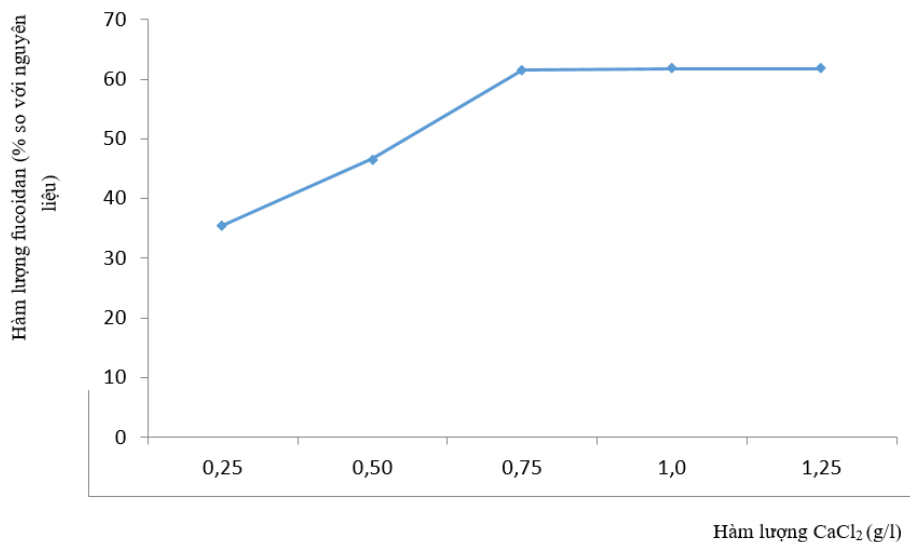
Phân tích các kết quả cho thấy: Khi cường độ và thời gian siêu âm tăng thì khả năng chiết tách fucoxanthin tăng cao (fucoxanthin ở dịch chiết tách không sử dụng sóng siêu âm là thấp nhất). Kết quả ở cùng thời gian chiết tách cho thấy cường độ siêu âm là 58 w/cm^2 đạt hiệu suất chiết fucoxanthin cao nhất. Cùng thời gian 3 phút ở cường độ

siêu âm 0, 40, 50 và 58 w/cm² cho kết quả chiết là $0,28 \pm 0,06$; $2,12 \pm 0,05$ và $2,87 \pm 0,04$ % fucoidan. Có thể giải thích là do cường độ siêu âm càng cao sẽ càng tăng hiện tượng sủi bọt tạo lực phá vỡ cao, làm tăng tốc độ truyền khối của chất chiết tách, tạo sự khuấy trộn giúp cho khuếch tán chất bên trong nguyên liệu ra ngoài dễ dàng hơn. Tuy nhiên, kéo dài thời gian chiết cũng làm tăng các tạp chất hòa tan vào dung môi chiết tách.

Kết quả nghiên cứu cho thấy sử dụng cường độ siêu âm 58 w/cm², thời gian 3 phút là phù hợp nhất để chiết tách fucoidan từ bã rong.

e. Ảnh hưởng của hàm lượng CaCl₂ đến độ sạch fucoidan

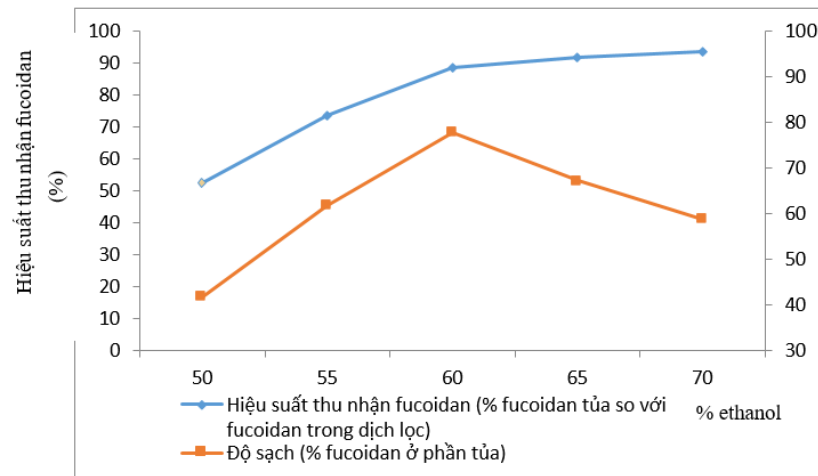
Dịch chiết tách fucoidan còn có một lượng axit alginic. Vì vậy, để làm sạch fucoidan ở đây tiến hành khảo sát hàm lượng CaCl₂ tủa loại bỏ axit alginic ra khỏi dịch chiết tách. Thực nghiệm khảo sát ở các hàm lượng 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 và 1,25 gam CaCl₂/lít dịch trích fucoidan. Kết quả được thể hiện qua Hình 3.16.



Hình 3.19. Ảnh hưởng của hàm lượng CaCl₂ tủa axit alginic trong dịch chiết tách đến độ sạch fucoidan thu nhận được

Kết quả ở Hình 3.19 cho thấy hàm lượng CaCl₂ càng cao thì cho fucoidan thu được có độ sạch tăng. Ở nồng độ 0,25; 0,5 và 0,75 g CaCl₂/lít dịch chiết tách cho kết quả lần lượt là $35,6 \pm 2,3$; $46,7 \pm 3,5$ và $61,6 \pm 2,7$ % fucoidan của chất khô hòa tan. Ở nồng độ 1,00 và 1,25 g CaCl₂/lít dịch chiết tách, hàm lượng fucoidan tăng không đáng kể, lần lượt là $61,8 \pm 3,8$ và $61,7 \pm 4,1$ % fucoidan của chất khô hòa tan thu được. Điều này cho thấy ở hàm lượng 0,75 g CaCl₂/lít dịch chiết tách đã kết tủa axit alginic trong dịch chiết tách được loại ra là lớn nhất. Vì thế, kết quả chọn hàm lượng CaCl₂ để tủa axit alginic trong dịch chiết tách là 0,75 g CaCl₂/lít dịch chiết tách.

f. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến khả năng kết tủa thu nhận fucoidan từ dịch lọc fucoidan



Hình 3.20. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến độ sạch (% fucoidan ở phần tủa) và hiệu suất thu nhận fucoidan (% fucoidan tủa so với fucoidan trong dịch lọc)

Fucoidan có khả năng kết tủa bằng dung môi hữu cơ khác nhau như: methanol, ethanol, aceton... Do ethanol phổ biến và rẻ tiền và cũng đạt hiệu thu hồi khá cao nên chúng tôi chọn ethanol là dung môi kết tủa thu hồi hoạt chất fucoidan. Nguyên lý của quá trình kết tủa bằng ethanol là một dung môi phân cực rất háo nước, khi cho ethanol vào dung dịch chứa các polysaccaride thì nó sẽ cạnh tranh nước với các polysaccaride này làm cho chúng không còn liên kết được với nước nữa, nên tách riêng ra và lắng xuống đáy. Mà khi cho cồn vào dịch lọc fucoidan với tỷ lệ ethanol phù hợp thì fucoidan sẽ tủa, laminaran sẽ lẫn trong dịch còn sẽ được tách ra. Khả năng tủa fucoidan từ dịch chiết còn phụ thuộc vào nồng độ dung môi, do đó cần phải xác định nồng độ của ethanol để đạt hiệu quả tủa cao nhất. Do đó nghiên cứu ở đây tiến hành thực nghiệm khảo sát với các nồng độ dung môi: 50; 55; 60; 65 và 70 % ethanol.

Kết quả ở Hình 3.20 cho thấy nồng độ dung môi càng cao thì hiệu suất thu nhận fucoidan ở phần tủa càng lớn, nồng độ ethanol tăng từ 50; 55; 60; 65 và 70 % cho hiệu suất thu nhận fucoidan (% fucoidan tủa so với fucoidan trong dịch lọc) tăng tương ứng lần lượt là: $52,7 \pm 3,4$; $73,7 \pm 2,8$; $88,7 \pm 1,7$; $91,7 \pm 2,9$ và $93,8 \pm 3,1$ % fucoidan tủa so với fucoidan trong dịch lọc. Trong khi độ sạch ở phần tủa tăng từ nồng độ 60; 65 và 70 % ethanol tương ứng theo thứ tự là $41,8 \pm 4,8$; $61,8 \pm 3,5$ và $77,8 \pm 2,7$ % fucoidan ở phần tủa, khi nồng độ ethanol tiếp tục tăng từ 60 lên 65 và

70 % ethanol thì độ sạch giảm dần tương ứng là $77,8 \pm 2,7$; $67,2 \pm 4,1$ và $58,8 \pm 3,8$ % fucoidan ở phần tủa, cũng cho thấy hiệu suất thu nhận fucoidan ở nồng độ 60 % ethanol so với ở nồng độ 65 và 70 % ethanol tăng không đáng kể. Vì thế nồng độ 60 % ethanol là thích hợp để tủa thu hồi hoạt chất fucoidan từ dịch lọc.

3.5. Kết quả nghiên cứu chiết xuất alginate từ rong nâu

Xác định thành phần hóa học của rong nâu và bã rong nâu sau khi chiết tách fucoidan

Để đánh giá chất lượng của bã thải rong nâu chúng tôi tiến hành xác định một số thành phần hóa học của rong mơ và bã thải rong mơ sau quy trình sản xuất fucoidan.

Bảng 3.22. Thành phần hóa học của rong mơ và bã thải rong mơ trong quá trình sản xuất fucoxanthin

Mẫu	Thành phần hóa học (% tính theo lượng khô của nguyên liệu)			Độ ẩm	Hàm lượng Ca trao đổi mg/g
	Alginate	Protein	Tro		
Rong mơ	31,9	5,2	18,2	8,12	30,5
Bã rong mơ sau khi chiết tách fucoidan	29,5	1,6	11,8	65,2	18,5

Do nguyên liệu bã thải rong này khác với rong ban đầu ở chỗ đã được chiết tách bằng ethanol 96° và chiết tách bằng nước do đó bã thải rong đã được loại fucoxanthin, lipid, phlorotanin, chất màu, fucoidan, một số ion kim loại...chính vì vậy mà bã thải này có màng cellulose bị bào mòn và các liên kết màng tế bào chứa alginate cũng như tế bào bên ngoài rong bị phá vỡ và trên cơ sở số liệu thành phần bã rong mơ ở Bảng 3.20, để tăng hiệu quả chiết tách alginate cần phải lấy toàn bộ các ion kim loại hóa trị hai và đa hóa trị. Vì vậy, điều kiện thiết kế được chọn để nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ HCl đến hiệu suất chiết tách, vì nếu nồng độ HCl không đủ để tách các ion kim loại thì quá trình chiết tách với Na_2CO_3 chỉ hòa tan các axit alginic còn các alginate kim loại chưa chuyển hóa vẫn nằm lại làm quá trình chiết tách không triệt để.

3.5.1. Quy trình công nghệ chiết xuất alginate từ rong mơ theo phương pháp tích hợp enzyme và siêu âm

Thuyết minh quy trình

Mẫu rong nâu *Sargassum swartzii* được xử lý theo quy trình chiết xuất phlorotanin (mục 3.3.1) và fucoidan (mục 3.4.1). Phần pha rắn B2 sẽ được xử lý để chiết alginate.

Bước 1: Phần pha rắn B2 được bổ sung enzyme phân giải xenlulozơ có nguồn gốc từ chủng nấm men *Aspergillus aculeatus* (Enzyme Viscozyme L) theo tỉ lệ 0,06% (enzyme/ cơ chất) tại pH 5-6, tiến hành trong 40 phút ở nhiệt độ 40-42⁰C sau đó hạ nhiệt độ hỗn hợp về nhiệt độ phòng. Sau khi xử lý Enzyme, ta thu được bã rắn 3.

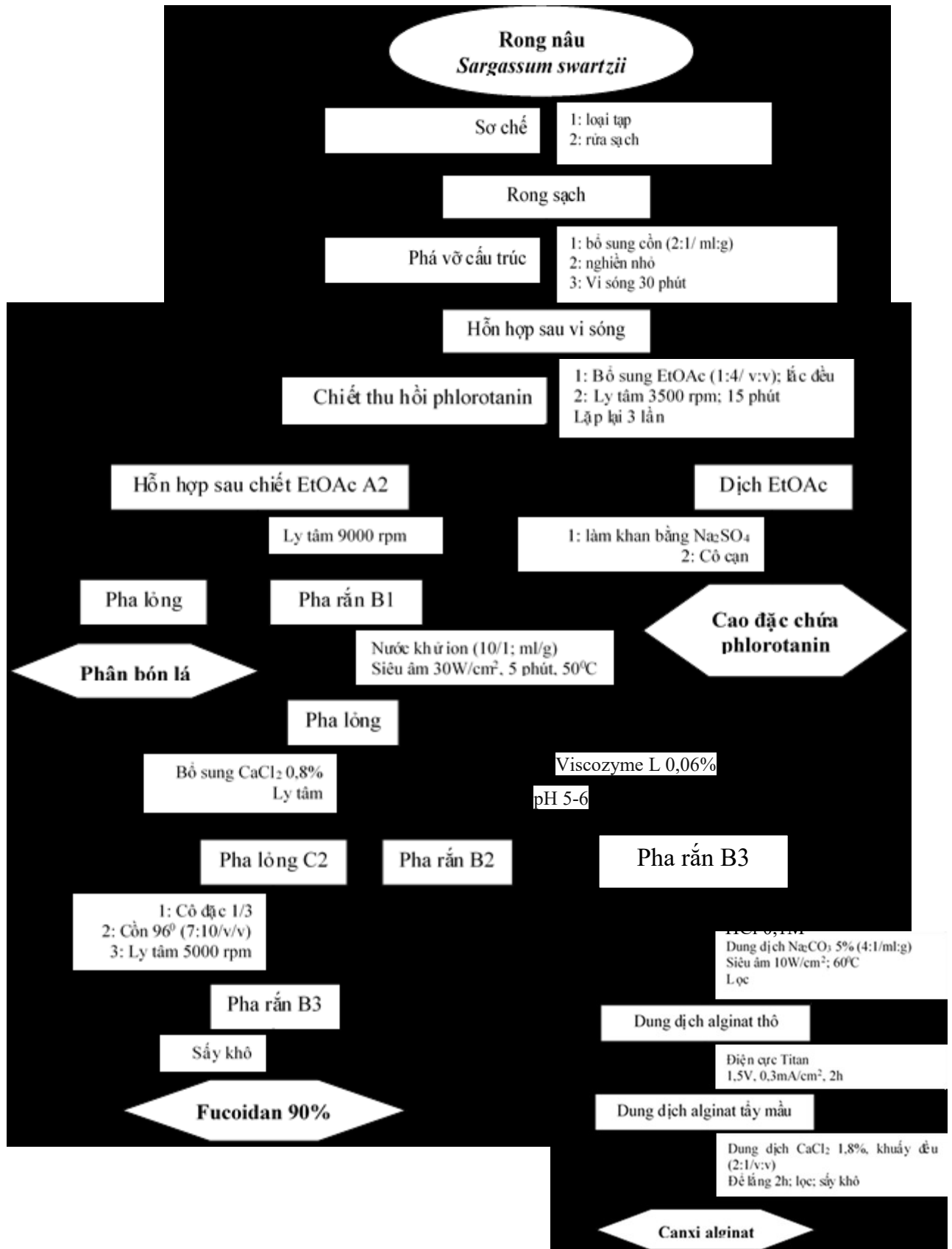
Bước 2: Bã rắn 3 được ngâm trong dung dịch HCl 0,1M theo tỉ 1/2 (m/v), siêu âm 3 phút, ngâm trong 10 phút sau đó lọc thu dịch thải 1 và bã rắn, bã rắn đem rửa lại với nước đến pH = 5,5 – 6. Sau đó tiếp tục bổ sung dung dịch Na₂CO₃ theo tỉ lệ 1/5 (m/m) sau đó siêu âm trong 30 phút ở 60⁰C, sau đó khuấy tiếp 10 phút rồi tiến hành lọc ta thu được bã thải làm nguyên liệu sản xuất phân bón và dịch lọc 3.

Bước 3: Dịch lọc 3 được bổ sung dung dịch CaCl₂ 10% (tỉ lệ CaCl₂ khan/chất tan là 2/1) một cách từ từ có kèm siêu âm và khuấy mạnh. Kết thúc quá trình rót để yên trong 3h sau đó tiến hành lọc thu dịch thải 2 và gel alginate thô.

Bước 4: Gel alginate thô được bổ sung dung dịch H₂O₂ 6% (1/3; khối lượng alginate khô/khối lượng dung dịch H₂O₂), để yên trong 30 phút sau đó lọc và rửa lại bằng nước 3 lần ta thu được gel alginate trắng. Sấy khô ở 45⁰C dưới áp suất giảm thu được bột alginate màu trắng.

Bảng 3.23. Kết quả sản xuất thử nghiệm các mẻ ở các quy mô thí nghiệm khác nhau

Sản phẩm	100g	200g	500g
Alginate (g)	4,5 ± 0,18	8,8 ± 0,34	21,5 ± 0,72



Hình 3.21. Quy trình chiết xuất alginate từ rong nâu

3.5.2. Kết quả nghiên cứu quá trình thủy phân rong biển bởi enzyme

Bốn dãy thí nghiệm sau đây đã được thực hiện để khảo sát tác động của việc xử lý nguyên liệu với enzyme lên quá trình, đồng thời để chọn ra phương thức xử lý nguyên liệu thích hợp nhất:

- Dãy thí nghiệm 1: Nguyên liệu rong nâu thô không qua xử lý ban đầu được chiết tách alginate theo quy trình thông thường.

- Dãy thí nghiệm 2: Nguyên liệu rong nâu thô được xử lý với enzyme Htec2 sau đó được chiết tách alginate.

- Dãy thí nghiệm 3: Nguyên liệu rong nâu sau khi đã được chiết tách các hợp chất thứ cấp, phần bã rắn còn lại được đem chiết tách alginate.

- Dãy thí nghiệm 4: Nguyên liệu rong nâu sau khi được chiết các hợp chất thứ cấp, xử lý với enzyme Htec2 rồi đem chiết tách alginate.

Các thông số sau đây được xác định trong mỗi thực nghiệm:

- Hàm lượng đường khử trong nguyên liệu sau khi xử lý enzyme ($\mu\text{g/ml}$).

- Hàm lượng alginate thu được % tính trên khối lượng nguyên liệu khô tuyệt đối.

- Độ nhớt alginate thu được

Thông số đầu dùng để đánh giá tác động của enzyme lên mức độ thủy phân thành tế bào của nguyên liệu. Hai thông số còn lại được sử dụng để đánh giá hiệu quả và chất lượng của sản phẩm khi sử dụng phương pháp kết hợp với thủy phân bởi enzyme.

3.3.2.1. Tác động của việc xử lý nguyên liệu với enzyme lên hiệu suất thu hồi các chất chống oxi hóa và mức độ thủy phân các chất nền

Các kết quả thu được về tác động của việc xử lý nguyên liệu với enzyme lên hiệu suất thu hồi alginate được trình bày trên Bảng 3.3.7

Bảng 3.24. Kết quả khảo sát tác động của việc xử lý nguyên liệu với enzyme lên mức độ thủy phân thành tế bào và hiệu suất thu hồi chất chống oxi hóa

Enzyme	Đường khử ($\mu\text{g/ml}$)	Alginate (%)	Độ nhớt (1%) (mPa.S)
Đối chứng	0	51,43 \pm 0,24	235
Rong thô + enzyme	27,13 \pm 0,32	59,21 \pm 0,21	230
Rong đã chiết	0	63,32 \pm 0,15	238
Rong đã chiết + enzyme	55,25 \pm 0,24	75,01 \pm 0,24	233

Các kết quả nêu trên cho thấy quá trình tiền xử lý nguyên liệu bằng enzyme đã làm tăng đáng kể hiệu suất thu hồi alginate. Sự gia tăng của hiệu suất có tương quan tỉ lệ thuận với sự gia tăng của hàm lượng đường khử (khi sử dụng enzyme). Mặt khác, quá trình chiết xuất các hợp chất thứ cấp bằng etanol đã tạo điều kiện giúp enzyme xâm nhập và thủy phân tốt hơn các cellulose có trong mẫu rong biển thể hiện ở các giá trị thu hồi alginate. Ngoài ra, các quá trình chiết xuất hợp chất thứ cấp và sử dụng enzyme không làm thay đổi cấu trúc của alginate thể hiện ở giá trị độ nhớt của mẫu alginate ở 1% không có sự khác biệt rõ rệt.

3.3.2.2. *Khảo sát các yếu tố tác động tới quá trình thủy phân rong biển bởi enzyme*

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH

Chúng tôi thực hiện 7 thí nghiệm khảo sát trong vùng pH từ 3 - 8 sử dụng hệ đệm thích hợp, giữ cố định các điều kiện khác như tỷ lệ nguyên liệu/nước 1:5, nhiệt độ 45°C, thời gian thủy phân 6 h. Các kết quả thu được thể hiện trong Bảng sau.

Bảng 3.25. Biểu diễn ảnh hưởng của của pH lên hàm lượng đường khử

Thí nghiệm	pH	Hàm lượng đường khử
1	3,5	43,5
2	4,0	48,9
3	4,5	55,3
4	5,0	62,1
5	5,5	52,8
6	6,0	46,7

Độ pH của môi trường phản ứng là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme trong quá trình thủy phân, mỗi enzyme có một khoảng hoạt động tối thích riêng. Enzyme Htec2 theo khuyến cáo của nhà sản xuất hoạt động tốt nhất trong khoảng pH 4,5 - 5,5. Trong các thí nghiệm khảo sát này, pH được xác định tối ưu ở 5.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân thể hiện trong Hình 4.8b cho thấy, nhiệt độ càng tăng hiệu quả thủy phân càng cao và đạt cực đại ở 45°C, nếu tiếp tục tăng nhiệt độ đến 50 - 55°C thì hiệu quả thủy phân có xu hướng giảm.

Bảng 3.26. Biểu diễn ảnh hưởng của của nhiệt độ lên hàm lượng đường khử

Thí nghiệm	Nhiệt độ	Hàm lượng đường khử
1	30	33,5
2	35	42,2
3	40	54,6
4	45	64,4
5	50	59,2
6	55	50,7
7	60	41,5

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme/cơ chất

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme /cơ chất cho thấy khi nồng độ enzyme càng tăng hiệu quả thủy phân càng cao, có nghĩa là lượng đường khử tạo thành càng nhiều và đạt cực đại tại nồng độ Htec2/cơ chất là 1,5%.

Bảng 3.27. Biểu diễn ảnh hưởng của tỷ lệ E/S lên hàm lượng đường khử

Thí nghiệm	Tỷ lệ E/S	Hàm lượng đường khử
1	0,50	36,7
2	0,75	45,4
3	1,00	58,5
4	1,25	65,2
5	1,50	68,4
6	1,75	62,1
7	2,00	57,2

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian xử lý

Ta có thể nhận thấy, khi tăng thời gian thủy phân từ 2 đến 6h, hàm lượng đường khử có sự tăng mạnh chứng tỏ quá trình thủy phân diễn ra mạnh mẽ; trong khoảng thời gian từ 6-8h, quá trình thủy phân có sự gia tăng không đáng kể hàm lượng đường khử; kéo dài thời gian lại làm cho quá trình thủy phân có xu hướng giảm. Kết quả được biểu diễn trên bảng sau:

Bảng 3.28. Biểu diễn ảnh hưởng của thời gian lên hàm lượng đường khử

Thí nghiệm	Thời gian (h)	Hàm lượng đường khử
1	2	28, 6
2	4	48, 8

3	6	76,9
4	8	78,1
5	10	67,8
6	12	61,2

Nhận xét chung:

Các kết quả nêu trên cho thấy các điều kiện sau đây là tốt nhất cho quá trình phân giải cellulose thành tế bào bằng enzyme Htec2:

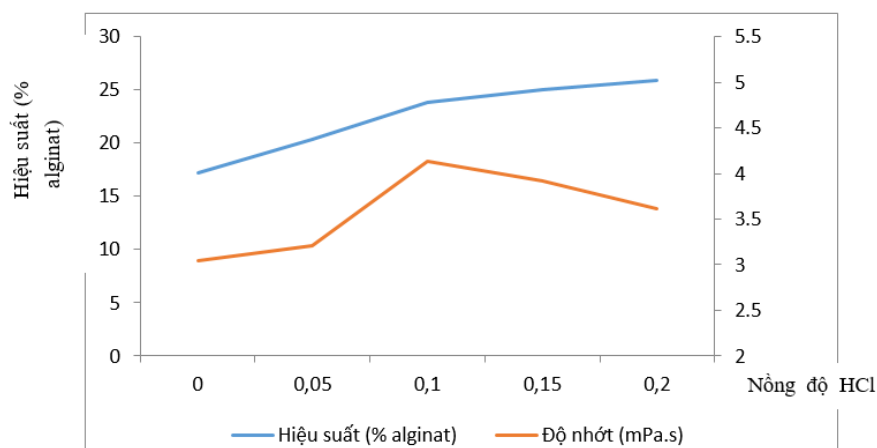
- pH = 4,5 - 5,0
- Nhiệt độ thủy phân: 45°C
- Nồng độ Htec2/cơ chất là 1,5%
- Thời gian thủy phân: 6-8 giờ

3.5.3. Nghiên cứu quá trình thu nhận alginate

3.5.3.1. Các yếu tố tác động đến quá trình chiết tách alginate

a. Ảnh hưởng của nồng độ HCl xử lý bã rong đến hiệu suất chiết tách alginate từ bã rong mơ

Kết quả ở Hình 3.11 cho thấy, khi tăng nồng độ HCl từ 0,0 (đối chứng) lên lần lượt là 0,05 M; 0,1 M; 0,15 M và 0,2 M thì hiệu suất chiết tách tăng tương ứng từ $17,21 \pm 1,37$; $20,34 \pm 1,38$; $23,87 \pm 0,94$; $25,01 \pm 1,09$ và $25,94 \pm 1,22$ % alginate. Nguyên nhân do bã rong được xử lý bằng HCl, phản ứng trao đổi ion xảy ra, chuyển alginate từ dạng muối không tan (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} ...) sang dạng axit alginic sẽ giúp thuận lợi cho việc chiết tách trong dung dịch kiềm chuyển thành muối alginate dạng tan được trong nước. Với rong đã xử lý qua acid, khi chiết xuất bằng kiềm với một tỷ lệ thích hợp, phản ứng trao đổi ion xảy ra gần như hoàn toàn.

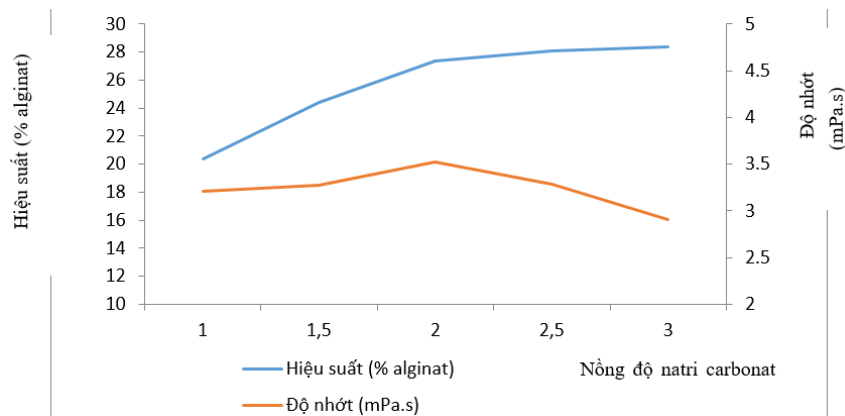


Hình 3.22. Ảnh hưởng của nồng độ HCl xử lý bã rong mơ tới hiệu suất và độ nhớt alginate chiết tách từ rong mơ bằng sóng siêu âm

Khi tăng nồng độ HCl từ 0 lên 0,05 M và 0,1 M thì độ nhớt cũng tăng lên, độ nhớt thu được tăng tương ứng là: $3,04 \pm 0,07$; $3,21 \pm 0,04$ và $4,14 \pm 0,05$ mPa.s. Ở nồng độ HCl 0,1 M, phản ứng xảy ra triệt để và hiệu suất chiết tách alginate cao hơn. Tuy nhiên khi tăng nồng độ HCl lên 0,15 M và 0,2 M cho hiệu suất chiết tách alginate được cao, nhưng độ nhớt lại giảm tương ứng là $3,92 \pm 0,07$ và $3,61 \pm 0,03$ mPa.s, do liên kết glucosid bị phá hủy, alginate phân tử lớn bị cắt mạch nhiều làm giảm độ nhớt.

Như vậy với nồng độ HCl 0,1 M được chọn để xử lý bã rong ở 25°C.

b. Ảnh hưởng của nồng độ natri carbonat đến hiệu suất chiết tách alginate từ bã rong bằng sóng siêu âm



Hình 3.23. Ảnh hưởng của nồng độ natri carbonat tới hiệu suất và độ nhớt alginate chiết tách từ rong mơ bằng sóng siêu âm

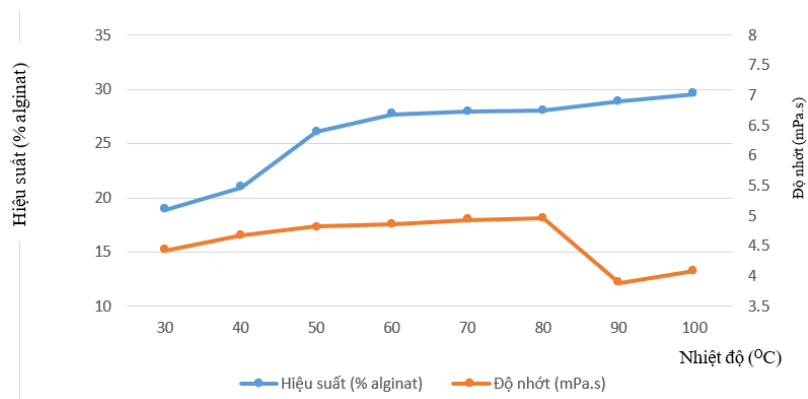
Kết quả ở Hình 3.23 cho thấy khi tăng nồng độ natri carbonat từ 1; 1,5; 2,0; 2,5 lên đến 3,0%, hiệu suất chiết tách alginate tăng tương ứng từ $20,34 \pm 1,82$; $24,41 \pm 1,49$; $27,36 \pm 1,07$; $28,12 \pm 0,87$ và $28,36 \pm 1,02$ % alginate và tại nồng độ kiềm 3,0 %, hiệu suất thu được là cao nhất. Nguyên nhân do quá trình chiết xuất trong môi trường kiềm xảy ra phản ứng trao đổi ion, chuyển alginate từ dạng muối không tan (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} ...) sang dạng muối natri alginate tan được trong nước. Với rong đã xử lý qua acid, khi chiết xuất bằng kiềm với một tỷ lệ thích hợp, phản ứng trao đổi ion xảy ra gần như hoàn toàn, nồng độ kiềm tăng lên, phản ứng trao ion tăng lên, tạo ra được nhiều natri alginate hơn. Khi tăng nồng độ kiềm, độ nhớt cũng tăng lên, nguyên nhân do lúc đầu kiềm thấp, thành tế bào rong vẫn còn rắn chắc chỉ có một phần alginate phân tử nhỏ khuếch tán ra nên độ nhớt thấp. Với nồng độ natri carbonat 1,0 % độ nhớt thu được là $3,21 \pm 0,03$ mPa.s. Khi tăng nồng độ kiềm là 1,5 % và 2,0 % , phản ứng xảy ra triệt để hơn, nồng độ alginate

chiết được cao hơn, độ nhớt tăng lên tương ứng là $3,27 \pm 0,06$ mPa.s và $3,52 \pm 0,03$ mPa.s. Tuy nhiên khi lượng kiềm là 2,5 % và 3,0 %, liên kết glucosid bị phá hủy, alginate phân tử lớn bị cắt mạch nhiều làm độ nhớt của dung dịch đo được giảm, chỉ còn tương ứng là $3,29 \pm 0,07$ mPa.s và $2,91 \pm 0,06$ mPa.s... Kết quả này phù hợp với một số công trình đã công bố. Ngô Đăng Nghĩa đưa ra điều kiện chiết đối với rong *S.mcclurei* và *S.kjellmanianum* là nồng độ Na_2CO_3 (1,54-1,68%), nhiệt độ chiết từ 55-60°C và thời gian chiết 1,15-0,2 giờ.

Như vậy, chọn được nồng độ Na_2CO_3 2% cho chiết tách alginate từ bã rong bằng sóng siêu âm.

c. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng chiết tách alginate từ bã rong bằng sóng siêu âm

Nhiệt độ cao và thời gian chiết kéo dài làm gãy mạch dẫn đến làm giảm độ nhớt của natri alginate. Vì vậy trong phần này chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ chiết lên hiệu suất, độ nhớt của alginate. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ chiết lên hiệu suất alginate thu được và độ nhớt dung dịch alginate thu được.



Hình 3.24. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tách tới hiệu suất và độ nhớt alginate chiết tách từ rong mơ bằng sóng siêu âm

Kết quả cho thấy khi nhiệt độ tăng từ 50°C tới 100°C, hiệu suất thu được tăng từ $18,92 \pm 1,67$; $20,92 \pm 0,87$; $26,06 \pm 1,07$; $27,67 \pm 1,12$; $27,94 \pm 0,97$; $28,07 \pm 1,02$; $28,91 \pm 1,48$ lên $29,57 \pm 2,27$ %.

Có thể giải thích như sau: Khi nhiệt độ tăng, phản ứng xảy ra với tốc độ nhanh hơn, đồng thời cũng tạo điều kiện cho sự khuếch tán ra của các phân tử alginate. Kết quả này phù hợp với kết luận của Gustavo và CS. Chiết tách cho hiệu suất alginate tăng cao ở nhiệt độ 60 – 80°C, hiệu suất alginate thu được cũng cao tương ứng từ

27,67±1,12 % lên 28,07 ± 1,02% alginate, tăng cao nhất ở nhiệt độ 90 và 100°C tương ứng là 28,91 ± 1,48% và 29,57 ± 2,27% alginate.

Tuy nhiên, nhiệt độ cao cũng làm giảm độ nhớt đáng kể. Cùng chiết xuất ở natri carbonat 1,5 %, thời gian 5 phút tại nhiệt độ 90 và 100°C, độ nhớt thu được giảm thấp nhất, tương ứng là 4,08 ± 0,04 và 3,89 ± 0,07 mPa.s. Ở nhiệt độ 30, 40 và 50°C, độ nhớt thu được tăng tương ứng là 4,42 ± 0,07; 4,67 ± 0,05 và 4,82 ± 0,06 mPas. Nhiệt độ tăng từ 60; 70 lên 80°C, độ nhớt thu được tăng không có sai khác nhiều, tương ứng là 4,86 ± 0,08 ; 4,93 ± 0,06 và 4,96 ± 0,09 mPas, hiệu suất alginate cũng chênh lệch không đáng kể.

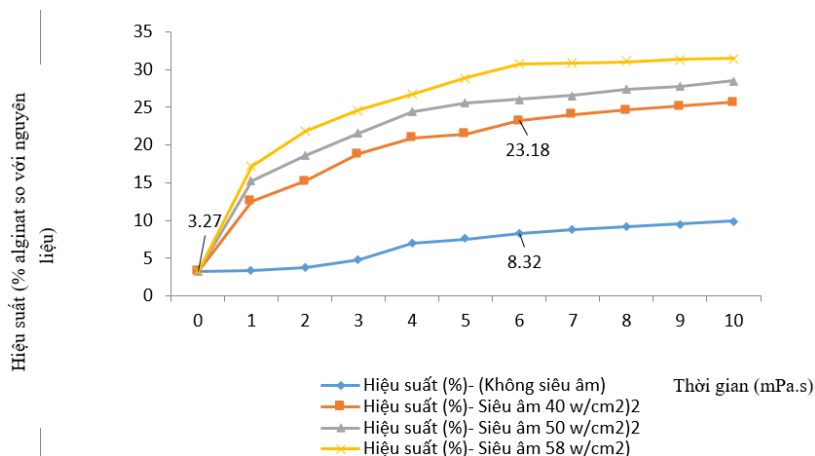
Thực nghiệm trên cho thấy, nhiệt độ 60°C là thích hợp nhất để thu hồi alginate (đáp ứng được cả yêu cầu về hiệu suất và độ nhớt).

d. Ảnh hưởng của thời gian và cường độ sóng siêu âm đến hiệu suất chiết tách alginate từ bã rong

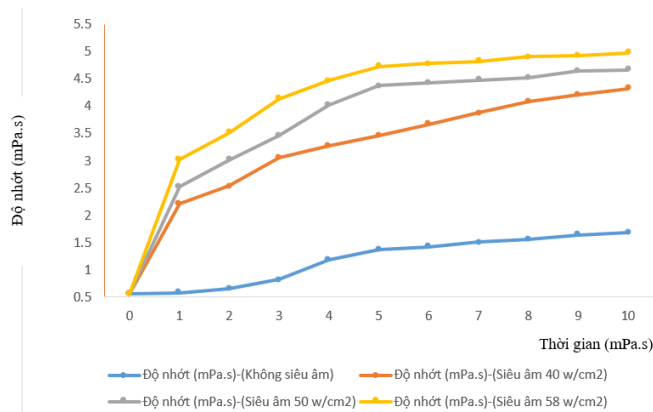
Kết quả ở Hình 3.25 và 3.26 cho thấy:

Chiết tách alginate khi tăng cường độ siêu âm từ 0 – 58 w/cm², nhiệt độ 60°C, thời gian tăng từ 0 đến 10 phút thì hiệu suất chiết tách alginate so với nguyên liệu tăng, độ nhớt cũng tăng.

- Không sử dụng sóng siêu âm (đối chứng) cho hiệu suất thu nhận alginate tăng lần lượt tương ứng là : 3,27 ± 0,38; 3,41 ± 0,43; 3,75 ± 0,51; 4,85 ± 0,28; 7,02 ± 0,49; 7,54 ± 0,51; 8,32 ± 0,76; 8,85 ± 0,38; 9,18 ± 0,47; 9,61 ± 0,34 và 9,89 ± 0,43 %. Độ nhớt tăng tương ứng là 0,56 ± 0,04; 0,58 ± 0,05; 0,65 ± 0,03; 0,82 ± 0,08; 1,18 ± 0,04; 1,38 ± 0,03; 1,42 ± 0,06; 1,51 ± 0,02; 1,56 ± 0,05; 1,64 ± 0,04 và 1,68 ± 0,08 mPa.s.



Hình 3.25. Ảnh hưởng của thời gian và cường độ sóng siêu âm đến hiệu suất alginate chiết tách từ rong mơ bằng sóng siêu âm



Hình 3.26. Ảnh hưởng của thời gian và cường độ sóng siêu âm đến độ nhớt alginate chiết tách từ rong mơ bằng sóng siêu âm

- Chiết tách bằng sóng siêu âm (20 kHz) ở 40 w/cm² cho hiệu suất thu nhận alginate tăng lần lượt là: $3,27 \pm 0,38$; $12,53 \pm 0,37$; $15,19 \pm 0,45$; $18,83 \pm 0,61$; $20,91 \pm 0,34$; $21,49 \pm 0,53$; $23,18 \pm 0,46$; $24,07 \pm 0,71$; $24,67 \pm 0,67$; $25,17 \pm 0,38$ và $25,72 \pm 0,48\%$. Độ nhớt tăng lần lượt tương ứng là: $0,56 \pm 0,04$; $2,21 \pm 0,05$; $2,54 \pm 0,06$; $3,06 \pm 0,04$; $3,28 \pm 0,07$; $3,46 \pm 0,04$; $3,67 \pm 0,05$; $3,88 \pm 0,06$; $4,09 \pm 0,05$; $4,21 \pm 0,03$ và $4,32 \pm 0,07$ mPa.s

- Chiết tách bằng sóng siêu âm ở 50 w/cm² cho hiệu suất thu nhận alginate tăng lần lượt là: $3,27 \pm 0,38$; $15,24 \pm 0,48$; $18,64 \pm 0,31$; $21,53 \pm 0,51$; $24,41 \pm 0,27$; $25,57 \pm 0,37$; $26,05 \pm 0,61$; $26,61 \pm 1,02$; $27,39 \pm 0,68$; $27,81 \pm 0,71$ và $28,47 \pm 0,59$ %. Độ nhớt tăng lần lượt tương ứng là: $0,56 \pm 0,04$; $2,53 \pm 0,05$; $3,01 \pm 0,07$; $3,46 \pm 0,06$; $4,02 \pm 0,08$; $4,38 \pm 0,03$; $4,43 \pm 0,05$; $4,48 \pm 0,09$; $4,53 \pm 0,04$; $4,64 \pm 0,07$ và $4,67 \pm 0,06$ mPa.s.

- Chiết tách ở cường độ sóng siêu âm 58 w/cm² cho hiệu suất thu nhận alginate tăng lần lượt tương ứng là: $3,27 \pm 0,38$; $17,22 \pm 0,42$; $21,87 \pm 0,67$; $24,62 \pm 0,58$; $26,67 \pm 0,38$; $28,87 \pm 1,08$; $30,72 \pm 0,91$; $30,82 \pm 0,52$; $31,01 \pm 0,61$; $31,33 \pm 0,72$ và $31,45 \pm 0,52$ %. Độ nhớt tăng lần lượt tương ứng là: $0,56 \pm 0,04$; $3,03 \pm 0,03$; $3,51 \pm 0,05$; $4,14 \pm 0,07$; $4,47 \pm 0,04$; $4,73 \pm 0,05$; $4,78 \pm 0,08$; $4,82 \pm 0,05$; $4,91 \pm 0,03$; $4,93 \pm 0,06$ và $4,98 \pm 0,07$ mPa.s.

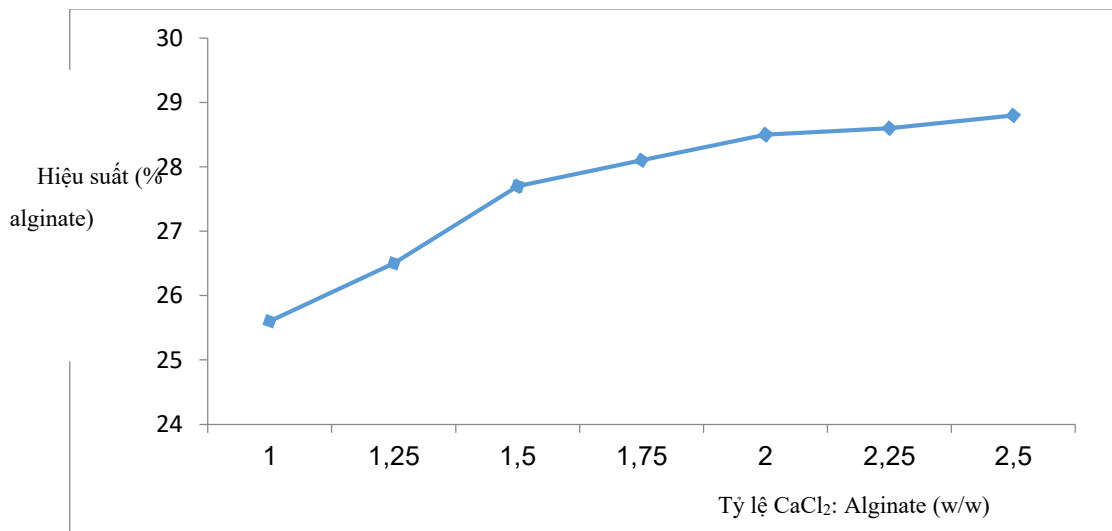
Như vậy, khi cường độ và thời gian siêu âm tăng sẽ tăng khả năng chiết tách alginate, tăng độ nhớt so với đối chứng (không sử dụng sóng siêu âm). Chiết tách ở cường độ 58 w/cm² cho hiệu suất thu nhận alginate và độ nhớt là cao nhất. Ở cường

độ siêu âm là 58 w/cm^2 , với thời gian siêu âm chiết tách tăng từ 0 - 6 phút, hiệu suất chiết tách alginate và độ nhớt tăng mạnh. Khi tăng thời gian lên từ 6 đến 10 phút, sự tăng chênh lệch về hiệu suất chiết tách và độ nhớt là không đáng kể.

Như vậy, để đảm bảo yếu tố kinh tế, ta lựa chọn cường độ siêu âm là 58 w/cm^2 , thời gian 6 phút để chiết tách alginate từ bã rong.

e. Ảnh hưởng của nồng độ CaCl_2 đến hiệu suất thu hồi $\text{Ca}(\text{Alg})_2$

Sau khi chiết alginate natri giai đoạn tiếp theo đó là thực hiện sự chuyển hóa chúng sang dạng alginate canxi ($\text{Ca}(\text{Alg})_2$) theo phản ứng: $\text{NaAlg} + \text{CaCl}_2 \rightarrow \text{Ca}(\text{Alg})_2 + 2\text{NaCl}$ để thuận lợi cho quá trình tẩy trắng. Khả năng thu hồi $\text{Ca}(\text{Alg})_2$, phụ thuộc vào lượng CaCl_2 tham gia phản ứng. Do đó, ta thực hiện khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ CaCl_2 : Alginate lần lượt là 1,25; 1,50; 1,75; 2,0; 2,25; và 2,50 (w/w) lên hiệu suất thu nhận $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ để tìm tỷ lệ thích hợp.



Hình 3.27. Ảnh hưởng của nồng độ CaCl_2 tới hiệu suất thu hồi $\text{Ca}(\text{Alg})_2$

Kết quả Hình 3.27 cho thấy tỷ lệ CaCl_2 : Alginate (w/w) càng cao thì hiệu suất thu nhận alginate ở phần tủa càng lớn, nồng độ ethanol tăng từ tỷ lệ CaCl_2 : Alginate là: 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,25 lên 2,50 (w/w) cho hiệu suất thu nhận alginate tăng tương ứng lần lượt là: $25,6 \pm 1,06$; $26,5 \pm 0,96$; $27,7 \pm 1,16$; $28,1 \pm 0,87$; $28,5 \pm 1,21$; $28,6 \pm 1,12$ và $28,8 \pm 1,25$ % alginate. Và cho thấy ở tỷ lệ CaCl_2 : Alginate là: 2,00; 2,25 và 2,50 (w/w) cho hiệu suất cao nhất, nhưng ở các tỷ lệ này cho hiệu suất tăng không đáng kể. Vì vậy, dung dịch CaCl_2 10 % để tủa thu hồi $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ với tỷ lệ tương ứng CaCl_2 : Alginate = 2 (w/w) là thích hợp để tủa thu hồi $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ từ NaAlg.

Do đó, nồng độ CaCl_2 10 % với tỷ lệ tương ứng CaCl_2 : Alginate = 2 (w/w) được chọn thích hợp để tủa thu hồi $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ từ NaAlg.

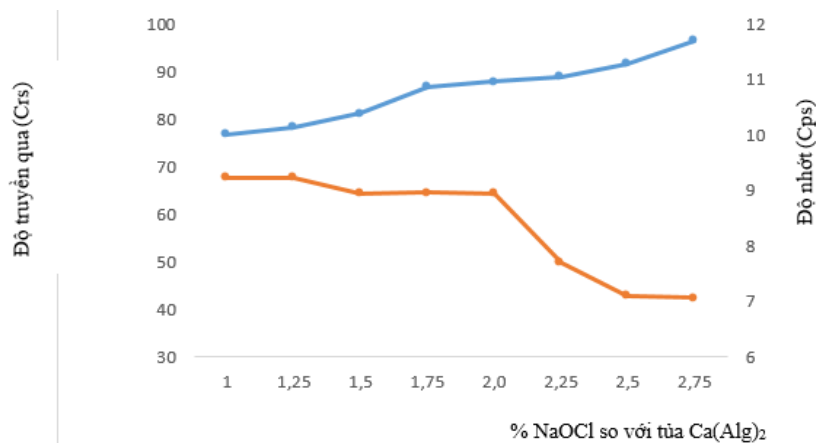
3.5.3.2. Nghiên cứu quá trình tẩy trắng $\text{Ca}(\text{Alg})_2$

Hiện nay, H_2O_2 thường sử dụng để loại màu sản phẩm trung gian là axit alginic hoặc canxi alginate trong quy trình sản xuất alginate, mặc dù H_2O_2 gây ra depolyme mạch alginate làm giảm chất lượng sản phẩm. Ngoài ra, sự có mặt có ion Na^+ có thể làm giảm hàm lượng Ca^{2+} , tạo ra sự mất ổn định của sản phẩm.

Tùy theo nguyên liệu khác nhau mà hàm lượng H_2O_2 sử dụng khác nhau. Do đó, nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của nồng độ H_2O_2 bằng dung dịch 5% H_2O_2 tương ứng với tỷ lệ % hàm lượng H_2O_2 so với tủa $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ là: 0,5; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50 và 2,75 % lên màu và độ nhớt của alginate.

Kết quả cho thấy nồng độ H_2O_2 càng tăng từ 0,5; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50 lên đến 2,75% H_2O_2 cho độ truyền qua càng tăng tương ứng $73,2 \pm 2,1$; $76,7 \pm 3,2$; $78,2 \pm 1,9$; $81,3 \pm 2,6$; $86,8 \pm 1,8$; $87,9 \pm 1,5$; $88,7 \pm 2,2$; $91,4 \pm 1,7$ và $96,2 \pm 1,7$ Crs, độ trắng của sản phẩm tăng lên và ngược lại cho độ nhớt giảm xuống. Khi tăng nồng độ H_2O_2 từ 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 và lên đến 2,00% H_2O_2 so với tủa $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ cho thấy độ nhớt tương đối ổn định, tương ứng là $9,21 \pm 0,04$; $9,22 \pm 0,06$; $9,22 \pm 0,05$; $8,94 \pm 0,03$; $8,95 \pm 0,04$ và $8,94 \pm 0,06$ Cps (giảm không đáng kể), còn khi nồng độ H_2O_2 tiếp tục tăng từ 2,25; 2,50 và lên đến 2,75% H_2O_2 so với tủa $\text{Ca}(\text{Alg})_2$, cho thấy độ nhớt giảm mạnh tương ứng: $7,70 \pm 0,07$; $7,10 \pm 0,06$ và $7,07 \pm 0,08$ Cps. Như vậy, để thu được sản phẩm đạt chất lượng về màu, độ nhớt có thể sử dụng cho thực phẩm, chúng tôi chọn hàm lượng H_2O_2 5 % tối ưu nằm trong vùng 1,75 -2,00% $\text{H}_2\text{O}_2/100\text{g Ca}(\text{Alg})_2$ khi đó sản phẩm có màu vàng nhạt đến trắng ngà.

Vậy, tẩy trắng sản phẩm $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ bằng dung dịch H_2O_2 5 % với lượng tương ứng 2 % H_2O_2 so với tủa $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ là phù hợp.



Hình 3.28. Ảnh hưởng của hàm lượng H_2O_2 (dung dịch H_2O_2 5 %) lên độ nhớt và độ truyền qua của sản phẩm alginate

Như vậy, điều kiện thu alginate từ bã rong bằng sóng siêu âm như sau:

- Hàm lượng alginate trong bã rong xử lý với tỷ lệ dung dịch HCl 0,1 M: bã rong là 10 (w/w), 25°C.

- Điều kiện chiết tách alginate bằng sóng siêu âm là 60°C, 58 w/cm² (tần số 20 kHz)/ 6 phút, tỷ lệ dung dịch Na₂CO₃ 2%: bã rong là 10 (l/kg).

- Nồng độ CaCl₂ 10% với tỷ lệ tương ứng CaCl₂: Alginate = 2 (w/w) được chọn thích hợp để tủa thu hồi Ca(Alg)₂ từ NaAlg, tẩy trắng sản phẩm Ca(Alg)₂ bằng dung dịch NaOCl 5% với lượng tương ứng 2% H₂O₂ so với tủa Ca(Alg)₂ cho sản phẩm Ca(Alg)₂, có màu vàng nhạt đến trắng ngà.

3.6. Đánh giá chất lượng và một số hoạt tính của Canxi alginate

3.6.1. Đánh giá chất lượng Canxi alginate

Hoạt chất Canxi alginate điều chế từ Rong biển được đánh giá chất lượng qua phân tích các chỉ tiêu sinh hóa bao gồm các chỉ tiêu về độ ẩm, hàm lượng tro, hàm lượng Canxi, hàm lượng Alginic, độ pH; chỉ tiêu vi sinh vật; hàm lượng kim loại nặng. Kết quả phân tích được trình bày trên các Bảng 3.29, Bảng 3.30 và 3.31.

Bảng 3.29. Xác định chỉ tiêu chất lượng chính

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức chất lượng
1	Độ ẩm	%	6.82%
2	Hàm lượng tro tổng	%	31.08%
3	Hàm lượng canxi	%	7-10%
4	Hàm lượng Alginic	%	20.67%
5	pH		6.0-7.5
6	Độ nhớt (dd 1%)	(mPa.S)	235

Kết quả phân tích ở bảng 3.29 cho thấy, mẫu nghiên cứu có độ ẩm đạt giá trị 6.82%; hàm lượng tro đạt 31.08% và hàm lượng Alginic đạt 20.67%. Bên cạnh đó, hàm lượng canxi trong bột alginate rất cao từ 7-10%, cho thấy bột alginate rất tốt cho xương khớp. Đây là cơ sở khoa học để chúng tôi tiến hành thử nghiệm hoạt tính chống loãng xương của mẫu nghiên cứu này.

Bảng 3.30. Kết quả phân tích chỉ tiêu vi sinh vật

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức chất lượng	Mức chất lượng theo QCVN* [12,13]
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	CFU/g	≤ 1000	≤ 5000
2	Tổng số bào tử nấm mốc, nấm men	CFU/g	≤ 100	≤ 500
3	<i>Coliform</i>	CFU/g	≤ 10	
4	<i>E. coli</i>	CFU/g	Âm tính	Âm tính
5	<i>S. aureus</i>	CFU/g	≤ 3	
6	<i>C. perfringens</i>	CFU/g	≤ 10	
7	<i>B. Cereus</i>	CFU/g	≤ 10	
8	<i>Salmonella</i>	CFU/25g	Âm tính	Âm tính

*QCVN 8-2:2011/BYT; QCVN 4 - 21: 2011/BYT

Kết quả phân tích chỉ tiêu vi sinh vật cho thấy trong mẫu nghiên cứu có mặt các loại vi khuẩn *Coliform*, *S. Aureus*, *C. Perfringens*, *B. Cereus* với hàm lượng ≤ 10CFU/g và không có mặt của hai loại khuẩn gây bệnh là *E. Coli* và *Salmonella*. Kết quả này đáp ứng được tiêu chuẩn an toàn thực phẩm do Bộ Y tế ban hành.

Theo kết quả phân tích được trình bày trên Bảng 3.31, hàm lượng Cu, Zn có các giá trị ≤ 10 ppm; hàm lượng các kim loại nặng Pb, Cd, Hg thấp hơn rất nhiều. Các giá trị về hàm lượng các kim loại nặng đều nằm trong ngưỡng cho phép theo quy định an toàn thực phẩm của Bộ Y tế.

Bảng 3.31. Chỉ tiêu hàm lượng kim loại nặng

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức chất lượng	Mức chất lượng theo QCVN* [11,13]
1	Hàm lượng Pb	ppm	≤ 3.0	≤ 5.0
2	Hàm lượng Cd	ppm	≤ 0.1	≤ 3.0
3	Hàm lượng Hg	ppm	≤ 1.0	≤ 1.0
4	Hàm lượng Đồng	ppm	≤ 10	
5	Hàm lượng kẽm	ppm	≤ 10	

*QCVN 8-2:2011/BYT; QCVN 4 - 21: 2011/BYT

3.6.2. Đánh giá hoạt tính chống loãng xương của Canxi alginate

Tế bào tiền nguyên bào xương MC3T3-E1 là loại tế bào có khả năng biệt hóa thành các tế bào tạo xương. Trong quá trình biệt hóa, tế bào MC3T3-E1 thể hiện những đặc điểm đặc trưng của nguyên bào xương như sản xuất alkaline phosphatase (ALP), tăng cường tổng hợp collagen chất nền ngoại bào từ procollagen và cuối cùng là lắng đọng khoáng trên chất nền ngoại bào. Vì vậy dòng tế bào này được sử dụng để đánh giá khả năng chống loãng xương của các mẫu nghiên cứu. Các chỉ tiêu như khả năng kích thích tạo ALP, khả năng tăng cường tổng hợp collagen và khả năng tăng cường tạo khoáng là các dấu hiệu đặc trưng cho khả năng chống loãng xương. Kết quả đánh giá hoạt tính chống loãng xương của hoạt chất Canxi alginate được trình bày trên bảng 3.32.

Bảng 3.32. Kết quả đánh giá hoạt tính chống loãng xương của hoạt chất Canxi alginate

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào		Tác động đến sự hoạt động của enzyme ALP		Tác động đến sự tổng hợp collagen		Khả năng kích thích tạo khoáng	
	% TB sống	Sai số	% kích thích	Sai số	% tổng hợp	Sai số	% tổng hợp	Sai số
100	78.44	3.16	90.67	5.21	109.64	6.42	105.66	7.93
20	86.71	4.63	124.41*	3.56	111.10*	2.83	103.05	8.62
4	88.95	0.34	118.16*	5.60	101.23	2.12	115.42*	2.23
0,8	90.21	3.42	62.66	0.39	99.58	1.56	99.13	2.44
ĐC	100	1.77	100.00	3.51	100.00	0.21	100.00	2.68

Ghi chú: *là sự sai khác ở mức có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$

Kết quả ở bảng trên cho thấy, đối với thử nghiệm ảnh hưởng lên sự phát triển của tế bào MC3T3 – E1, mẫu nghiên cứu ở các nồng độ thử nghiệm khác nhau đều gây ức chế sự phát triển của tế bào so với đối chứng không ủ mẫu với % tế bào sống từ 78.44 - 90.21% ($P < 0.05$). Trong đó, ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$, % tế bào sống thấp nhất là 78.44%. Khi nồng độ mẫu thử giảm xuống 20 $\mu\text{g/ml}$ đến 0,8 $\mu\text{g/ml}$, tế bào bị ảnh hưởng ít hơn, % tế bào sống đều cao với các giá trị lần lượt là 86.71, 88.95 và 99.21%.

Đối với thử nghiệm đánh giá tác động đến sự hoạt động của enzyme ALP, Canxi alginate thể hiện khả năng tăng cường hoạt động của enzyme này ở mức có ý

nghĩa thống kê ở nồng độ 20 µg/ml và 4 µg/ml với % kích thích ALP là 124.41% và 118.16% khi so sánh với đối chứng âm (100%). Ở các nồng độ 10 µg/ml và 0.8 µg/ml, mẫu thử nghiệm không thể hiện rõ khả năng kích thích ALP.

Canxi alginate ở nồng độ 20 µg/ml thể hiện khả năng tăng cường tổng hợp collagen so với đối chứng âm, % collagen được tổng hợp là 111.10%. Ở nồng độ 4 µg/ml, mẫu thử nghiệm có khả năng kích thích tạo khoáng nhẹ so với đối chứng âm, % khoáng được tổng hợp là 115.42% ($P<0,05$).

3.6.3. Kết quả nghiên cứu về độ an toàn của Canxi alginate

3.6.3.1. Kết quả về độc tính cấp

Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.33.

Biểu hiện sau khi uống mẫu, chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt được ký hiệu là BT.

Bảng 3.33. Số lượng chuột chết, biểu hiện bên ngoài khi uống Canxi alginate

Lô TNo	Liều lượng chế phẩm Canxi alginate (g/kg)	Số chuột chết trong 72 giờ (con)	Biểu hiện bên ngoài trong khoảng thời gian từ 0-72 giờ
1	ĐC	0	BT
2	0,2	0	BT
3	0,5	0	BT
4	1,0	0	BT
5	1,5	0	BT
6	2,0	0	BT
7	2,5	0	BT

Kết quả cho thấy chế phẩm không gây chết động vật thí nghiệm theo đường uống trong thí nghiệm này. Như vậy, Canxi alginate không gây độc tính cấp trên chuột nhắt trắng theo đường uống với liều thử cao nhất là 2,5 g/kg. Đối với các mức liều thử cao hơn, do sự trương nở của sản phẩm ở dạng thạch mềm nên không thể cho chuột sử dụng ở các mức liều cao hơn. Vì vậy, không ghi nhận được độc tính cấp của sản phẩm ở các mức liều cao hơn.

Khối lượng cơ thể chuột

Kết quả theo dõi khối lượng cơ thể chuột ở nhóm chứng và nhóm thử được thể hiện trong các bảng 3.34. Kết quả theo dõi khối lượng trung bình của chuột trong quá trình thử nghiệm 7 ngày cho thấy:

- Trước khi uống mẫu thử: Khối lượng trung bình của chuột ở các nhóm thử trước khi đưa vào thử nghiệm không có sự khác biệt so với nhóm chứng ($p > 0,05$).

- Sau khi uống mẫu thử 1 ngày, 4 ngày và 7 ngày: Chuột thí nghiệm ở nhóm chứng và nhóm thử không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Kết quả thu được chứng tỏ Canxi alginate không ảnh hưởng đến quá trình phát triển bình thường của chuột thí nghiệm.

Bảng 3.34. Kết quả theo dõi khối lượng của chuột ở các lô

Canxi alginate (g/kg)	Khối lượng trung bình của chuột thí nghiệm (g/con)			
	Trước khi uống	ngày 1	ngày 4	ngày 7
0	21,19 ± 0,20	21,25 ± 0,31	21,87 ± 0,28	22,51 ± 0,34
1	21,46 ± 0,23	21,54 ± 0,28	22,08 ± 0,31	22,78 ± 0,37
2	21,28 ± 0,37	21,37 ± 0,30	21,92 ± 0,36	22,52 ± 0,32
4	21,35 ± 0,27	21,43 ± 0,35	21,98 ± 0,42	22,66 ± 0,30
6	21,41 ± 0,31	21,56 ± 0,36	22,12 ± 0,33	22,88 ± 0,29
8	21,27 ± 0,40	21,35 ± 0,45	21,86 ± 0,34	22,65 ± 0,46
10	21,54 ± 0,24	21,61 ± 0,29	22,17 ± 0,35	22,89 ± 0,36
<i>p</i>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Ghi chú: * $p < 0,05$ là có sự sai khác thống kê so với lô đối chứng

Tiêu thụ thức ăn và nước uống của chuột

- Nhóm chứng: Hoạt động và ăn uống bình thường.

- Các nhóm thử: theo dõi từ lúc uống bột dinh dưỡng đầu tiên đến 72 giờ chuột tiêu thụ nước uống, thức ăn vẫn bình thường.

Quan sát dấu hiệu ngộ độc

- Sau khi uống Canxi alginate không có chuột chết ở tất các lô thử nghiệm.

Điều này cho thấy Chế phẩm Canxi alginate là an toàn không gây độc tính cấp

- Dựa trên kết quả thu được của thử nghiệm này có thể kết luận Canxi alginate thuộc nhóm không gây độc theo đường uống.

3.6.3.2. Kết quả thử độc tính bán trường diễn

Kết quả theo dõi biểu hiện bên ngoài

- Theo dõi sự biểu hiện chức năng của chuột thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy chuột ở lô được uống Canxi alginate so với lô đối chứng là không có sự sai khác, chuột vẫn ăn uống bình thường, lông mượt, không có con nào bị chết.

- Như vậy, thông qua các yếu tố trực quan bên ngoài, Canxi alginate ở các mức liều nghiên cứu không gây ảnh hưởng cho động vật khi uống dài ngày.

Kết quả về sự tăng trọng lượng của động vật thí nghiệm

Không chỉ có theo dõi biểu hiện bên ngoài của chuột thí nghiệm, chúng tôi còn theo dõi sự thay đổi trọng lượng của chuột trong quá trình thí nghiệm. Trọng lượng của chuột thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.35.

Bảng 3.35. Sự thay đổi trọng lượng chuột khi cho uống Canxi alginate (gram/con)

Lô thí nghiệm	Thời điểm	Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 21	Ngày 28
Lô đối chứng	Trọng lượng (g/con)	167,50	177,43	190,57	192,77	194,13
	SE	11,69	11,31	13,60	12,52	11,48
Canxi alginate (500 mg/kg)	Trọng lượng (g/con)	166,33	176,67	188,13	188,83	189,17
	SE	14,69	10,66	12,77	11,94	6,09
Canxi alginate (1000mg/kg)	Trọng lượng (g/con)	168,67	176,67	177,33	178,33	179,57
	SE	13,30	13,27	16,17	16,75	14,87

*Ghi chú: * $p < 0,05$ là có sự sai khác thống kê so với lô đối chứng*

Kết quả cho thấy sau 4 tuần, chuột ở cả 3 lô (lô chứng và lô uống mẫu) đều tăng trọng lượng so với trước khi nghiên cứu ($p < 0,05$). Thời điểm kết thúc thí nghiệm, chuột ở lô uống mẫu so với lô đối chứng có trọng lượng thấp hơn. Tuy nhiên, sự khác biệt này chưa thể hiện ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Kết quả kiểm tra một số chỉ tiêu huyết học

Đánh giá ảnh hưởng trong thời gian 28 ngày, sau thời gian thí nghiệm, chuột ở các lô được lấy máu, thu huyết thanh, xác định một số chỉ tiêu huyết học và hóa sinh máu. Kết quả về số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hemoglobin, hoạt độ các enzym creatinphosphokinase (CPK), serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), serum glutamic purivic transaminase (SGPT) được trình bày ở bảng 3.36.

Bảng 3.36. Các chỉ tiêu huyết học khi cho chuột uống Canxi alginate

Các chỉ tiêu	Đối chứng		Canxi alginate 500 mg/kg		Canxi alginate 1000 mg/kg	
	TB	SE	TB	SE	TB	SE
Bạch cầu ($10^9/L$)	6,22	0,50	5,32	2,32	3,73	2,35
Hồng cầu ($10^{12}/L$)	7,83	0,61	8,72	0,27	6,85	0,54
HGB (g/dL)	129,00	9,07	140,50	6,50	108,50	13,50
HCT (%)	0,41	0,02	0,43	0,01	0,38	0,03
MCV (fL)	53,45	1,99	48,80	2,10	50,35	1,55
MCH (pg)	16,22	0,16	16,15	1,25	16,15	0,15
MCHC (g/L)	331,33	11,98	331,00	11,00	321,00	13,00
CHCM (g/L)	319,07	13,53	339,00	1,00	327,50	18,50
CH (pg)	16,62	0,19	16,50	0,80	16,45	0,45
RDW (%)	14,12	2,47	15,40	1,80	14,80	1,30
HDW (g/dL)	29,17	4,56	30,10	2,80	29,80	2,40
Tiểu cầu ($10^9/L$)	464,62	48,11	385,50	29,50	490,00	190,00
MPV (fL)	9,70	0,73	9,65	0,25	8,55	0,25

Ghi chú: * $p < 0,05$ là có sự sai khác thống kê so với lô đối chứng

Bảng 3.36. cho thấy:

- Số lượng hồng cầu, lượng huyết sắc tố (HGB), Hematocrit (HCT), thể tích trung bình hồng cầu (MCV), nồng độ Hb trung bình hồng cầu (MCHC) hay độ phân bố hồng cầu (RDW) giữa lô được uống Canxi alginate liều 500 mg/kg không có sự sai khác so với đối chứng ($p > 0,05$).

- Số lượng hồng cầu, lượng huyết sắc tố (HGB), Hematocrit (HCT) ở chuột uống Canxi alginate liều 1000 mg/kg thấp hơn so với đối chứng ở mức có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$);

- Số lượng bạch cầu trong máu chuột được uống Canxi alginate liều giảm so với lô đối chứng sau 4 tuần thí nghiệm. Tuy nhiên sự sai khác này chưa thể hiện ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Số lượng tiểu cầu trong máu chuột uống Canxi alginate ở các mức liều đều thấp hơn so với đối chứng. Tuy nhiên sự sai khác này chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Kết quả kiểm tra một số chỉ tiêu hóa sinh máu

Bảng 3.37. Một số chỉ tiêu hóa sinh khi uống Canxi alginate

Các chỉ tiêu	Lô Đối chứng	Canxi alginate 500 mg/kg	Canxi alginate 1000 mg/kg
AST (IU/L)	66,53 ± 13,56	89,25 ± 11,05	139,75* ± 29,35
ALT (IU/L)	30,17 ± 4,38	40,70 ± 2,60	41,45 ± 7,25

Ghi chú: * $p < 0,05$ là có sự sai khác thống kê so với lô đối chứng

Bảng 3.37. cho thấy:

Sau 4 tuần uống mẫu liên tục, các chỉ số đánh giá hoạt độ ALT ở lô uống chế phẩm liều 1000 mg/kg/ngày và 500 mg/kg/ngày cao hơn so với đối chứng, tuy nhiên sự thay đổi này chưa thể hiện ý nghĩa thống kê. Chỉ số AST ở lô uống chế phẩm oligopeptide liều 1200 mg/kg/ngày đã gây tăng chỉ số AST ở mức có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Bảng 3.38. Ảnh hưởng của Canxi alginate đến nồng độ creatinin trong máu chuột

Các chỉ tiêu	Lô Đối chứng	Canxi alginate 500 mg/kg	Canxi alginate 1000 mg/kg
Creatinin ($\mu\text{mol/L}$)	51,07 ± 4,93	52,15 ± 3,45	53,50 ± 5,60

Kết quả ở bảng 3.38 cho thấy: sau 4 tuần uống mẫu Canxi alginate liên tục, hàm lượng creatinin trong máu chuột giảm nhẹ so với đối chứng. Tuy nhiên sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

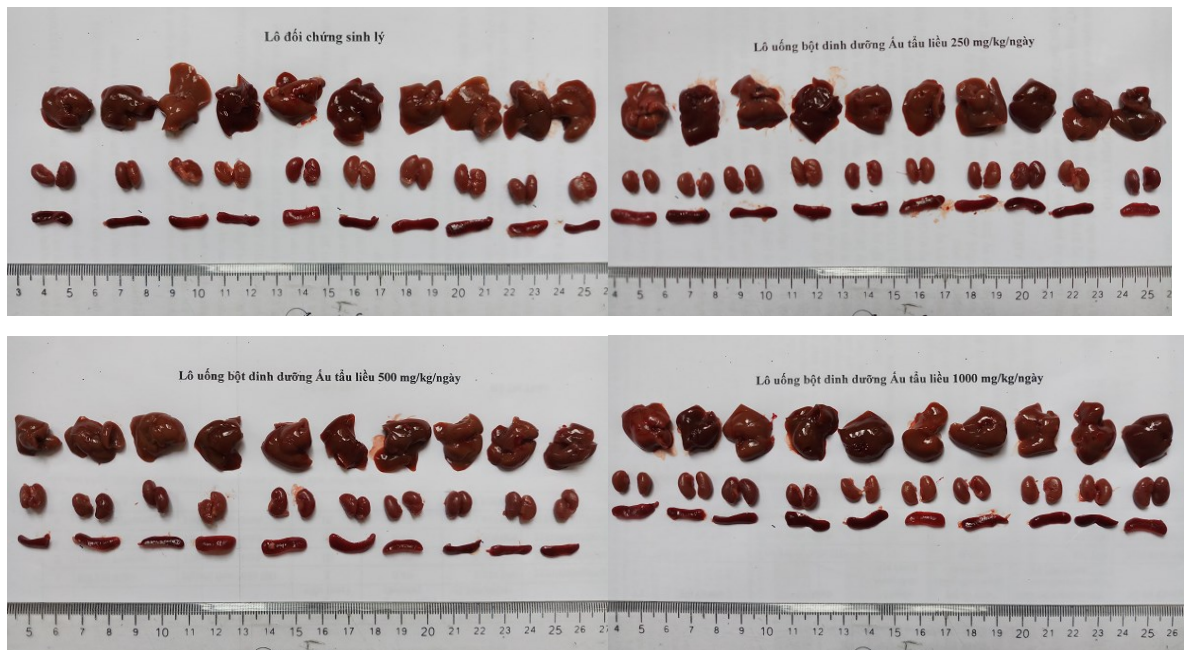
Kết quả nghiên cứu trực quan gan, thận, lách động vật thí nghiệm

Sau thời gian cho uống bán trường diễn, động vật ở tất cả các lô được mổ, quan sát trực quan đối với các nội tạng là gan, thận, lách, phổi. Sau đó, cân khối lượng để đánh giá ảnh hưởng. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.39.

Bảng 3.39. Kết quả mô giải phẫu cơ quan nội tạng khi uống Canxi alginate

Lô thí nghiệm	Kết quả mô giải phẫu cơ quan nội tạng khi uống Canxi alginate		
	Gan	Thận	Lách
Đối chứng	Mô gan đồng nhất, không có tổn thương hay hoại tử	Hai thận tương đối đều nhau, không có hiện tượng ứ nước	Không sưng
Canxi alginate liều 500 mg/kg/ngày	Mô gan đồng nhất, không có tổn thương hay hoại tử	Hai thận tương đối đều nhau, không có hiện tượng ứ nước	Không sưng
Canxi alginate liều 1000 mg/kg/ngày	Mô gan đồng nhất, không có tổn thương hay hoại tử	Hai thận tương đối đều nhau, không có hiện tượng ứ nước	Không sưng

Kết quả ở Hình 3.29. cho thấy gan, thận, lách ở các lô được uống Canxi alginate về màu sắc là không có sự bất thường so với lô đối chứng.



Hình 3.29. Ảnh gan, thận, lách chuột sau khi thí nghiệm độc bán trường diễn

Kết quả về trọng lượng gan, thận, lách động vật thí nghiệm

Kết quả cân trọng lượng các nội quan này được trình bày ở bảng 3.40.

Bảng 3.40. Trọng lượng của một số nội quan (gram/10 gram thể trọng)

Lô thí nghiệm	Trọng lượng của một số nội quan (gram/10 gram thể trọng)		
	Gan	Thận	Lách

Đối chứng	0,413 ± 0,014	0,118 ± 0,006	0,043 ± 0,005
Canxi alginate liều 500 mg/kg/ngày	0,414 ± 0,017	0,119 ± 0,005	0,043 ± 0,006
Canxi alginate liều 1000 mg/kg/ngày	0,415 ± 0,016	0,118 ± 0,003	0,044 ± 0,005

Bảng 3.40. cho thấy: Trọng lượng gan, thận và lách trên 10 gram thể trọng ở lô uống Canxi alginate liều 500mg/kg/ngày và liều 1000 mg/kg/ngày so với đối chứng đều không có sự sai khác thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy:

- Canxi alginate không gây độc cấp tính cho chuột nhắt trắng theo đường uống với mức liều thử nghiệm tối đa là 2,5 g/kg thể trọng.

- Canxi alginate liều 500 mg/kg/ngày khi cho uống bán trường diễn trong thời gian 28 ngày không làm ảnh hưởng đến sự tăng trọng lượng của chuột thí nghiệm so với đối chứng ($p > 0,05$), không làm ảnh hưởng đến các chỉ tiêu huyết học so với lô đối chứng ($p > 0,05$), không ảnh hưởng đến trọng lượng gan, thận, lách so với đối chứng ($p > 0,05$), không làm tăng chỉ số AST, ALT của gan so với đối chứng, không ảnh hưởng đến chỉ số enzyme thận cơ bản so với lô đối chứng ($p > 0,05$).

- Canxi alginate liều 1000 mg/kg/ngày khi cho uống bán trường diễn trong thời gian 28 ngày không làm ảnh hưởng đến sự tăng trọng lượng của chuột thí nghiệm so với đối chứng ($p > 0,05$), không làm ảnh hưởng đến các chỉ tiêu huyết học khác so với lô đối chứng ($p > 0,05$), không ảnh hưởng đến trọng lượng gan, thận, lách so với đối chứng ($p > 0,05$), không làm tăng chỉ số AST, ALT của gan so với đối chứng.

3.6.4. Đánh giá tác dụng đào thải kim loại nặng của Canxi alginate

Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở bảng 3.41.

Bảng 3.41. Kết quả thử nghiệm trên động vật thí nghiệm

Nhóm	Hàm lượng kim loại có trong bộ phận ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột)			
	Gan	Tim	Thận	Xương đùi
	Sau 3 tuần (gây độc kim loại nặng) (tuần 1 đến 3)			
Đối chứng	0	0	0	0

Nhóm 1 (gây độc chì)	72.5 ± 8.7	71.5 ± 9.2	323.7 ± 30.9	1508.2 ± 195.2
Nhóm 2 (gây độc cadimin)	79.9±7.7	78.0±15.9	320.2±29.5	1561.8±201.1
Nhóm 3 (gây độc thủy ngân)	74.5±8.7	82.1±18.9	322.7±32.5	1611.8±221.7
	Sau 3 tuần gây độc đồng thời sử dụng muối canxi alginate (tuần 1 đến 3)			
Nhóm 4 (gây độc chì và được uống canxi alginate)	41.8 ± 6.5	39.7 ± 6.2	198.5 ± 18.4	958.8 ± 91.1
Nhóm 5 (gây độc cadimi và được uống canxi alginate)	39.9±5.9	38.5±6.1	199.5±16.5	951.8±104.3
Nhóm 6 (gây độc thủy ngân và được uống canxi alginate)	44.8±7.1	47.5±8.5	205±19.7	1121±122.7
	3 tuần tiếp tục cho chuột ăn canxi alginate và ngừng gây độc (tuần 4 đến 6)			
Nhóm 4 (dùng gây độc chì và được uống canxi alginate)	32.4 ± 2.1	31.6 ± 2.2	123.3 ± 6.2	768.8 ± 31.2
Nhóm 5 (dùng gây độc cadimi và được uống canxi alginate)	31.2±3.2	30.1 ± 2.1	129.4 ± 6.5	731.8 ± 44.3
Nhóm 6 (dùng gây độc thủy ngân và được uống canxi alginate)	35.7±3.1	34.2±3.5	131.2 ± 7.3	782.5 ± 52.5
	3 tuần tiếp tục cho chuột ăn canxi alginate và ngừng gây độc (tuần 7 đến 9)			

Nhóm 4 (dùng gây độc chì và được uống canxi alginate)	24.4 ± 1.8	24.2 ± 1.5	78.8 ± 4.5	578.6 ± 41.1
Nhóm 5 (dùng gây độc cadimi và được uống canxi alginate)	23.9 ± 1.7	24.5 ± 1.4	79.7 ± 5.1	561.8 ± 44.3
Nhóm 6 (dùng gây độc thủy ngân và được uống canxi alginate)	24.8 ± 2.1	26.1 ± 1.5	80.5 ± 4.7	587.8 ± 42.4

Từ kết quả ở trên có thể thấy, sau 3 tuần gây độc bằng các muối chì axetate, cadimi axetate và thủy ngân axetate thì hàm lượng các kim loại nặng trong các bộ phận như gan, tim, thận và xương đùi của động vật thí nghiệm tăng lên đáng kể. Trong đó hàm lượng kim loại nặng tích trữ trong thận và xương đùi động vật thí nghiệm là cao nhất, trung bình lần lượt ở mức 321 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột) và 1567 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột); hàm lượng kim loại nặng tích trữ trong gan và tim thì thấp hơn và xấp xỉ tương đương nhau ở mức 78-79 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột).

Đối với nhóm 4,5 và 6: Chuột được gây độc đồng thời được cho ăn bổ sung muối canxialginate với liều lượng như phần bố trí thí nghiệm trong vòng 3 tuần cho kết quả sự tích tụ hàm lượng kim loại nặng trong các bộ phận gan, tim, thận và xương đùi của động vật thí nghiệm đều thấp hơn khoảng 1,5 đến 2 lần so với nhóm thí nghiệm 1,2,3 (nhóm không sử dụng bổ sung canxi alginate). Cụ thể hàm lượng kim loại nặng tích lũy trong gan và tim trong khoảng 39 – 47 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột); Hàm lượng kim loại nặng tích lũy trong thận là 198 – 205 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột) và hàm lượng kim loại nặng tích lũy trong xương vẫn là lớn nhất, dao động trong khoảng 958 – 1121 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột).

Sau 3 tuần bị gây độc kim loại nặng đồng thời bổ sung muối alginate, các nhóm này sau đó được dùng gây độc và tiếp tục được cho ăn bổ sung muối canxi alginate vào chế độ ăn uống theo liều sử dụng như ở bố trí thí nghiệm. Chúng tôi đã đánh giá hiệu quả đào thải kim loại nặng của các nhóm này sau lần lượt 3 tuần (tuần 4 đến 6) và 6 tuần tiếp theo (tuần 7 đến 9). Kết quả nghiên cứu được chỉ ra ở bảng 3.42 cho thấy:

- Sau 3 tuần tiếp theo (tuần 4 đến 6), tích lũy kim loại nặng ở gan, tim, thận và xương đùi của động vật thí nghiệm tiếp tục giảm nhưng sự giảm này là chậm hơn so với việc gây độc và đồng thời cho ăn bổ sung canxi alginate luôn. Cụ thể hàm lượng kim loại nặng tích lũy trong gan và tim dao động trong khoảng 30 – 35 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột); Hàm lượng kim loại nặng tích lũy trong thận là 123 – 131 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột) và hàm lượng kim loại nặng tích lũy trong xương vẫn là lớn nhất, dao động trong khoảng 731 – 782 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột).

- Sau 6 tuần tiếp theo (tuần 7 đến 9), tích lũy kim loại nặng ở gan, tim, thận và xương đùi của động vật thí nghiệm tiếp tục giảm nhưng sự giảm này tiếp tục chậm hơn mức giảm từ tuần 4 đến 6. Cụ thể hàm lượng kim loại nặng tích lũy trong gan và tim dao động trong khoảng 24 – 26 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột); Hàm lượng kim loại nặng tích lũy trong thận là 78 – 81 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột) và hàm lượng kim loại nặng tích lũy trong xương vẫn là lớn nhất, dao động trong khoảng 561 – 588 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột).

Điều này có thể giải thích là do thời gian tích lũy, hấp thụ kim loại nặng vào nội tạng và xương khá dài nên hiệu quả đào thải kim loại nặng của muối alginate sẽ giảm dần. Việc đào thải kim loại nặng của muối canxi alginate có hiệu quả cao nhất khi được sử dụng kịp thời ngay khi nhiễm độc kim loại nặng.

Như vậy có thể kết luận canxi alginate có tác dụng hỗ trợ đào thải kim loại nặng trên động vật bị nhiễm độc kim loại nặng. Cụ thể, đối với kết quả thí nghiệm in vitro trên động vật thí nghiệm vừa nêu ở trên. Với thời gian sử dụng canxi alginate liên tục 9 tuần với liều 0,1g/kg thể trọng/ngày giúp đào thải hàm lượng kim loại nặng ra khỏi cơ thể động vật đạt từ 60 - 70% tùy từng bộ phận cụ thể. Việc sử dụng kịp thời muối canxi alginate ngay sau khi nhiễm độc kim loại nặng sẽ cho hiệu quả đào thải độc cao hơn.

3.7. Nghiên cứu xử lý các phụ phẩm của quá trình chế biến

Phụ phẩm của quá trình chế biến rong sau khi chiết alginate chủ yếu là bã rong và một số dịch thải. Các thành phần này có độ pH khá cao (~ 10), vì vậy chúng tôi xử lý theo phương pháp sử dụng các chế phẩm vi sinh để lên men tạo phân bón hữu cơ.

3.7.1. Thành phần cơ bản của bã rong nâu sau khi chiết alginate

Khảo sát sơ bộ thành phần cơ bản của bã rong nâu sau khi chiết alginate cho thấy phần lớn là carbohydrat với C_{TS} 67,23%, trong đó chủ yếu là các cellulose không tan.

Hàm lượng tro là 15.76%, cho thấy trong bã rong chứa rất nhiều khoáng chất, có vai trò quan trọng trong việc bổ sung khoáng cho cây trồng khi chuyển hóa bã rong thành phân hữu cơ. Ngoài ra là một số tạp chất khác, protein không đáng kể, N_{TS} 1,34%.

Bảng 3.42. Thành phần cơ bản trong bã rong nâu sau khi chiết alginate

TT	Thành phần	Hàm lượng (%)
1	Độ ẩm	10.32
2	Độ tro	15.76
3	C_{TS}	67.23
4	N_{TS}	1.34
7	pH	8.7

Điều đáng chú ý, pH trong bã rong sau khi chiết alginate có pH kiềm 8,7, cần điều chỉnh pH về trung tính để thuận lợi cho các vi sinh vật hoạt động hiệu quả.

3.7.2. Nghiên cứu lựa chọn chế phẩm vi sinh vật có khả năng phân giải bã rong nâu sau chiết alginate

Chế phẩm vi sinh được lựa chọn là những sản phẩm có sẵn trên thị trường, giá thành phù hợp, có chứa các chủng vi sinh có khả năng phân giải mạnh cellulose, protein, pectin,... như *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *Lactobacillus acidophilus*,.... *Lactobacillus plantarum*, *Streptomyces sp.*, *Saccharomyces cerevisiae* với hàm lượng mỗi chủng là $10^7 - 10^8$ CFU/g.

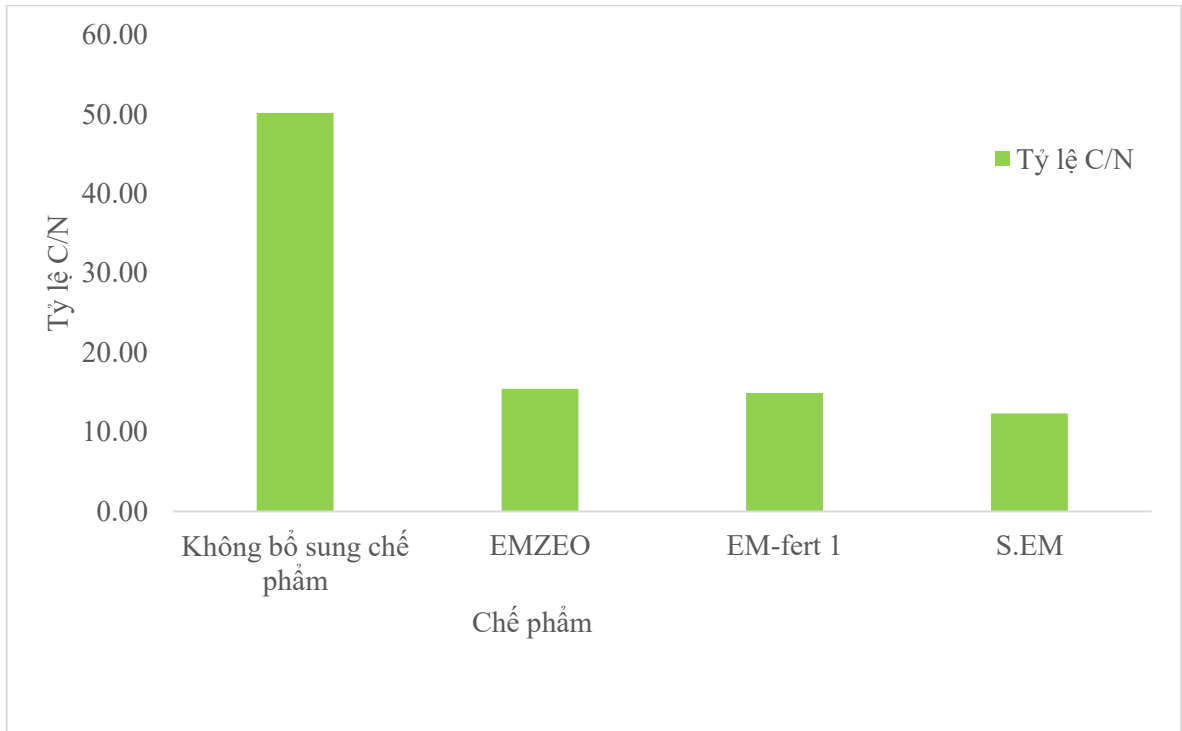
Tiến hành ủ bã rong với bột chế phẩm với tỷ lệ 0,5% trong 6 tuần, độ ẩm khối ủ là 50-55%, cứ 1 tuần có đảo trộn một lần. Xác định hàm lượng C tổng số và N tổng số:

Bảng 3.43. Ảnh hưởng của loại chế phẩm đến tỷ lệ C/N của khối ủ

TT	Chế phẩm	C_{TS}	N_{TS}	Tỷ lệ C/N
1	Không bổ sung chế phẩm	67.23	1.34	50.17
2	Chế phẩm EMZEO	39.54	2.56	15.45
3	Chế phẩm EM-fert 1	39.77	2.67	14.90
4	Chế phẩm S.EM	37.12	3.01	12.33

Kết quả cho thấy, ba chế phẩm vi sinh lựa chọn đều hiệu quả trong việc xử lý các hợp chất hữu cơ từ bã rong nâu sau khi chiết alginate. Nhóm phân giải cellulose hoạt động để đồng hóa cơ chất và tạo điều kiện cho hoạt động của các vi sinh vật khác. Khi so sánh tỷ lệ C/N giữa các đồng ủ có bổ sung chế phẩm vi sinh và đối chứng

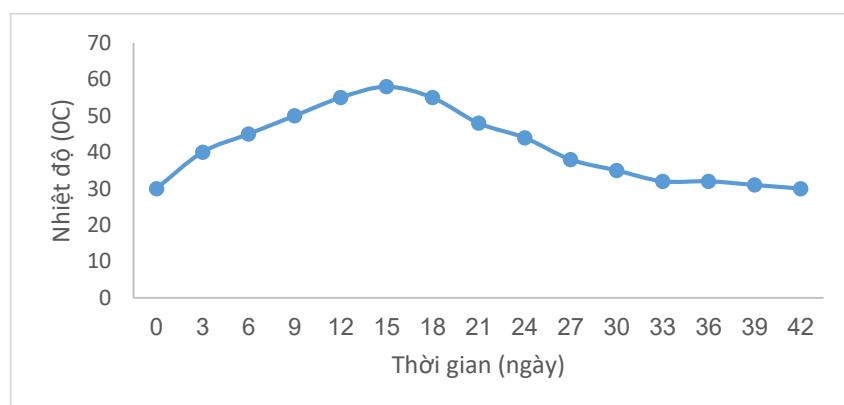
là không bổ sung chế phẩm cho thấy, sau 6 tuần tỷ lệ C/N đã giảm mạnh giữa lô không bổ sung chế phẩm (C/N: 50,17%) xuống còn xấp xỉ 12-15%. Điều đó cho thấy, ba chế phẩm lựa chọn đều có hiệu quả phân giải bã rong sau chiết alginat. Tỷ lệ C/N đạt 10-15 đạt tiêu chuẩn phân bón, tuy nhiên chế phẩm S.EM có tỷ lệ C/N 12,33 có kết quả tốt nhất được lựa chọn.



Hình 3.30. Ảnh hưởng của loại chế phẩm đến tỷ lệ C/N của khối ủ

3.7.3. Theo dõi sự biến động của một số yếu tố trong quá trình ủ bã rong bằng chế phẩm S.EM

a. Ảnh hưởng của nhiệt độ

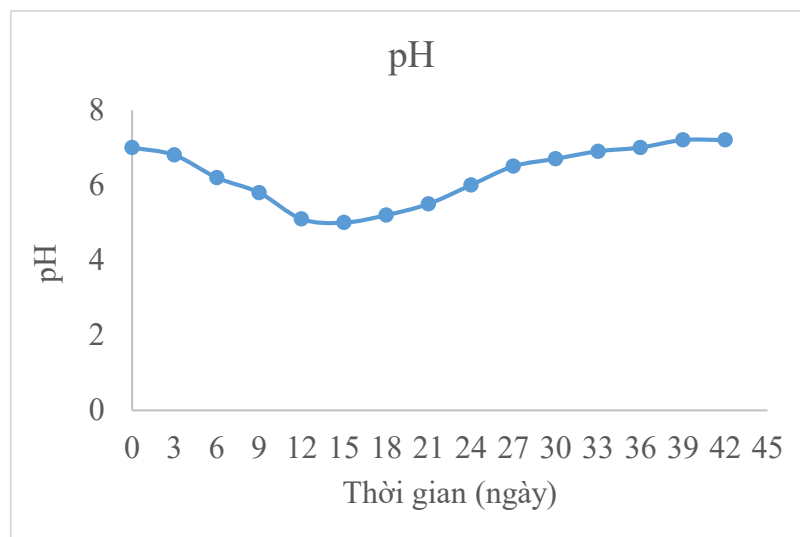


Hình 3.31. Theo dõi diễn biến nhiệt độ trong đống ủ

Kết quả theo dõi quá trình ủ bã rong bằng chế phẩm S.EM cho thấy nhiệt độ tăng mạnh mẽ trong 2 tuần đầu, các xạ khuẩn ưa nhiệt trong chế phẩm như

Streptomyces sp. hoạt động mạnh mẽ, sử dụng chất thải hữu cơ để đồng hóa và phát triển mạnh. Nhiệt độ cao nhất vào ngày thứ 15 (58⁰C). Ban đầu, nhiệt độ tăng cao ngăn chặn vi sinh vật gây thối phát triển, tạo điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật sau đó như *Baccilus* sp. đồng hóa các hợp chất hữu cơ. Sau đó, nhiệt độ khối ủ giảm dần, tạo điều kiện cho nấm sợi và nấm men hoạt động. Chính vì vậy, sau khoảng 4 -5 tuần, nhiệt độ giảm mạnh xuống còn 32⁰C, đồng thời khối ủ chuyển sang màu đen, tơi, xốp mềp và không có mùi hôi thối khó chịu.

b. Theo dõi sự biến động pH



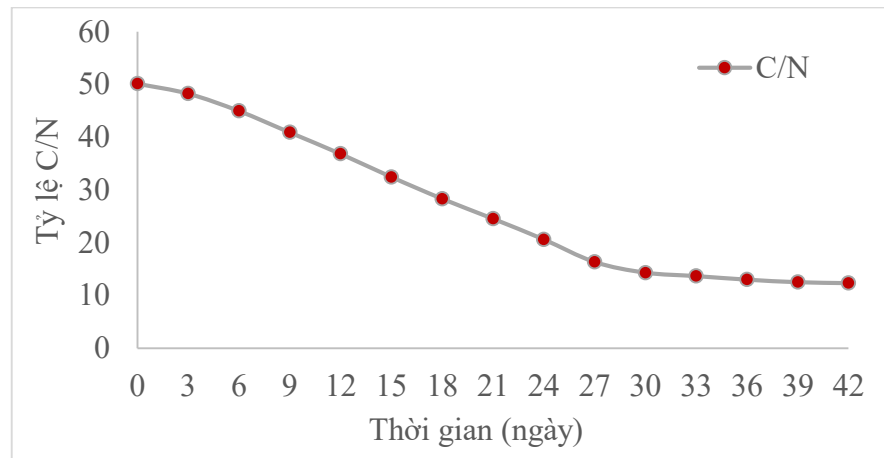
Hình 3.32. Theo dõi sự biến động pH trong đống ủ

Trong thời gian đầu, vi sinh vật trong khối ủ hoạt động mạnh sẽ phân giải thành phần chất hữu cơ, đặc biệt là cellulose tạo thành các acid hữu cơ làm pH thay đổi. Từ ngày 21 trở đi pH của đống ủ tăng dần và dừng lại ở khoảng trung tính.

Điểm đặc biệt là pH của bã rong sau khi chiết fuicoidan và alginat có tính kiềm, pH 9,7. Vì vậy, trước khi phối trộn với vi sinh làm phân bón, nguồn bã rong cần được tiền xử lý trong quá trình ủ.

c. Theo dõi sự biến động của tỷ lệ C/N qua thời gian

Sự thay đổi tỷ lệ C/N trong suốt quá trình ủ 21 ngày bổ sung chế phẩm vi sinh



Hình 3.33. Theo dõi tỷ lệ C/N trong đồng ủ

3.7.4. Đánh giá thành phần phân bón hữu cơ từ bã rong sau khi chiết alginate

Sau 6 tuần ủ, bã rong sau (khi chiết alginate) có màu nâu, hơi vàng chuyển thành phân hữu cơ màu đen, tối xốp, sờ thấy mềm tay, không có mùi hôi thối khó chịu. Kết quả chỉ ra ở hình 3.34 và bảng 3.44.



(a)



(b)

Hình 3.34. Bã rong trước khi ủ (a) và sau khi ủ 6 tuần (b)

Bảng 3.44. Một số chỉ tiêu đánh giá bã rong trước và sau khi ủ chế phẩm S.EM

TT	Chỉ tiêu đánh giá	Đơn vị	Trước khi ủ	Sau khi ủ
1	Cảm quan		Màu nâu nhạt, bã rong dai, cứng	Màu đen, xốp. mềm
2	OC	%	67.23	37.12
3	N _{TS}	%	1.34	3.01
4	P ₂ O ₅	%	0,05	0,20
5	K ₂ O	%	1,77	2,15

Dưới tác dụng của hệ vi sinh vật trong chế S.EM, tính chất lý hóa của bã rong biển có sự thay đổi nhất định. Hàm lượng OC giảm xuống còn các hàm lượng N_{TS}, P₂O₅ và K₂O tăng. Như vậy, việc bổ sung vi sinh vật hữu ích rất cần thiết cho quá trình ủ, làm tăng khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ trong bã rong thành chất mùn.

KẾT LUẬN

1. Luận án đã đưa ra quy trình công nghệ chế biến toàn diện rong mơ *Sargasum. Sp.* thành các sản phẩm có giá trị cao như fucoxanthin, phlorotantin, fucoidan và alginat theo phương pháp tích hợp các kỹ thuật tiên tiến (enzyme, siêu âm, ly tâm 3 pha và lọc màng) hiệu quả với khả năng thu hồi đồng bộ và hiệu suất cao các sản phẩm và hạn chế tối đa chất thải từ nguồn nguyên liệu rất dồi dào, có sẵn trong tự nhiên.

2. Đã xây dựng quy trình công nghệ chiết xuất phenolic từ rong nâu theo phương pháp vi sóng; nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng và tối ưu hóa điều kiện chiết xuất phenolic từ rong nâu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM); đã đánh giá hoạt tính chống oxi hóa và gây độc tế bào *in vitro* của phenolic ở mức trung bình.

3. Đã nghiên cứu quá trình tích hợp một số công nghệ tiên tiến để thu nhận alginate; nghiên cứu hoạt tính chống loãng xương, đánh giá độ an toàn và hiệu lực của chế phẩm gel canxi alginate. Kết quả cho thấy không ghi nhận độc tính của các chế phẩm ở liều kiểm định. Ở nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$ và 4 $\mu\text{g/ml}$, canxi alginat thể hiện có khả năng tăng cường hoạt động của enzyme ALP, tăng cường tổng hợp collagen và kích thích tạo khoáng ở mức có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm, cụ thể: % kích thích hoạt động ALP là 124,41% (20 $\mu\text{g/ml}$) và 118,16% (4 $\mu\text{g/ml}$); % collagen được tổng hợp 111,10% (20 $\mu\text{g/ml}$); % kích thích tạo khoáng 115,42% (4 $\mu\text{g/ml}$). Chế phẩm gel alginate ghi nhận tác dụng đào thải các kim loại nặng ở chuột khi sử dụng bắt đầu từ liều thử 0,1g/ kg chuột.

4. Đã khảo sát, đánh giá các loài rong nâu tại vùng biển Việt Nam, kết quả cho thấy: **(i)** Chi rong Mơ thuộc họ rong Nâu có tiềm năng lớn về trữ lượng cũng như chất lượng để phân lập alginate với hàm lượng alginate trung bình lên tới trên 30%; **(ii)** Các mẫu rong có hàm lượng lipid tổng từ 0,07 tới 2,11%; đều có mặt các acid béo no, không no một nối đôi và đặc biệt là các acid béo không no đa nối đôi (PUFA).

5. Đã nghiên cứu dự đoán khả năng ức chế enzyme Tyrosinase của một số hợp chất chiết xuất từ chi rong mơ, qua đó định hướng phát triển sản phẩm làm trắng da từ các hoạt chất chiết xuất từ rong nâu.

Kiến nghị:

- Tiếp tục nghiên cứu, định hướng tạo thêm một số sản phẩm giá trị khác từ rong nâu (chiết xuất hợp chất phlorotanin ứng dụng trong mỹ phẩm, chiết xuất khoáng vi lượng, vitamin, lipit... ứng dụng trong sản xuất thực phẩm chức năng...).
- Tạo chế phẩm hoàn thiện từ canxi alginate để giải độc kim loại.

CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Tran Quoc Toan, **Tran Duy Phong**, Dam Duc Tien, Nguyen Manh Linh, Nguyen Thi Mai Anh, Pham Thi Hong Minh, Le Xuan Duy, Do Huu Nghi, Hai Ha Pham Thi, Pham Tri Nhut, Ho Sy Tung, and Nguyen Quang Tung: Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phlorotannin From *Sargassum swartzii* (Turn.) C. Ag. With Ethanol/Water; Natural Product Communications. 2021, Vol 16(2): 1–11. Doi: 10.1177/1934578X21996184.

2. Trần Quốc Toàn; Phạm Quốc Long; Hoàng Thị Bích; **Trần Duy Phong**; Phạm Minh Quân: GPHI thuộc Bằng độc quyền Giải pháp hữu ích số 2606 “Quy trình chế biến rong mơ (*Sargassum.SP*) để thu các sản phẩm Fucoxanthin, Phlorotannin, Fucoidan và Alginate theo phương pháp sử dụng sóng siêu âm cường độ cao kết hợp enzym”, cấp theo quyết định số 3750w/QĐ-SHTT, 08/3/2021, Cục sở hữu trí tuệ Việt Nam.

3. Đặng Thị Phương Ly, **Trần Duy Phong**, Trần Quốc Toàn, Đoàn Lan Phương, Trịnh Thu Hương, Đặng Thị Minh Tuyết, Đào Thị Kim Dung, Lại Phương Phương Thảo, Hoàng Thị Bích, Phạm Minh Quân, Đàm Đức Tiến, Lưu Văn Huyền, Phạm Quốc Long: Bước đầu đánh giá hàm lượng Lipid và thành phần Acid béo của một số loài rong nâu khu vực biển Bắc và trung Trung Bộ - Việt Nam; Tuyển tập báo cáo khoa học Diễn đàn khoa học toàn quốc, 2019, 579-585.

4. Trịnh Thị Thu Hương, Đào Thị Kim Dung, Phạm Thu Huệ, Lê Tất Thành, Đỗ Thị Thảo, Nguyễn Thị Cúc, Phạm Minh Quân, Trần Quốc Toàn, **Trần Duy Phong**, Phạm Quốc Long: Đánh giá chỉ tiêu sinh hóa và hoạt tính chống loãng xương của hoạt chất canxi alginate từ nguồn rong biển Việt Nam; Tuyển tập báo cáo khoa học Diễn đàn khoa học toàn quốc, 2019.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kawai, H., & Henry, E. C. (2016). Phaeophyta (Phaeophyta/Heterokonta/Ochrophyta). *Handbook of the Protists*, 1-38.
2. Yoon, H. S., Andersen, R. A., Boo, S. M., & Bhattacharya, D. (2009). Stramenopiles. In *Encyclopedia of microbiology* (pp. 721-731).
3. Myklestad, S. M., & Granum, E. (2009). Biology of (1, 3)- β -glucans and related glucans in protozoans and chromistans. In *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides* (pp. 353-385). Academic Press.
4. Đàm Đức Tiến, Trần Quốc Toàn, Phạm Quốc Long, 2020. Các loài rong biển thường gặp ở vùng biển Việt Nam và giá trị sử dụng. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ
5. Aizawa M., Asaoka K., Atsumi M., Sakao T. (2009). Seaweed Bioethanol Production in Japan, the Ocean Sunrise Project. *Oceans*
6. Titlyano E. A., and T. V. Titlyanova, 2012 Marine Plants of the asian Pacific region countries, their use and cultivation. P. H. Vladivostok. Dalnauka. 376 p
7. Holdt, S. L., Kraan, S., 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* 23, 543-597.
8. Hakim, M.M., Patel, I.C. A review on phytoconstituents of marine brown algae. *Futur J Pharm Sci* 6, 129 (2020). <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00147-6>
9. Ito, K., & Hori, K. (1989). Seaweed: chemical composition and potential food uses. *Food reviews international*, 5(1), 101-144.
10. Kumar, C. S., Ganesan, P., Suresh, P. V., & Bhaskar, N. (2008). Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 45(1), 1.
11. Kimura Y, Watanabe K, Okuda H (1996) Effects of soluble sodium alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats. *J Ethnopharmacol* 54:47–54
12. Zee S (1991) Body weight loss with the aid of alginic acid. *Arc Intern Med* 3-4:113–114
13. Vaugelade P, Hoebler C, Bernard F, Guillon F, Lahaye M, Duee PH, Darcy-Vrillon B (2000) Non-starch polysaccharides extracted from seaweed can

modulate intestinal absorption of glucose and insulin response in the pig. *Reprod Nutr Dev* 40:33–47

14. Segal HC, Hunt BJ, Gilding K (1998) The effects of alginate and nonalginate wound dressings on blood coagulation and platelet activation. *J Biomater Appl* 12:249–257

15. Berteau O, Mulloy B (2003) Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* 13:29R–40R

16. Li N, Zhang QB, Song JM (2005) Toxicological evaluation of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* in Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 43:421–426

17. Wu XW, Yang ML, Huang XL, Yan J, Luo Q (2003) Effect of fucoidan on splenic lymphocyte apoptosis induced by radiation. *Chin J Radiol Med Prot* 23:43–50

18. Mandal P, Mateu CG, Chattopadhyay K, Pujol CA, Damonte EB, Ray B (2007) Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. *Antiviral Chem Chemother* 18:153–162

19. Iqbal M, Flick-Smith H, McCauley JW (2000) Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E-rns with cell surface glycosaminoglycans. *J Gen Virol* 81:451–459

20. Li F, Tian TC, Shi YC (1995) Study on anti virus effect of fucoidan in vitro. *J Norman Bethune Univ Med Sci* 21:255–257

21. Aisa Y, Miyakawa Y, Nakazato T, Shibata H, Saito K, Ikeda Y, Kizaki M (2005) Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *Am J Hematol* 78:7–14

22. Xue CH, Chen L, Li ZJ, Cai YP, Lin H, Fang Y (2004) Antioxidative activities of low molecular fucoidans from kelp *Laminaria japonica*. *Dev Food Sci* 42:139–145

23. Hu JF, Geng MY, Zhang JT, Jiang HD (2001) An in vitro study of the structure–activity relationships of sulfated polysaccharide from brown algae to its antioxidant effect. *J Asian Nat Prod Res* 3:353–358

24. Deville C, Damas J, Forget P, Dandrifosse G, Peulen O (2004) Laminarin in the dietary fibre concept. *J Sci Food Agric* 84:1030–1038

25. Miao HQ, Elkin M, Aingorn E, Ishai-Michaeli R, Stein CA, Vlodaysky I (1999) Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Int J Cancer* 83:424–43
26. Nabors LOB (2004) Alternative sweeteners. *Agro Food Industry HiTech* 15:39–41
27. Fleurence J (2004) Seaweed proteins. In: Yada RY (ed) *Proteins in food processing*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp 197– 213
28. Munda IM (1977) Differences in amino acid composition of estuarine and marine fucoids. *Aquat Bot* 3:273–280
29. Dawczynski C, Schubert R, Jahreis G (2007) Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chem* 103:891–899
30. Fujiwara-Arasaki T, Mino N, Kuroda M (1984) The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan. *Hydrobiologia* 116/117:513–516
31. Martino AD, Douady D, Quinet-Szely M, Rousseau B, Crépineau F, Apt K, Caron L (2004) The light-harvesting antenna of brown algae. Highly homologous proteins encoded by a multigene family. *Eur J Biochem* 267:5540–5549
32. Sato M, Hosokawa T, Yamaguchi T, Nakano T, Muramoto K, Kahara T, Funayama K, Kobayashi A, Nakano T (2002) Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 50:6245–6252
33. Suetsuna K, Maekawa K, Chen JR (2004) Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem* 15:267–272
34. Suetsuna K (1998b) Separation and identification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from peptic digest of *Hizikia fusiformis* protein. *Nippon Suisan Gakkaishi* 64:862–866
35. Cha SH, Ahn GN, Heo SJ, Kim KN, Lee KW, Song CB, Cho SK, Jeon YJ (2006) Screening of extracts from marine green and brown algae in Jeju for potential marine angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35:307–314

36. Bhakuni DS, Rawat DS (2005) Bioactive metabolites of marine algae, fungi and bacteria. In: Bioactive marine natural products. Copublished by Anamaya Publishers and Springer, New Delhi, pp 1–25
37. Bhaskar N, Hosokawa M, Miyashita K 2004c. Comparative evaluation of fatty acid composition of different Sargassum (Fucales, Phaeophyta) species harvested from temperate and tropical waters. *J Aquatic Product Technol* 3:53-70
38. Jones AL, Harwood JL (1992) Lipid composition of the brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 31:3397–3403
39. Dembitsky VM, Rozentsvet OA, Elena EP 1990. Glycolipids, phospholipids and fatty acids of brown algae species. *Phytochem* 29:3417-3421
40. Sanchez-Machado DI, Lopez-Hernandez J, Paseiro-Losada P, LopezCervantes J (2004b) An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomed Chromatogr* 18:183–190
41. Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Miyashita K (2008b) Antiobesity effect of fucoxanthin from edible seaweeds and its multibiological functions. *ACS Symp Ser* 993:376–388
42. Haugan JA, Liaaen-Jensen S (1989) Algal carotenoids.43. Improved isolation procedure for fucoxanthin. *Phytochemistry* 28:2797– 2798
43. Nakazawa Y, Sashima T, Hosokawa M, Miyashita K (2009) Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomers of fucoxanthin in human cancer cell lines. *J Funct Foods* 1:88–97
44. Kotake-Nara E, Kushiro M, Zhang H, Sugawara T, Miyashita K, Nagao A (2001) Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *J Nutr* 131:3303–3306
45. Okuzumi J, Takahashi T, Yamane T, Kitao Y, Inagake M, Ohya K, Nishino H, Tanaka Y (1993) Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mouse duodenal carcinogenesis. *Cancer Lett* 68:159–168
46. Miyashita H, Hosokawa M (2008) Beneficial health effects of seaweed carotenoid, fucoxanthin. In: Barrow C, Shahidi F (eds) *Marine nutraceuticals and functional foods*. CRC, Boca Raton, pp 297–320

47. Hosokawa M, Wanezaki S, Miyauchi K, Kuniyama H, Kohno H, Kawabata J, Odashima S, Takahashi K (1999) Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell line HIL-60. *Food Sci Technol Res* 5:243–246
48. Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama K, Miyashita K (2005) Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 332:392–397
49. Heo SJ, Park PJ, Park EJ, Cho SK, Kim SK, Jeon YJ 2005a. Antioxidant effect of proteolytic hydrolysates from *Ecklonia cava* on radical scavenging using ESR and H₂O₂ induced DNA damage. *Food Sci Biotechnol* 14:614-620
50. Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ 2005b. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technol* 96:1616-1623
51. Lim SN, Cheung PCK, Ooi VEC, Ang PO 2002. Evaluation of antioxidative activity of extracts from brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *J Agric Food Chem* 50:3862-3866
52. Chkikvishvili ID, Ramazanov ZM 2000. Phenolic substances of brown algae and their antioxidant activity. *Appl Biochem Microbiol* 36:289-291
53. Eide I, Mykkestad S, Melson S 1980. Longterm uptake and release of heavy metals by *Ascophyllum nodosum* (L). *Environ Pollut* 23:19-28
54. Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *J Antimicrobial Chemotherapy* 50:889-893
55. Nakamura T, Nagayama K, Uchida K, Tanaka R 1996. Antioxidant activity of phlorotannins from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fish Sci* 62:923-926
56. Nakayama Y, Takahashi M, Fukuyama Y, Kinzyo Z 1989. An antiplasmin inhibitor, echol, isolated from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Agric Biol Chem* 63:3025-3030
57. Kang HS, Kim YT, Byun HG, Son BW, Jung HA, Choi JS 2004. Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. *Arch Pharm Res* 27:194-198

58. Kang K, Park Y, Hwang HJ, Kim SH, SH, Lee JG, Shin HC 2003. Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agent against vascular risk factors. *Arch Pharm Res* 26:286-293
59. Swanson AK, Druehl LD 2002. Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquatic Bot* 73:241-253
60. Lobban CS, Harrison PJ (1994) *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, 384 pp
61. Morrissey J, Kraan S, Guiry MD (2001) *A guide to commercially important seaweeds on the Irish coast*. Bord Iascaigh Mhara, Dublin, 66 pp
62. Müssig K (2009) Iodine-induced toxic effects due to seaweed consumption. In Preedy VR, Burrow GN, Watson R (eds) *Comprehensive handbook of iodine*. Elsevier, New York, pp 897–908
63. Rhein-Knudsen, N., Ale, M. T., & Meyer, A. S. (2015). Seaweed hydrocolloid production: an update on enzyme assisted extraction and modification technologies. *Marine drugs*, 13(6), 3340-3359.
64. Beata Łabowska, M., Michalak, I., & Detyna, J. (2019). Methods of extraction, physicochemical properties of alginates and their applications in biomedical field—a review. *Open Chemistry*, 17(1), 738-762.
65. Saji, S., Hebden, A., Goswami, P., & Du, C. (2022). A brief review on the development of alginate extraction process and its sustainability. *Sustainability*, 14(9), 5181.
66. Phạm Quốc Long & cs., Báo cáo tổng kết đề tài “Nghiên cứu quy trình tạo chế phẩm Catosal từ rong Nâu làm thực phẩm chức năng có tác dụng đào thải kim loại nặng”, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2009
67. Youssouf, L.; Lallemand, L.; Giraud, P.; Soulé, F.; Bhaw-Luximon, A.; Meilhac, O.; D’Hellencourt, C.L.; Jhurry, D.; Couprie, J. Ultrasound-assisted extraction and structural characterization by NMR of alginates and carrageenans from seaweeds. *Carbohydr. Polym.* 2017, 166, 55–63
68. Yuan, Y.; Macquarrie, D.J. Microwave assisted step-by-step process for the production of fucoidan, alginate sodium, sugars and biochar from *Ascophyllum nodosum* through a biorefinery concept. *Bioresour. Technol.* 2015, 198, 819–827

69. Torabi, P.; Hamdami, N.; Keramat, J. Microwave-assisted extraction of sodium alginate from brown macroalgae *Nizimuddinia zanardini*, optimization and physicochemical properties. *Sep. Sci. Technol.* 2022, *57*, 872–885
70. Borazjani, N.J.; Tabarsa, M.; You, S.; Rezaei, M. Effects of extraction methods on molecular characteristics, antioxidant properties and immunomodulation of alginates from *Sargassum angustifolium*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017, *101*, 703–711
71. Okolie, C.L.; Mason, B.; Mohan, A.; Pitts, N.; Udenigwe, C.C. Extraction technology impacts on the structure-function relationship between sodium alginate extracts and their in vitro prebiotic activity. *Food Biosci.* 2020, *37*, 100672
72. Vauchel, P., Kaas, R., Arhaliass, A., Baron, R., & Legrand, J. (2008). A new process for extracting alginates from *Laminaria digitata*: reactive extrusion. *Food and bioprocess technology*, *1*, 297-300.
73. Sugiono, S.; Masruri, M.; Estiasih, T.; Widjanarko, S.B. Optimization of extrusion-assisted extraction parameters and characterization of alginate from brown algae (*Sargassum cristaefolium*). *J. Food Sci. Technol.* 2019, *56*, 3687–3696
74. Dobrinčić, A., Balbino, S., Zorić, Z., Pedisić, S., Bursać Kovačević, D., Elez Garofulić, I., & Dragović-Uzelac, V. (2020). Advanced technologies for the extraction of marine brown algal polysaccharides. *Marine drugs*, *18*(3), 168.
75. Lim, S.J.; Wan Aida, W.M. Extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. In *Seaweed Polysaccharides*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 27–46. ISBN 9780128098172.
76. Ale, M. T., & Meyer, A. S. (2013). Fucoidans from brown seaweeds: An update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *Rsc Advances*, *3*(22), 8131-8141.
77. January, G.G.; Naidoo, R.K.; Kirby-McCullough, B.; Bauer, R. Assessing methodologies for fucoidan extraction from South African brown algae. *Algal Res.* 2019, *40*, 101517
78. Liu, J.; Wu, S.-Y.; Chen, L.; Li, Q.-J.; Shen, Y.-Z.; Jin, L.; Zhang, X.; Chen, P.-C.; Wu, M.-J.; Choi, J.; et al. Different extraction methods bring about distinct physicochemical properties and antioxidant activities of *Sargassum fusiforme* fucoidans. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019.

79. Rodriguez-Jasso, R.M.; Mussatto, S.I.; Pastrana, L.; Aguilar, C.N.; Teixeira, J.A. Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydr. Polym.* 2011, 86, 1137–1144.
80. Du, B., Zhao, Q., Cheng, C., Wang, H., Liu, Y., Zhu, F., & Yang, Y. (2022). A critical review on extraction, characteristics, physicochemical activities, potential health benefits, and industrial applications of fucoidan. *EFood*, 3(4), e19.
81. Lorbeer, A. Z., Lahnstein, J., Fincher, G. B., Su, P., & Zhang, W. (2015). Kinetics of conventional and microwave-assisted fucoidan extractions from the brown alga, *Ecklonia radiata*. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 2079–2087.
82. Yuan, Y.; Macquarrie, D. Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydr. Polym.* 2015, 129, 101–107.
83. Alboofetileh, M.; Rezaei, M.; Tabarsa, M.; Rittà, M.; Donalisio, M.; Mariatti, F.; You, S.G.; Lembo, D.; Cravotto, G. Effect of different non-conventional extraction methods on the antibacterial and antiviral activity of fucoidans extracted from *Nizamuddinina zanardinii*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 124, 131–137
84. Okolie, C.L.; Mason, B.; Mohan, A.; Pitts, N.; Udenigwe, C.C. The comparative influence of novel extraction technologies on in vitro prebiotic-inducing chemical properties of fucoidan extracts from *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocoll.* 2019, 90, 462–471
85. Ren, B.; Chen, C.; Li, C.; Fu, X.; You, L.; Liu, R.H. Optimization of microwave-assisted extraction of *Sargassum thunbergii* polysaccharides and its antioxidant and hypoglycemic activities. *Carbohydr. Polym.* 2017, 173, 192–201
86. Suprunchuk, V. (2021). Ultrasonic-treated fucoidan as a promising therapeutic agent. *Polymers in Medicine*, 51(2), 85-90
87. Wan, P., Yang, X. M., Cai, B. N., Chen, H., Sun, H. L., Chen, D. K., & Pan, J. Y. (2015). Ultrasonic extraction of polysaccharides from *Laminaria japonica* and their antioxidative and glycosidase inhibitory activities. *Journal of Ocean University of China*, 14(4), 651–662
88. Flórez-Fernández N, López-García M, González-Muñoz MJ, López Vilariño JM, Domínguez H. Ultrasound-assisted extraction of fucoidan from *Sargassum muticum*. *J Appl Phycol.* 2017;29:1553–1561

89. Hanjabam MD, Kumar A, Tejpal CS, Krishnamoorthy E, Kishore P, Kumar KA. Isolation of crude fucoidan from *Sargassum wightii* using conventional and ultra-sonication extraction methods. *Bioact Carbo-hydrates Diet Fibre*. 2019;20:100200.

90. Alboofetileh M, Rezaei M, Tabarsa M, You S. Ultrasound-assisted extraction of sulfated polysaccharide from *Nizamuddinina zanardinii*: Process optimization, structural characterization, and biological properties. *J Food Process Eng*. 2019;42(2):1–13.

91. My PLT, Sung VV, Dat TD, Nam HM, Phong MT, Hieu NH. Ultrasound-assisted extraction of fucoidan from Vietnamese brown seaweed *Sargassum mcclurei* and testing bioactivities of the extract. *ChemistrySelect*. 2020;5(14):4371–4380.

92. Alboofetileh M, Rezaei M, Tabarsa M, You SG. Bioactivities of *Nizamuddinina zanardinii* sulfated polysaccharides extracted by enzyme, ultrasound and enzyme-ultrasound methods. *J Food Sci Technol*. 2019;56(3):1212–1220.

93. Alboofetileh, M.; Rezaei, M.; Tabarsa, M. Enzyme-assisted extraction of *Nizamuddinina zanardinii* for the recovery of sulfated polysaccharides with anticancer and immune-enhancing activities. *J. Appl. Phycol*. 2018, 31, 1391–1402

94. Hammed, A.M.; Jaswir, I.; Simsek, S.; Alam, Z.; Amid, A. Enzyme aided extraction of sulfated polysaccharides from *Turbinaria turbinata* brown seaweed. *Int. Food Res. J*. 2017, 24, 1660–1666

95. Oh, J.Y., Kim, E.A., Kang, S.I., Yang, H.W., Ryu, B., Wang, L., Lee, J.S. and Jeon, Y.J., 2020. Protective effects of fucoidan isolated from celluclast-assisted extract of *Undaria pinnatifida* sporophylls against AAPH-induced oxidative stress in vitro and in vivo zebrafish model. *Molecules*, 25(10), p.2361

96. Nguyen, T. T., Mikkelsen, M. D., Tran, V. H. N., Trang, V. T. D., Rhein-Knudsen, N., Holck, J., ... & Meyer, A. S. (2020). Enzyme-assisted fucoidan extraction from brown macroalgae *Fucus distichus* subsp. *evanescens* and *Saccharina latissima*. *Marine drugs*, 18(6), 296

97. Saravana, P.S.; Cho, Y.J.; Park, Y.B.; Woo, H.C.; Chun, B.S. Structural, antioxidant, and emulsifying activities of fucoidan from *Saccharina japonica* using pressurized liquid extraction. *Carbohydr. Polym*. 2016, 153, 518–525

98. Santoyo, S.; Plaza, M.; Jaime, L.; Ibañez, E.; Reglero, G.; Señorans, J. Pressurized liquids as an alternative green process to extract antiviral agents from the edible seaweed *Himantalia elongata*. *J. Appl. Phycol.* 2011, 23, 909–917.
99. Saravana, P.S.; Choi, J.H.; Park, Y.B.; Woo, H.C.; Chun, B.S. Evaluation of the chemical composition of brown seaweed (*Saccharina japonica*) hydrolysate by pressurized hot water extraction. *Algal Res.* 2016, 13, 246–254
100. Rodríguez-Jasso, R. M., Mussatto, S. I., Pastrana, L., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2013). Extraction of sulfated polysaccharides by autohydrolysis of brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 31–39.
101. Men'shova, R. V., Lepeshkin, F. D., Ermakova, S. P., Pokrovskii, O. I., & Zvyagintseva, T. N. (2013). Effect of pretreatment conditions of brown algae by supercritical fluids on yield and structural characteristics of fucoidans. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(6), 923–926.
102. Huang, C. Y., Wu, S. J., Yang, W. N., Kuan, A. W., & Chen, C. Y. (2016). Antioxidant activities of crude extracts of fucoidan extracted from *Sargassum glaucescens* by a compressional-puffing-hydrothermal extraction process. *Food Chemistry*, 197, 1121–1129.
103. Saravana, P. S., Tilahun, A., Gerenew, C., Tri, V. D., Kim, N. H., Kim, G. D., Woo, H. U., & Chun, B. S. (2018). Subcritical water extraction of fucoidan from *Saccharina japonica*: Optimization, characterization and biological studies. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 579–590
104. Alboofetileh, M., Rezaei, M., Tabarsa, M., You, S. G., Mariatti, F., & Cravotto, G. (2019). Subcritical water extraction as an efficient technique to isolate biologically-active fucoidans from *Nizamuddinina zanardinii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 244–253.
105. Cotas, J., Leandro, A., Monteiro, P., Pacheco, D., Figueirinha, A., Gonçalves, A. M., ... & Pereira, L. (2020). Seaweed phenolics: From extraction to applications. *Marine drugs*, 18(8), 384.
106. Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Čagalj, M., & Popović Perković, Z. (2019). Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. *Biomolecules*, 9(6), 244.

107. Chew, Y.L.; Lim, Y.Y.; Omar, M.; Khoo, K.S. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT-Food Sci. Technol.* 2008, 41, 1067–1072.
108. López, A.; Rico, M.; Rivero, A.; de Tangil, M.S. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chem.* 2011, 125, 1104–1109
109. Otero, P.; López-Martínez, M.I.; García-Risco, M. Application of pressurized liquid extraction (PLE) to obtain bioactive fatty acids and phenols from *Laminaria ochroleuca* collected in Galicia (NW Spain). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019, 5, 86–92.
110. Machu, L.; Misurcova, L.; Vavra Ambrozova, J.; Orsavova, J.; Mlcek, J.; Sochor, J.; Jurikova, T. Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules* 2015, 20, 1118–1133.
111. Del Pilar Sánchez-Camargo, A.; Montero, L.; Stiger-Pouvreau, V.; Tanniou, A.; Cifuentes, A.; Herrero, M.; Ibáñez, E. Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae. *Food Chem.* 2016, 192, 67–74
112. Airanthi, M.K.; Hosokawa, M.; Miyashita, K. Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds. *J. Food Sci.* 2011, 76, C104–C111
113. Meng, W., Mu, T., Sun, H., & Garcia-Vaquero, M. (2021). Phlorotannins: A review of extraction methods, structural characteristics, bioactivities, bioavailability, and future trends. *Algal Research*, 60, 102484.
114. M. Magnusson, A.K.L. Yuen, R. Zhang, J.T. Wright, R.B. Taylor, T. Maschmeyer, R. de Nys, A comparative assessment of microwave assisted (MAE) and conventional solid-liquid (SLE) techniques for the extraction of phloroglucinol from brown seaweed, *Algal Res.* 23 (2017) 28–36
115. Grosso, C.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Andrade, P.B. Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds. *Mar. Drugs* 2015, 13, 3182–3230
116. V. Ummat, B.K. Tiwari, A.K. Jaiswal, K. Condon, M. Garcia-Vaquero, J. O'Doherty, C. O'Donnell, G. Rajauria, Optimisation of ultrasound frequency,

extraction time and solvent for the recovery of polyphenols, phlorotannins and associated antioxidant activity from brown seaweeds, *Mar. Drugs* 18 (2020)

117. Kadam, S.U.; O'Donnell, C.P.; Rai, D.K.; Hossain, M.B.; Burgess, C.M.; Walsh, D.; Tiwari, B.K. Laminarin from Irish brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Laminaria hyperborea*: Ultrasound assisted extraction, characterization and bioactivity. *Mar. Drugs* 2015, 13, 4270–4280.

118. S.U. Kadam, B.K. Tiwari, C.P. O'Donnell, Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 4667–4675

119. Lee, S.H.; Park, M.H.; Han, J.S.; Jeong, Y.; Kim, M.; Jeon, Y.J. Bioactive compounds extracted from gamtae (*Ecklonia cava*) by using enzymatic hydrolysis, a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Food Sci. Biotechnol.* 2012, 21, 1149–1155.

120. D. Rodrigues, S. Sousa, A. Silva, M. Amorim, L. Pereira, T.A.P. Rocha-Santos, A.M. P. Gomes, A.C. Duarte, A.C. Freitas, Impact of enzyme-and ultrasound-assisted extraction methods on biological properties of red, brown, and green seaweeds from the central west coast of Portugal, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 3177–3188.

121. M. Puspita, M. D'eniél, I. Widowati, O.K. Radjasa, P. Douzenel, C. Marty, L. Vandanon, G. Bedoux, N. Bourgougnon, Total phenolic content and biological activities of enzymatic extracts from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, *J. Appl. Phycol.* 29 (2017) 2521–2537.

122. N. Siriwardhana, K. Kim, K. Lee, S. Kim, J. Ha, C.B. Song, J. Lee, Y. Jeon, Optimisation of hydrophilic antioxidant extraction from *Hizikia fusiformis* by integrating treatments of enzymes, heat and pH control, *Int. J. Food Sci. Technol.* 43 (2008) 587–596

123. Zubia, M.; Fabre, M.S.; Kerjean, V.; Le Lann, K.; Stiger-Pouvreau, V.; Fauchon, M.; Deslandes, E. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chem.* 2009, 116, 693–701

124. Tierney, M.S.; Smyth, T.J.; Hayes, M.; Soler-Vila, A.; Croft, A.K.; Brunton, N. Influence of pressurised liquid extraction and solid–liquid extraction

methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalgae. *Int. J. Food Sci. Tech.* 2013, 48, 860–869

125. Leong, Y. K., Chen, C. Y., Varjani, S., & Chang, J. S. (2022). Producing fucoxanthin from algae—Recent advances in cultivation strategies and downstream processing. *Bioresource technology*, 344, 126170.

126. Amorim, K., Lage-Yusty, M.-A., Lopez-Hernández, J., 2012. Changes in bioactive compounds content and antioxidant activity of seaweed after cooking processing. *CyTA - Journal of Food* 10 (4), 321–324

127. Nie, J., Chen, D., Lu, Y., Dai, Z., 2021a. Effects of various blanching methods on fucoxanthin degradation kinetics, antioxidant activity, pigment composition, and sensory quality of *Sargassum fusiforme*. *LWT* 143, 111179.

128. Sudhakar, M., Ananthalakshmi, J., Nair, B., 2013. Extraction, purification and study on antioxidant properties of fucoxanthin from brown seaweeds. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 5 (7), 169–175.

129. Aslanbay Guler, B., Deniz, I., Demirel, Z., Yesil-Celiktas, O., Imamoglu, E., 2020. A novel subcritical fucoxanthin extraction with a biorefinery approach. *Biochemical Engineering Journal* 153, 107403.

130. Lourenço-Lopes, C., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Pereira, A. G., ... & Simal-Gandara, J. (2020). Scientific approaches on extraction, purification and stability for the commercialization of fucoxanthin recovered from brown algae. *Foods*, 9(8), 1113.

131. Lim, M.W.S.; Tan, K.M.; Chew, L.Y.; Kong, K.W.; Yan, S.W. Application of Two-Level Full Factorial Design for the Extraction of Fucoxanthin and Antioxidant Activities from *Sargassum siliquosum* and *Sargassum polycystum*. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 2018, 27, 446–463

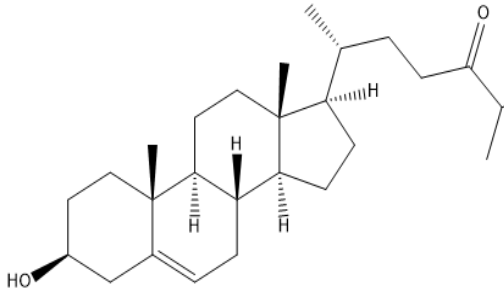
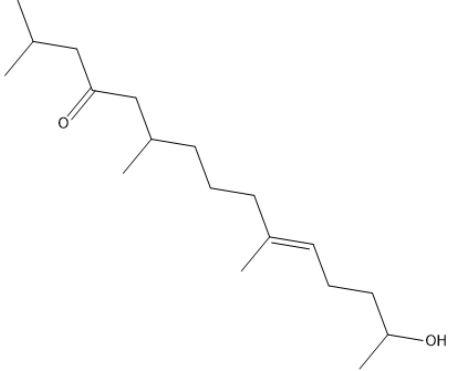
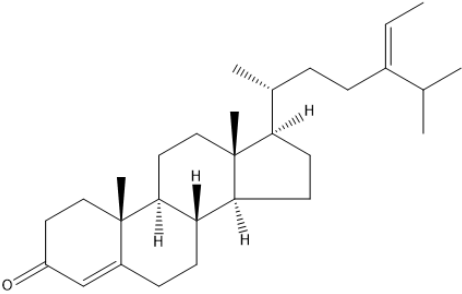
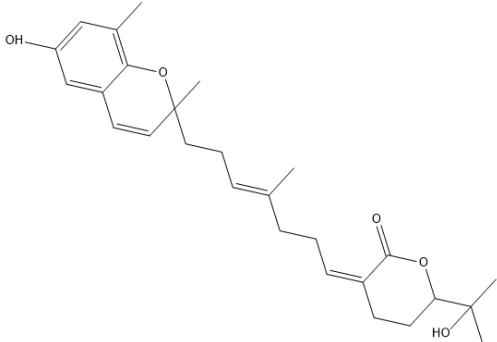
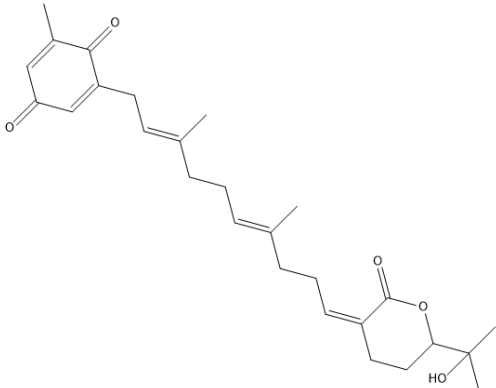
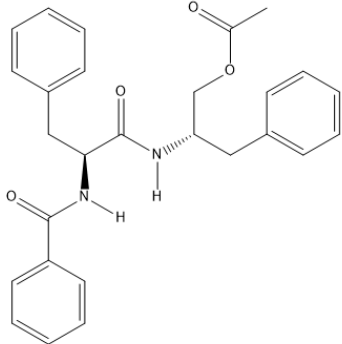
132. Getachew, A.T.; Saravana, P.S.; Cho, Y.J.; Woo, H.C.; Chun, B.S. Concurrent extraction of oil from roasted coffee (*Coffea arabica*) and fucoxanthin from brown seaweed (*Saccharina japonica*) using supercritical carbon dioxide. *J. CO2 Util.* 2018, 25, 137–146.

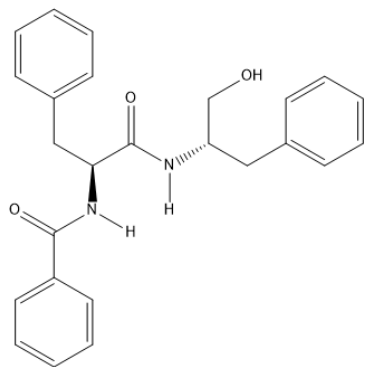
133. Kanda, H.; Kamo, Y.; Machmudah, S.; Wahyudiono; Goto, M. Extraction of fucoxanthin from raw macroalgae excluding drying and cell wall disruption by liquefied dimethyl ether. *Mar. Drugs* 2014, 12, 2383–2396

134. Foo, S. C., Khoo, K. S., Ooi, C. W., Show, P. L., Khong, N. M., & Yusoff, F. M. (2021). Meeting sustainable development goals: Alternative extraction processes for fucoxanthin in algae. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 546067.
135. Raguraman, V.; MubarakAli, D.; Narendrakumar, G.; Thirugnanasambandam, R.; Kirubakaran, R.; Thajuddin, N. Unraveling rapid extraction of fucoxanthin from *Padina tetrastratica*: Purification, characterization and biomedical application. *Process Biochem.* 2018, 73, 211–219.
136. Eom, S.J., Kim, Y.E., Kim, J.-E., Park, J., Kim, Y.H., Song, K.-M., Lee, N.H., 2020. Production of *Undaria pinnatifida* sporophyll extract using pilot-scale ultrasound-assisted extraction: Extract characteristics and antioxidant and anti-inflammatory activities. *Algal Research* 51, 102039.
137. Shannon, E.; Abu-Ghannam, N. Enzymatic extraction of fucoxanthin from brown seaweeds. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2018, 53, 2195–2204.
138. Billakanti, J.M.; Catchpole, O.J.; Fenton, T.A.; Mitchell, K.A.; Mackenzie, A.D. Enzyme-assisted extraction of fucoxanthin and lipids containing polyunsaturated fatty acids from *Undaria pinnatifida* using dimethyl ether and ethanol. *Process Biochem.* 2013, 48, 1999–2008.
139. Banik, S., Bandyopadhyay, S., and Ganguly, S. (2003). Bioeffects of microwave—a brief review. *Bioresour. Technol.* 87, 155–159.
140. Xiao, X.; Si, X.; Yuan, Z.; Xu, X.; Li, G. Isolation of fucoxanthin from edible brown algae by microwave-assisted extraction coupled with high-speed countercurrent chromatography. *J. Sep. Sci.* 2012, 35, 2313–2317.
141. Quitain, A.T., Kai, T., Sasaki, M., Goto, M., 2013. Supercritical carbon dioxide extraction of fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*. *Journal of agricultural and food chemistry* 61 (24), 5792–5797.
142. Xu, S., Liao, W., Chen, W., Kang, B., Chen, J., Lin, Y., 2018. Study of Microwave Synergistic Enzyme Method for Extraction from *Laminaria Japonica* by Response Surface Methodology. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 146, 012077

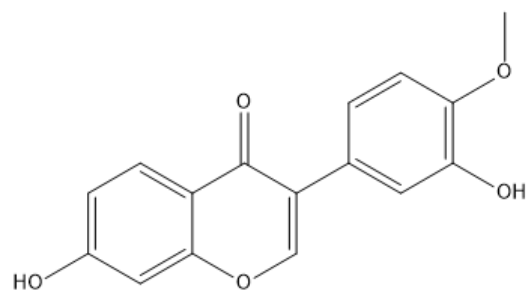
143. Shang, Y.F.; Kim, S.M.; Lee, W.J.; Um, B.H. Pressurized liquid method for fucoxanthin extraction from *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell. *J. Biosci. Bioeng.* 2011, 111, 237–241
144. Miyashita, K., Beppu, F., Hosokawa, M., Liu, X., Wang, S., 2020. Bioactive significance of fucoxanthin and its effective extraction. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 26, 101639
145. Conde, E., Moure, A., Domínguez, H., 2015. Supercritical CO₂ extraction of fatty acids, phenolics and fucoxanthin from freeze-dried *Sargassum muticum*. *Journal of Applied Phycology* 27 (2), 957–964.
146. Roh, M.K.; Uddin, M.S.; Chun, B.S. Extraction of fucoxanthin and polyphenol from *Undaria pinnatifida* using supercritical carbon dioxide with co-solvent. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2008, 13, 724–729.
147. Sivagnanam, S.P.; Yin, S.; Choi, J.H.; Park, Y.B.; Woo, H.C.; Chun, B.S. Biological properties of fucoxanthin in oil recovered from two brown seaweeds using supercritical CO₂ extraction. *Mar. Drugs* 2015, 13, 3422–3442.
148. Saravana, P.S., Getachew, A.T., Cho, Y.-J., Choi, J.H., Park, Y.B., Woo, H.C., Chun, B.S., 2017. Influence of co-solvents on fucoxanthin and phlorotannin recovery from brown seaweed using supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids* 120, 295–303.
149. De Caprio A. P. - The Toxicology of Hydroquinone — Relevance to Occupational and Environmental Exposure, *Crit. Rev. Toxicol.* 29 (3) (2008) 283-330. <https://doi.org/10.1080/10408449991349221>.
150. Yagi A., Kanbara T. and Morinobu N. - Inhibition of Mushroom-Tyrosinase by Aloe Extract, *Planta Med.* 53 (06) (2007) 515-517. <https://doi.org/10.1055/s-2006-962798>.
151. Da Silva Rocha S. F. L., Olanda C. G., Fokoue H. H. and Sant'Anna C. M. R. - Virtual Screening Techniques in Drug Discovery: Review and Recent Applications, *Curr. Top. Med. Chem.* 19 (19) (2019) 1751-1767. <https://doi.org/10.2174/1568026619666190816101948>.
152. Slater O. and Kontoyianni M. - The compromise of virtual screening and its impact on drug discovery, *Expert Opinion on Drug Discovery* 14 (7) (2019) 619-637. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1604677>.

PHỤ LỤC
DANH SÁCH CHẤT PHÂN LẬP TỪ RONG MỜ

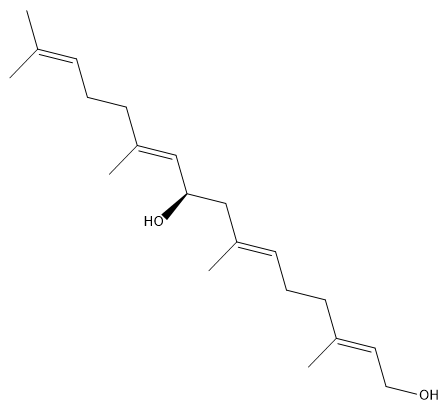
 <p style="text-align: center;">1 3-Hydroxycholest-5-en-24-one</p>	 <p style="text-align: center;">2 14-Hydroxy-2,6,10-trimethyl-10-pentadecen-4-one</p>
 <p style="text-align: center;">3 24-hydroxystigmasta-4,28-dien-3-one</p>	 <p style="text-align: center;">4 110-Hydroxysargachromelide</p>
 <p style="text-align: center;">5 150-Hydroxysargaquinolide</p>	 <p style="text-align: center;">6 Aurantiamide acetate</p>



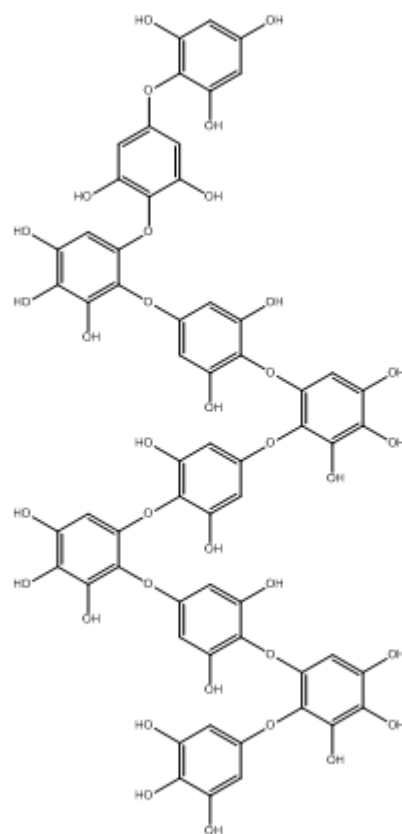
7
Aurantiamide



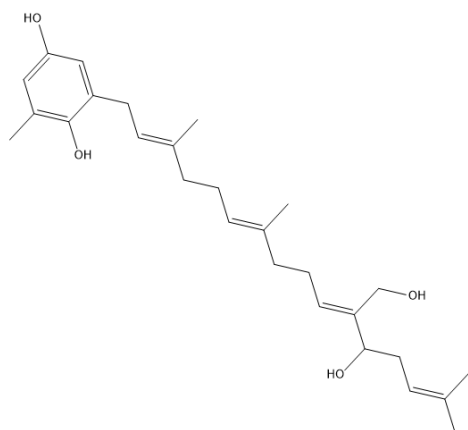
8
Calycosin



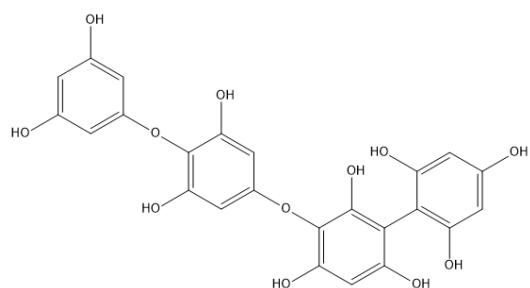
9
Crinitol



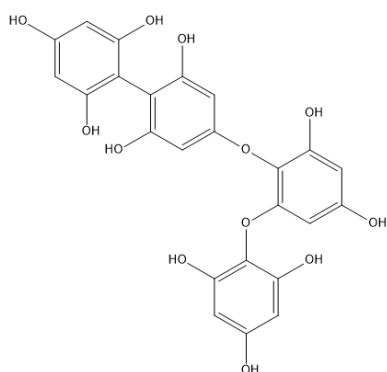
10
decaafuhalol A



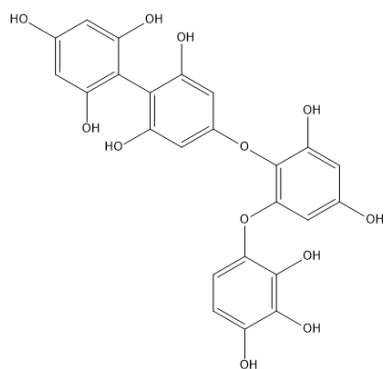
15
fallahydroquinone



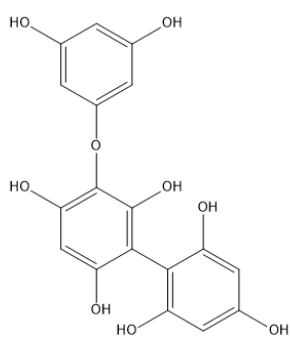
16
fucodiphlorethol D



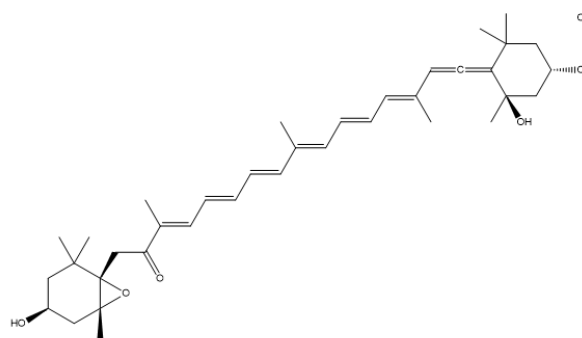
17
fucodiphlorethol E



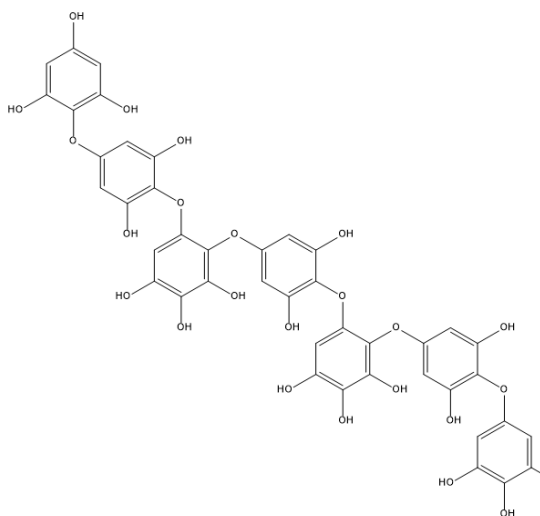
18
fucodiphlorethol F



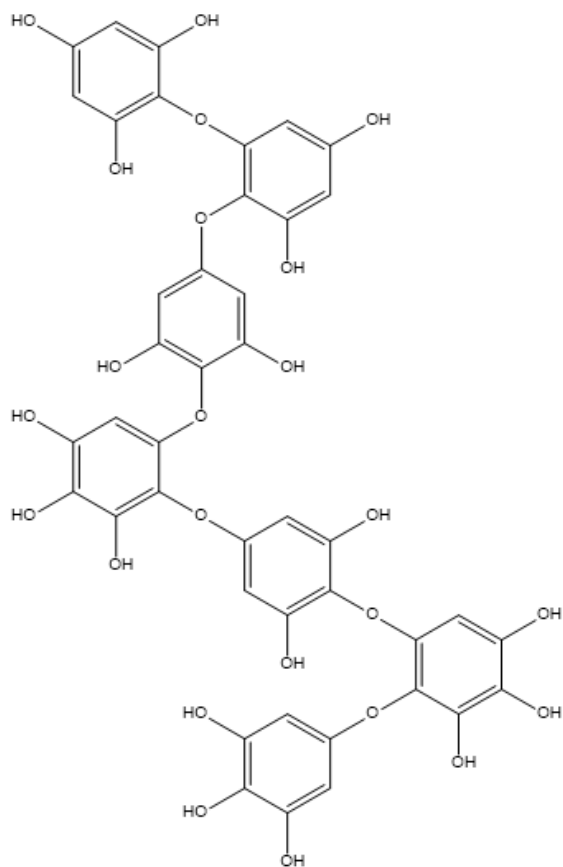
19
fucophlorethol B



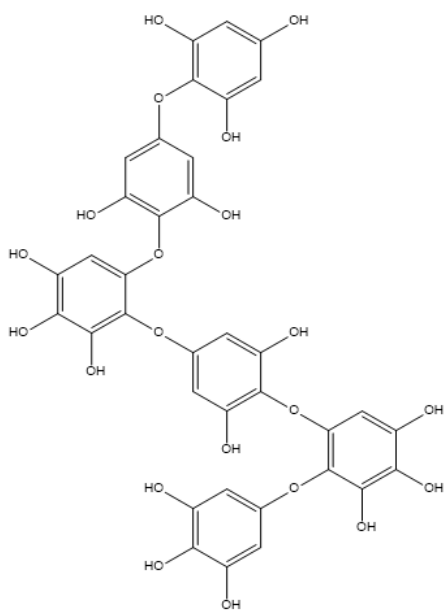
20
Fucoxanthin



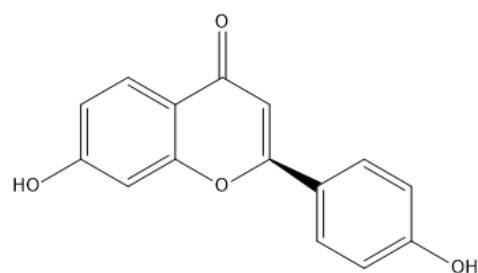
21
Heptafuhalol A



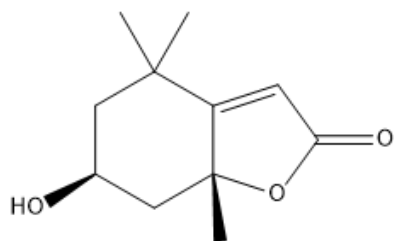
22
heptafuhalol B



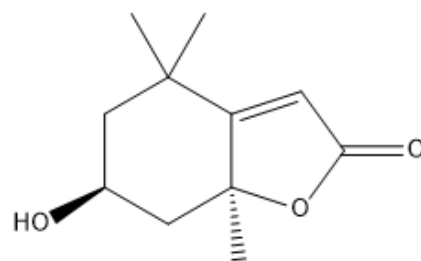
23
hexafuhalol A



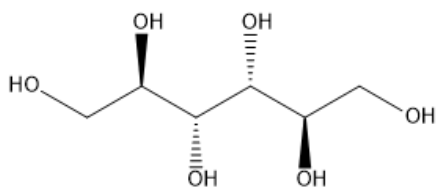
24
Liquiritigenin



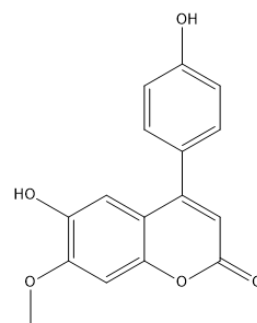
25
Loliolide(6S,7aR)



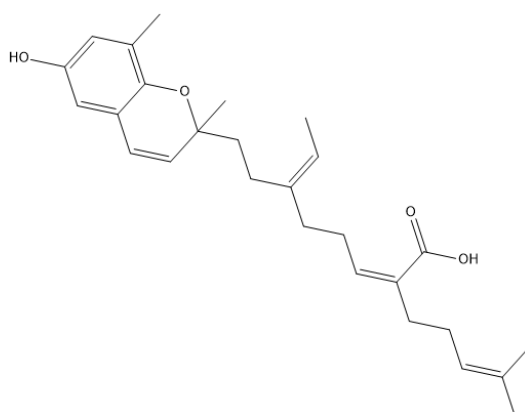
26
Loliolide(6S,7aS)



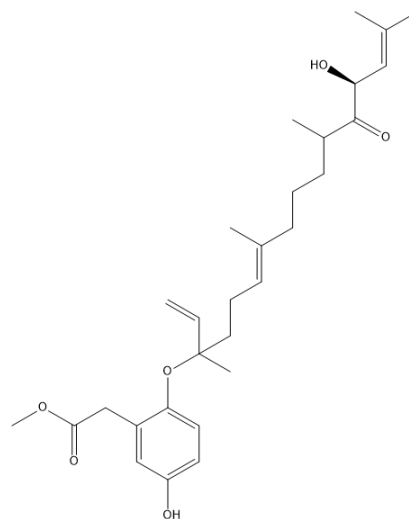
27
Mannitol



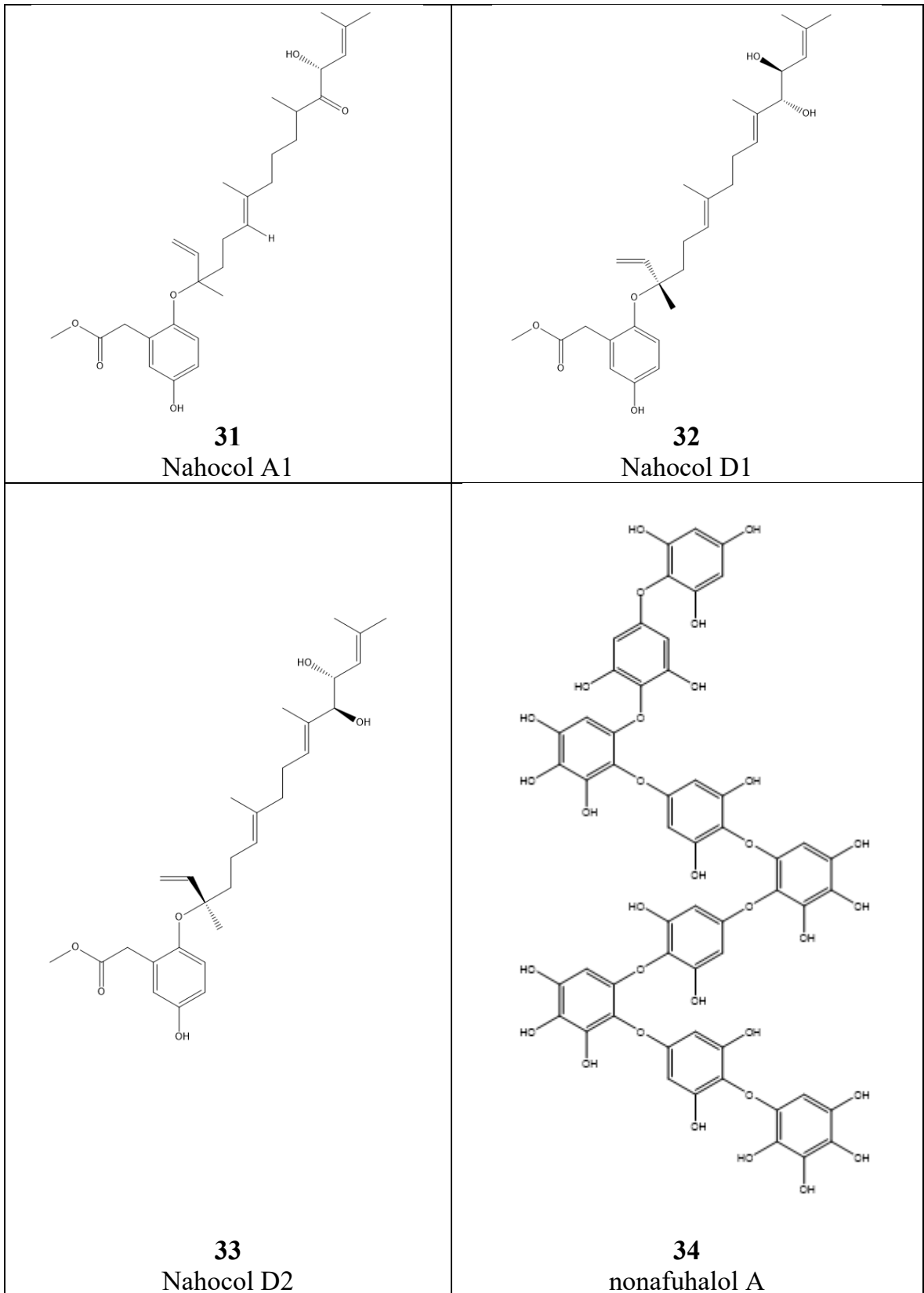
28
Melanettin

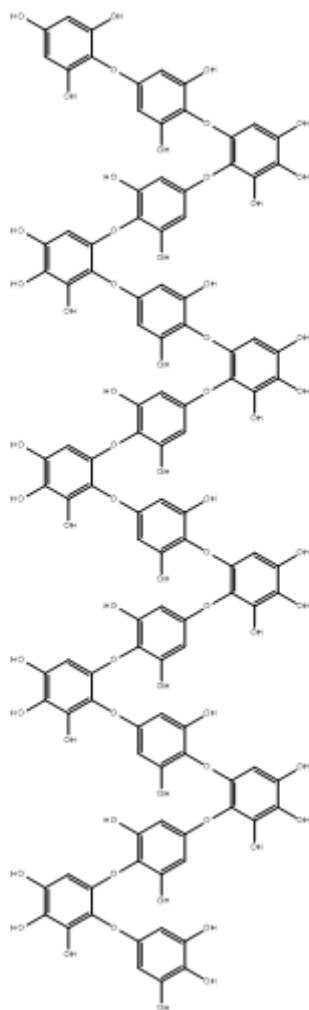


29
Mojabanchromanol

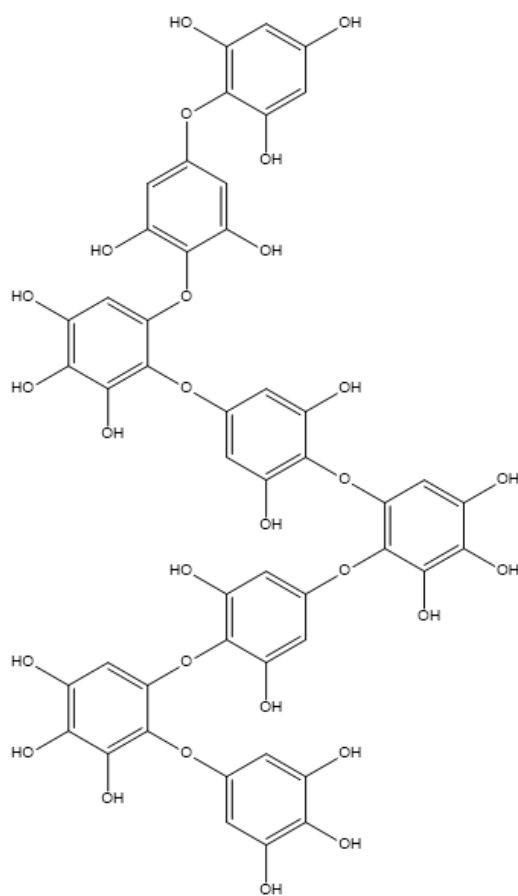


30
Nahocol A

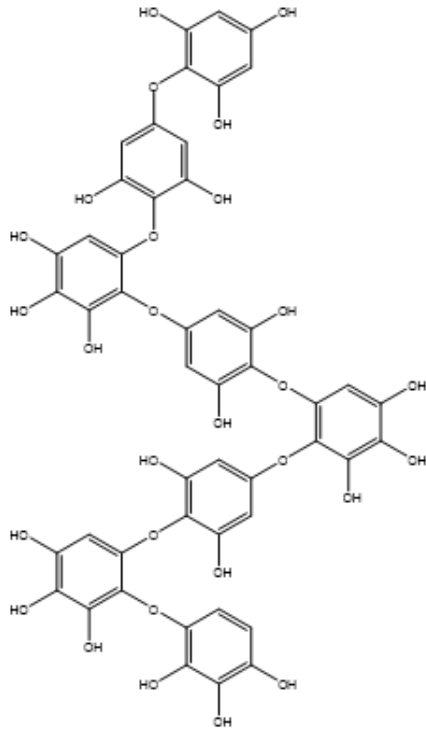




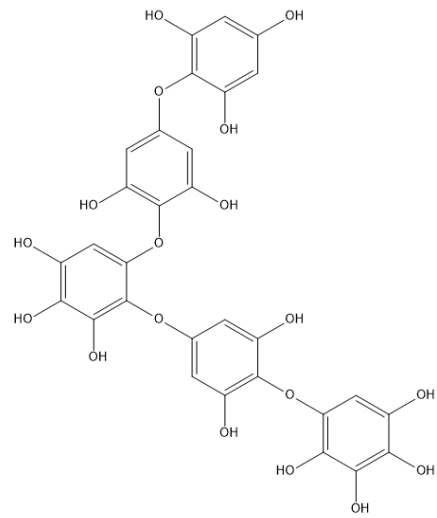
35
Octadecafuhalol A



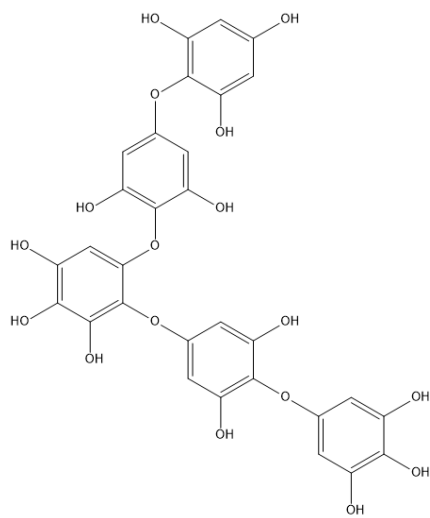
36
octafuhalol A



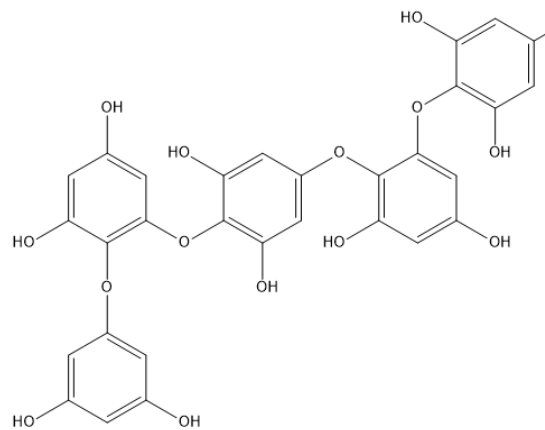
37
octafuhalol B



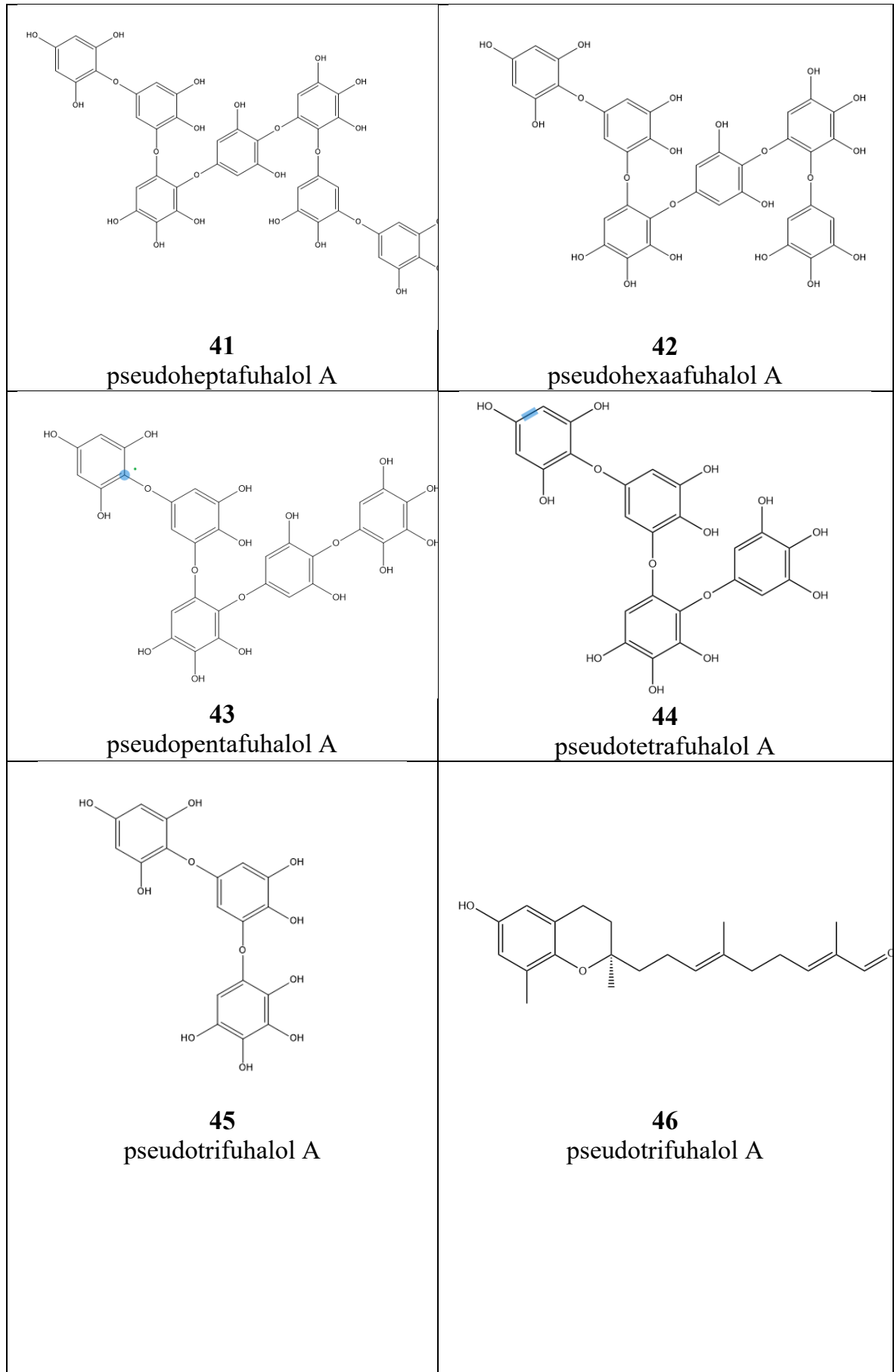
38
pentafuhalol A

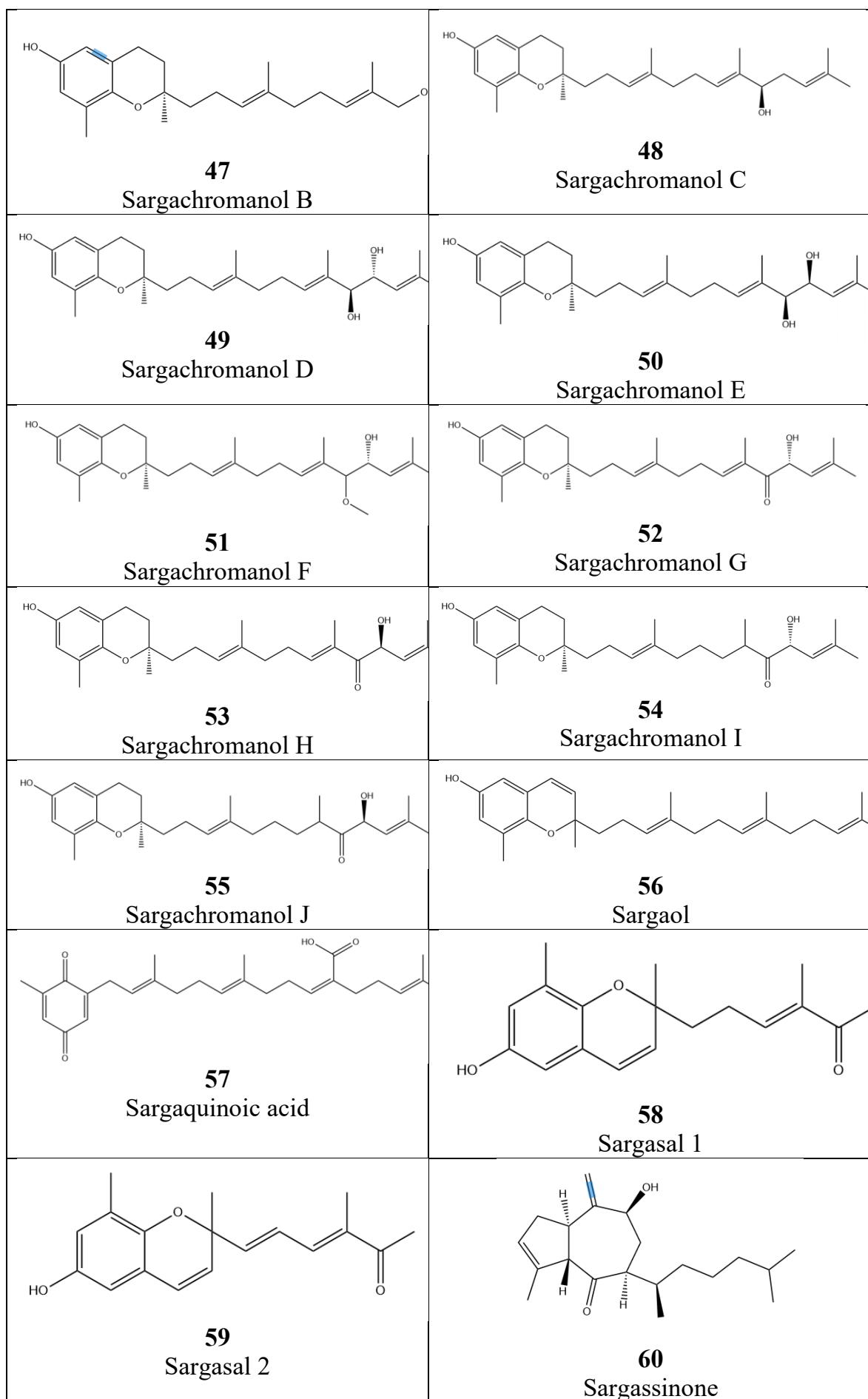


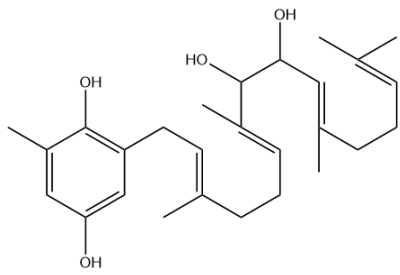
39
pentafuhalol B



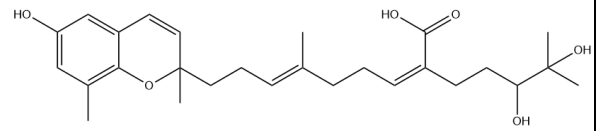
40
pentaphlorethol A



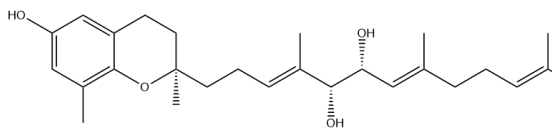




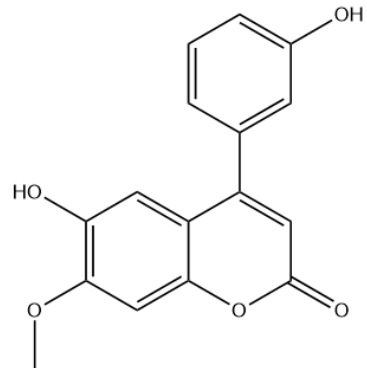
61
Sargatetraol



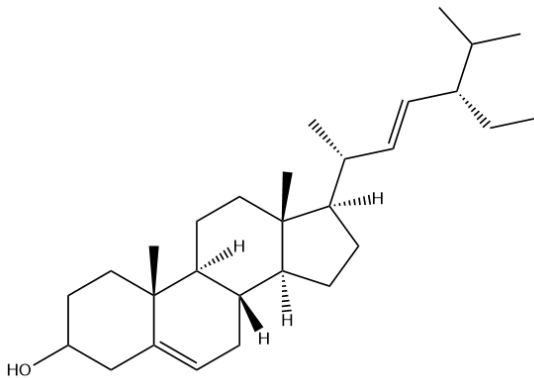
62
Sargathunbergol A



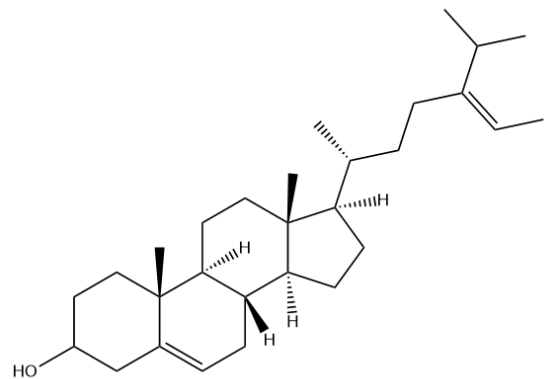
63
Sargatriol



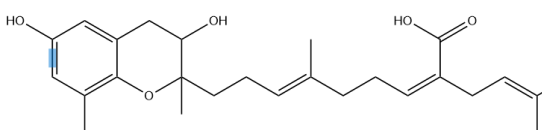
64
Stevenin



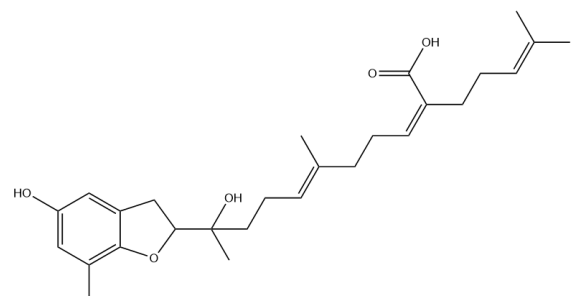
65
Stigmasta-5,22-dien-3-ol



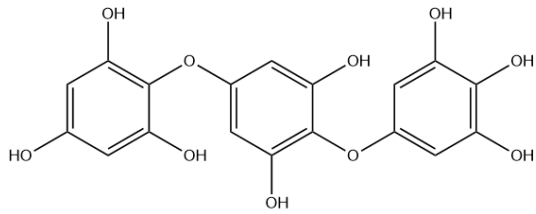
66
Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol



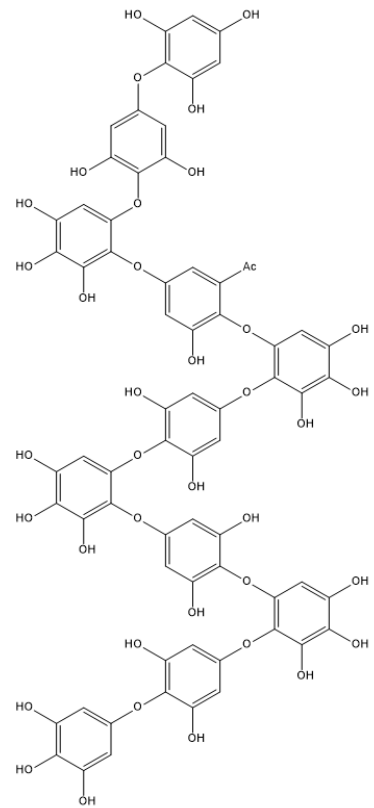
67
Thunbergol A



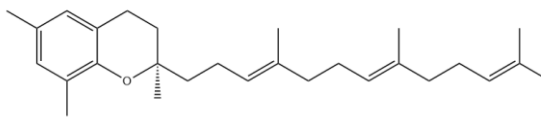
68
Thunbergol B



69
trifupalol A



70
undecaafupalol A



71
 δ -Tocotrienol