

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đinh Thị Kim Hoa

**NGHIÊN CỨU HÓA HỌC LIPID CỦA LOÀI CÀU GAI
VÀNG (*TRIPNEUSTES GRATILLA*) VÀ CÀU GAI ĐEN
(*DIADEMA SAVIGNYI*) Ở VÙNG BIỂN NHA TRANG,
KHÁNH HÒA VÀ ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG
TRONG CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC CÁC HỢP
CHẤT THIÊN NHIÊN**

Mã số: 9 44 01 17

Hà Nội - 2024

Công trình này được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: PGS.TS Đoàn Lan Phương - Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên - Viện HLKH&CN Việt Nam
2. Người hướng dẫn 2: TS. Nguyễn Phi Hùng - Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên - Viện HLKH&CN Việt Nam

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ, ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

- 1. Hoa Đình Thi Kim**, Long Pham Quoc, Phi Hung Nguyen, Phuong Doan Lan and Thang Tran Dinh, “Research on the component of lipid classes, fatty acid from egg and body of sea urchin *Diadema savignyi* (Audouin, 1809)”, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2018; 7(1): 836-840
- 2. Đình Thị Kim Hoa**, Lưu Hồng Sơn, Nguyễn Thị Tinh, Tạ Thị Lượng, Nguyễn Xuân Vũ, Đoàn Lan Phương, “Tối ưu hóa quá trình thủy phân trứng cầu gai *Tripneustes gratilla* bằng enzyme Alcalase[#]”, *Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc năm 2021, NXB Đại học Thái Nguyên, (2021) 969 - 975.*
- 3. Đình Thị Kim Hoa**, Pham Quoc Long, Doan Lan Phuong, Research on the composition of lipids, fatty acids, and amino acids from egg and body of sea urchin *Tripneustes gratilla*, *Vietnam Journal of Science and Technology* 56 (4A) (2018) 30-38,
- 4. Đình Thị Kim Hoa**, Hoang Thi Bich, Pham Quoc Long, Tran Quoc Toan, Doan Lan Phuong, Protein hydrolysis of eggs from the sea urchin *Tripneustes gratilla* by the industrial enzyme Alcalase[#], *Vietnam Journal of Science and Technology* 57 (2) (2019) 133-138 doi:10,15625/2525-2518/57/2/12894
- 5. Đình Thị Kim Hoa**, Lưu Hồng Sơn, Nguyễn Lan Nhi, Đoàn Lan Phương, Nghiên cứu tối ưu hóa quá trình thủy phân trứng cầu gai đen *Diadema savignyi* bằng enzyme Alcalase[#]”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, kỳ 2, tháng 5 năm 2023, 91-100.*
- 6. Thi-Kim-Hoa Đình**, Phi-Hung Nguyen, Doan Lan Phuong, Thi-Phuong-Ly Dang, Pham Minh Quan, Thi-Kim-Dung Dao, Valeria P, Grigorchuk, Pham Quoc Long, Component and content of Lipid classes and Phospholipid molecular species of egg and body of the Vietnamese sea urchin *Tripneustes gratilla*, *Molecules* 2023, 28, 3721. <https://doi.org/10.3390/molecules28093721>
- 7. Đình Thị Kim Hoa**, Đoàn Lan Phương, Bằng sáng chế (chấp nhận đơn): Quy trình sản xuất bột trứng cầu gai thủy phân bằng enzyme Alcalase, *Chấp nhận đơn hợp lệ, số đơn 1-2003-02315.*

I. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết

Cầu gai là một nhóm lớn thuộc động vật biển không xương sống trong ngành Echinodermata (động vật da gai), có giá trị dược liệu và thực phẩm. Nhiều nghiên cứu về cầu gai đã tìm ra các hợp chất có hoạt tính sinh học có thể phân lập, tinh chế và được chuyển đổi thành thuốc hay thực phẩm chức năng. Các chất chiết xuất và thủy phân từ trứng của cầu gai có hoạt tính sinh học khác nhau, các hợp chất đặc biệt có thể kể đến là các glycoside, polysaccharide, glycolipid, sulphat - polysaccharide và các phospholipid.

Mặc dù có giá trị dược liệu và dinh dưỡng cao như vậy, nhưng hiện nay các thành phần hóa học có lợi của cầu gai chưa được nghiên cứu một cách triệt để, từ đó có thể ứng dụng các kỹ thuật phân lập, tách chiết tạo ra những sản phẩm thực phẩm hay dược phẩm công nghệ cao.

Áp dụng công nghệ thủy phân đối với trứng cầu gai là một hướng nghiên cứu mới mẻ và có nhiều triển vọng. Bởi khi tiến hành thủy phân bằng con đường sinh học sẽ mang lại hiệu quả cao, điều kiện phản ứng nhẹ nhàng, an toàn đối với người lao động và sản phẩm sẽ có chất lượng tốt. Bột protein thủy phân từ trứng cầu gai thu được sẽ có nhiều khả năng ứng dụng trong y tế hay bổ sung vào những mặt hàng thực phẩm tăng khả năng hấp thụ cho trẻ nhỏ và người cao tuổi. Bên cạnh đó, trứng cầu gai rất giàu các phospholipid (PL) và acid béo quý. Việc đánh giá được thành phần các dạng phân tử PL cũng như hàm lượng của chúng trong trứng cầu gai là hướng nghiên cứu vô cùng mới và quan trọng.

Do đó trong nội dung luận án tôi chú trọng nghiên cứu lớp chất phospholipid có trong trứng và thân của loài cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* và cầu gai đen *Diadema savignyi* được thu nhận từ Nha Trang, Khánh Hòa, từ đó định hướng nguồn nguyên liệu, tạo chế phẩm bột protein phân tử lượng thấp và phospholipid, từ đó giúp nâng cao giá trị kinh tế của cầu gai.

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

- Nghiên cứu thành phần hóa học cơ bản của trứng và thân cầu gai vàng (*Tripneustes gratilla*) và cầu gai đen (*Diadema savignyi*) ở vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa.
- Nghiên cứu thành phần các lớp chất lipid, phần acid béo có trong trứng và thân của loài cầu gai vàng (*Tripneustes gratilla*) và cầu gai đen (*Diadema savignyi*).
- Xác định các dạng phân tử phospholipid và tỉ lệ của chúng trong mỗi phân lớp phospholipid của lipid tổng từ mẫu trứng và mẫu thân loài cầu gai vàng (*Tripneustes gratilla*) và cầu gai đen (*Diadema savignyi*)

- Xây dựng công nghệ thủy phân trứng cầu gai vàng (*Tripneustes gratilla*) và cầu gai đen (*Diadema savignyi*) bằng enzyme Alcalase tạo sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe có thành phần chính là protein khối lượng phân tử thấp, tạo ra sản phẩm thực phẩm đầu tiên từ cầu gai tại Việt Nam.

3. Nội dung nghiên cứu chính của luận án

- Xác định thành phần hóa học, hàm lượng lipid tổng; các lớp chất lipid, thành phần và hàm lượng các acid béo có trong 4 mẫu nghiên cứu từ thân và trứng của cầu gai vàng (*Tripneustes gratilla*) và cầu gai đen (*Diadema savignyi*);

- Xác định các dạng phân tử phospholipid có trong 4 mẫu nghiên cứu từ thân và trứng của cầu gai vàng (*Tripneustes gratilla*) và cầu gai đen (*Diadema savignyi*);

- Xây dựng quy trình công nghệ thủy phân trứng cầu gai vàng (*Tripneustes gratilla*) và cầu gai đen (*Diadema savignyi*) bằng enzyme Alcalase và tiến hành tối ưu hóa các thông số công nghệ có ảnh hưởng lớn tới quá trình thủy phân;

- Hoàn thiện công nghệ sản xuất sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe trứng cầu gai và đánh giá chất lượng sản phẩm tạo thành.

4. Những điểm mới của luận án

- Đây là công trình đầu tiên nghiên cứu chi tiết về thành phần và hàm lượng các lớp chất lipid, acid béo, phospholipid của loài cầu gai vàng (*Tripneustes gratilla*) và cầu gai đen (*Diadema savignyi*) thu thập tại vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa.

- Lần đầu tiên, các dạng phân tử PL như phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphatidyl-acid (PA), các lyso phospholipid (LPC, LPE, LPS) của 2 loài cầu gai đã được xác định, bao gồm: 7 lớp chất trong PL (PI, PS, PE, PA, PC, LPC, LPE), trong đó có 24 dạng phân tử PE, 76 dạng phân tử của PC, 16 dạng phân tử PS, 11 dạng phân tử PA, 24 dạng phân tử của PI, 19 dạng phân tử của LPC, 10 dạng phân tử LPE. Ngoài ra còn phát hiện được 23 dạng phân tử SQDG là lớp sulfolipid.

- Lần đầu tiên tạo ra được sản phẩm trứng cầu gai thủy phân bằng công nghệ enzyme kết hợp lọc màng, sản phẩm giàu các acid amin, oligopeptide và protein phân tử lượng thấp, sản phẩm đạt tiêu chuẩn của một sản phẩm thực phẩm chức năng.

5. Bố cục của luận án

Luận án gồm 139 trang, trong đó có 38 hình, 65 bảng, 2 sơ đồ. Bố cục của luận án: Mở đầu (3 trang); Chương 1: Tổng quan (28 trang); Chương 2: Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu (4 trang), Chương 3: Thực nghiệm

(15 trang); Chương 4: Kết quả và thảo luận (76 trang); Kết luận và kiến nghị (3 trang); Danh mục các công trình công bố của luận án (1 trang); Tài liệu tham khảo (9 trang);

NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

MỞ ĐẦU

Phần mở đầu đề cập đến ý nghĩa khoa học, tính thực tiễn, đối tượng và nhiệm vụ nghiên cứu của luận án cũng như những điểm mới mà luận án nghiên cứu được.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Tổng quan bao gồm 3 phần lớn: phần 1 tổng quan về đối tượng nghiên cứu (lipid và phospholipid); phần 2 tổng quan về nguyên liệu nghiên cứu (thành phần hóa học, hoạt tính sinh học của cầu gai nói chung và của 2 loài cầu gai nghiên cứu); Phần 3 tổng quan về công nghệ thủy phân protein bằng enzyme.

CHƯƠNG 2.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* (Linnaeus, 1758) và cầu gai đen *Diadema savignyi* (Audouin, 1809) được thu thập ở Hòn Tằm, Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam và được phân loại bởi TS. Nguyễn An Khang, Viện Hải dương học Nha Trang – Học viện Khoa học Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xác định các thành phần hóa học cơ bản của nguyên liệu

Phương pháp Kjeldahl xác định hàm lượng protein tổng số; phương pháp Lowry xác định hàm lượng protein hòa tan; phương pháp nung xác định hàm lượng tro; phương pháp sấy ở nhiệt độ 150°C xác định độ ẩm; phương pháp sắc ký xác định thành phần acid amin.

2.2.2. Phương pháp chiết lipid tổng

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

2.2.3. Phương pháp phân lập các lớp chất, phân lớp lipid

Sắc ký lớp mỏng (TLC) và sắc ký lỏng cao áp (HPLC)

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

Thành phần và hàm lượng các lớp chất lipid được xác định dựa trên phương pháp TLC kết hợp với chương trình phân tích hình ảnh Sorbfil TLC Videodensitometer, Krasnodar, LB Nga.

2.2.5. Xác định thành phần và hàm lượng các acid béo

Hỗn hợp methyl ester của acid 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. Phương pháp xác định dạng phân tử và cấu trúc của các hợp chất và các phân lớp phospholipid

Dạng phân tử các phospholipid được phân tích bằng phương pháp phổ khối phân giải cao HRMS, được ghi trên thiết bị Shimadzu LCMS-IT-TOF, do hãng Shimadzu (Kyoto, Nhật Bản) cung cấp.

2.2.7. Phương pháp tối ưu hóa quá trình thủy phân protein đa nhân tố

Thí nghiệm tối ưu hóa quá trình thủy phân protein từ trứng cầu gai được thiết kế thử nghiệm bằng mô hình Box-Behnken, với ba biến ba cấp độ và 17 đơn vị thí nghiệm và 3 lần lặp lại với các biến được lựa chọn.

2.2.8. Phương pháp đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của sản phẩm

CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM

Phần thực nghiệm mô tả chi tiết các bước tiến hành các thí nghiệm, các phương pháp nghiên cứu được nêu ở chương 2. Bao gồm: thí nghiệm phân tích hàm lượng protein tổng số; hàm lượng protein hòa tan; hàm lượng tro; hàm lượng lipid tổng số; các lớp chất lipid; thành phần acid béo...

Ngoài ra trong chương 3, còn đề cập tới sơ đồ quy trình công nghệ thực hiện quá trình thủy phân trứng cầu gai, trong đó nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố công nghệ là: Tỷ lệ nước/nguyên liệu; tỷ lệ enzyme bổ sung; thời gian thủy phân, pH và nhiệt độ thủy phân. Từ đó lựa chọn được 3 yếu tố ảnh hưởng mạnh nhất tới hàm lượng protein hòa tan thu được để tiến hành nghiên cứu tối ưu hóa công nghệ.

CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Thành phần hóa học của thân, trứng cầu gai vàng *Tripeustes gratilla* và cầu gai đen *Diadema savignyi*

Bảng 4.1. Kết quả thành phần hóa học của thân và trứng cầu gai

TT	Thành phần	Trứng cầu gai vàng	Thân cầu gai vàng	Trứng cầu gai đen	Thân cầu gai đen
1	Hàm lượng nước (%)	75,28± 0,83	68,12± 0,24	80,13± 0,61	71,51± 0,52
2	Tro tổng số (% mẫu tươi)	2,05± 0,03	5,47± 0,22	1,93± 0,01	4,12± 0,02
3	Lipid tổng số (% mẫu tươi)	4,41 ± 0,03	1,32 ± 0,03	3,18 ± 0,02	1,33 ± 0,04
4	Protein tổng số (% mẫu tươi)	12,45 ± 0,14	4,17 ± 0,11	11,74 ± 0,15	3,81 ± 0,08
5	Protein hòa tan (mg/g)	141,48 ± 0,62	38,71± 0,22	82,43 ± 0,17	26,91± 0,09

4.2. Các lớp chất lipid và hàm lượng của chúng trong mẫu thân, trứng cầu gai vàng và cầu gai đen

Bảng 4.2. Kết quả thành phần và hàm lượng lớp chất lipid mẫu trứng và thân cầu gai vàng *Triploneustes gratilla*

TT	Lớp chất lipid	Mẫu nghiên cứu	
		Mẫu trứng (%)	Mẫu thân (%)
1	PoL	4,41 ± 0,05	6,36 ± 0,04
2	MDAG và DAG	1,11 ± 0,01	1,43 ± 0,01
3	ST	5,69 ± 0,05	6,63 ± 0,04
4	FFA	4,76 ± 0,03	4,49 ± 0,03
5	TAG	78,37 ± 0,64	76,10 ± 0,57
6	MADAG	3,31 ± 0,05	3,24 ± 0,05
7	HW	2,35 ± 0,04	1,75 ± 0,02

Bảng 4.3. Kết quả nhận dạng các lớp chất lipid mẫu trứng và thân cầu gai đen *Diadema savignyi*

TT	Lớp chất	Mẫu trứng (%)	Mẫu thân (%)
1	PoL	20,47 ± 0,05	33,94 ± 0,60
2	MDAG và DAG	12,45 ± 0,01	19,57 ± 0,26
3	ST	4,14 ± 0,05	9,28 ± 0,16
4	FFA	55,27 ± 0,03	32,39 ± 0,30
5	TAG	4,43 ± 0,04	2,50 ± 0,08
6	MADAG	3,24 ± 0,05	2,32 ± 0,07

PoL: lipid phân cực; ST: sterol; FFA: acid béo tự do; TAG: triacylglycerol; MADAG: monoalkyldiacylglycerol; HW: sáp; MDAG và DAG: Mono and Diacyl Glycerol

Kết quả từ bảng 4.2 cho thấy với cầu gai vàng triacylglycerol là loại lớn nhất và nổi bật nhất trong lipid tổng của cả mẫu trứng và mẫu thân, lần lượt là 78,37 % và 76,10 %. Nghiên cứu này cho thấy rằng tỷ lệ phần trăm của sterol thấp như lớp lipid phân cực, với 5,69 % ở mẫu trứng và 6,63 % ở mẫu thân. Ba nhóm còn lại (acid béo, monoalkyl diacylglycerol và hydrocarbon + sáp) có hàm lượng thấp, dưới 5 % cho cả hai mẫu.

Với cầu gai đen, triacylglycerol là lớp chất chiếm tỉ lệ lớn nhất trong lipid tổng của mẫu trứng cầu gai đen (55,27%) và cao thứ hai sau lipid phân cực trong mẫu thân cầu gai (32,39%). Lipid phân cực cũng là thành phần chính của lipid tổng của cả mẫu thân và mẫu trứng, hàm lượng lần lượt là 33,94% và 20,47%.

4.3. Thành phần và hàm lượng của các acid béo trong mẫu thân, trứng cầu gai vàng và cầu gai đen

4.3.1. Thành phần và hàm lượng acid béo của mẫu thân, trứng cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

Trong nghiên cứu này, 25 và 24 acid béo đã được xác định trong trứng và mẫu thân với 12 đến 22 nguyên tử carbon tương ứng. Các acid béo 14:0, 16:1n-9, 16:0, 18:1n-9, 20:4n-6, 20:5n-3 chiếm hàm lượng tương đối cao. Acid palmitic (C16:0) và acid myristic (14:0) được quan sát là SFA chiếm ưu thế trong tất cả các mẫu, nằm trong khoảng từ 3,59 % đến 14,50 % (C14:0) và từ 11,74 % đến 25,10 % (C18:0), tương ứng trong các mẫu trứng và thân.

Bảng 4.4. Thành phần acid béo của thân và trứng cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

TT	Acid béo	Mẫu trứng	Mẫu thân	TT	Acid béo	Mẫu trứng	Mẫu thân
1	12:0	0,08	-	15	18:0	1,39	1,57
2	14:0	14,50	3,59	16	20:0	0,23	0,12
3	14:1n-7	2,03	0,33	17	20:3n-3	0,32	0,68
4	15:0	0,44	0,20	18	20:2n-6	0,67	-
5	16:1n-9	8,66	3,59	19	20:1n-9	2,50	6,25
6	16:2n-4	0,32	-	20	20:4n-6	10,95	30,96
7	16:1n-7	3,08	2,04	21	20:5n-3	6,42	13,39
8	16:0	25,10	11,74	22	20:3n-6	2,46	5,55
9	18:4n-3	3,67	2,64	23	20:4n-3	1,15	1,46
10	18:2n-6	1,86	1,81	24	22:6n-3	0,22	0,31
11	18:1n-9	8,87	4,62	25	22:1n-9	0,52	0,27
12	18:1n-7	0,87	0,91	26	22:6n-6	-	0,30
13	18:3n-3	2,19	2,19	27	22:4n-6	-	0,57
14	18:3n-6	0,85	0,64	28	Khác	0,65	4,27
SFA		41,74	17,22	Omega-6		16,79	39,83
MUFA		26,53	18,01	Omega-9		20,55	14,73
PUFA		31,08	60,50	PUFA/SFA		74,46	3,51
Omega-3		13,97	20,67	n3/n6		0,83	0,52

Tỷ lệ PUFA/SFA và tỷ lệ n3/n6 được tìm thấy trong tổng lipid từ trứng và thân của *Tripneustes gratilla* là (74,46 và 3,51) và (0,83 và 0,52) đây là những tỉ lệ cao. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), trứng và dịch chiết lipid từ *Tripneustes gratilla* sử dụng trong nghiên cứu được xếp vào nhóm thực phẩm chất lượng hàng đầu và rất tốt cho sức khỏe con người.

4.3.2. Thành phần và hàm lượng acid béo của mẫu thân, trứng cầu gai đen *Diadema savignyi*

Thành phần acid béo có trong lipid tổng của trứng và thân cầu gai *Diadema savignyi* rất phong phú, ghi nhận sự có mặt của 27 acid béo trong mẫu lipid của trứng cầu gai và 30 acid béo trong mẫu thân cầu gai với mạch cacbon từ 14 đến 24. Trong đó chủ yếu là các acid béo 14:0, 16:0, 20:4n-6, 20:1n-9, 18:0 với hàm lượng tương đối lớn, còn lại các acid béo khác có hàm lượng thấp, có tới 24 acid béo có hàm lượng dưới 1%.

Bảng 4.5. Thành phần và hàm lượng acid béo trong mẫu trứng và thân cầu gai *Diadema savignyi*

TT	Acid béo	Mẫu trứng	Mẫu thân	TT	Acid béo	Mẫu trứng	Mẫu thân
1	14:0	17,35	9,38	17	18:0	5,74	9,71
2	a-15:0	0,59	0,48	18	19:0	0,41	0,69
3	15:0	1,35	1,11	19	19:1n-9	0,96	1,77
4	16:1n-9	4,41	2,72	20	a-19:0	-	0,18
5	16:2n-6	0,37	0,15	21	20:0	0,69	0,46
6	a-16:0	0,15	-	22	20:1n-7	0,50	0,63
7	16:0	31,40	27,49	23	20:1n-9	9,90	12,90
8	i-17:0	-	0,29	24	20:4n-6	8,58	11,34
9	a-17:0	0,57	-	25	20:5n-3	1,76	1,75
10	17:0	1,20	1,40	26	20:2n-6	2,07	4,48
11	18:4n-3	0,24	0,29	27	21:1n-9	0,64	1,23
12	18:2n-6	1,29	1,01	28	21:0	0,18	0,26
13	18:1n-9	3,42	2,93	29	22:4n-6	0,18	0,20
14	18:1n-7	2,78	2,75	30	22:4n-3	0,13	0,30
15	18:3n-6	0,51	0,35	31	24:1n-7	0,17	0,17
16	i-19:0	-	0,27	32	24:1n-9	0,20	0,35
				33	Khác	0,13	0,51
SFA		60,08	52,26	Omega-6		13,28	17,67
MUFA		23,61	26,27	Omega-9		20,46	22,86
PUFA		15,96	20,94	PUFA/SFA		0,27	0,40
Omega-3		2,31	2,47	n3/n6		0,17	0,14

Đối với cả mẫu trứng và mẫu thân cầu gai *Diadema savignyi*, acid béo bão hoà (SFA) đều chiếm tỉ lệ vượt trội (60,08% và 52,26% trong trứng và thân), trong khi đó hàm lượng acid béo có một nối đôi (MUFA) lần

lượt là 23,61% và 26,27%, acid béo đa nối đôi (PUFA) là 15,96% và 20,94% tương ứng

4.4. Dạng phân tử phospholipid của lipid tổng từ mẫu thân, trứng cầu gai vàng và cầu gai đen

Kết quả cho thấy có 5 loại GLP trong PL của cả mẫu trứng, thân của cả cầu gai đen và cầu gai vàng, bao gồm phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE), acid phosphatidic (PA), phosphatidylcholine (PC) và một loại glycosyldiacylglycerol là sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) đã được nhận dạng. Kết quả nhận dạng PL cho thấy có 20 dạng phân tử đã được tìm thấy trong lớp phosphatidylinositol (PI) từ PoL của cả hai mẫu thân và trứng cầu gai *Tripneustes gratilla* và 23 dạng phân tử PI của mẫu thân và 24 dạng phân tử PI của trứng cầu gai đen *Diadema savignyi*. Với mẫu cầu gai vàng, trong số các dạng phân tử PI, PI 18:0/20:4 (m/z [M-H]⁻ 885,5562) là thành phần chính với hàm lượng 38,65 (trong mẫu trứng) và 48,19% (trong mẫu thân). Tiếp đó là PI 20:0/20 :5 (m/z [M-H]⁻ 911,5645, với công thức phân tử C₄₉H₈₅O₁₃P), PI 20:0/20:4 (m/z [M-H]⁻ 913,5814, với công thức phân tử C₄₉H₈₇O₁₃P) và PI 18:0/20: 5 (m/z [M-H]⁻ 883,5401, với công thức phân tử C₄₇H₈₁O₁₃P), chiếm tỉ lệ 13,37; 11,49 và 9,36% trong mẫu trứng và 12,64; 9,89 và 6,96% trong mẫu thân, tương ứng.

Đối với mẫu cầu gai vàng ghi nhận được 14 dạng phân tử PS trong mẫu trứng và 15 dạng phân tử PS trong mẫu thân, trong khi đó với cả thân và trứng cầu gai đen đều phát hiện được 16 dạng phân tử PS.

Trong số các dạng phân tử PS của mẫu cầu gai vàng, PS 20:1/20:1 với ion âm [M-H]⁻ có m/z 842,5962 (tương ứng công thức phân tử C₄₆H₈₆NO₁₀P) có hàm lượng cao nhất với 42,48% trong trứng và 44,41% trong thân. Với mẫu trứng cầu gai đen *Diadema savignyi*, dạng phân tử PS 18:0/20:4 và PS 20:1/20:1 là hai PS chiếm tỉ lệ cao nhất (21,781 và 20,067% tương ứng); tuy nhiên ở mẫu thân thì dạng phân tử PS 20:1/20:1 lại cao hơn vượt trội, chiếm 34,591%, và dạng PS 18:0/20:4 chỉ chiếm 9,052%. PS 20:1/20:4 và PS 20:1/21:1 là hai dạng phân tử chiếm tỉ lệ cao thứ 2 trong cả mẫu trứng và mẫu thân của cầu gai đen. Đối với phosphatidylethanolamine (PE), 22 dạng phân tử đã được tìm thấy trong mẫu cầu gai vàng. Với mẫu thân và trứng cầu gai đen, ghi nhận được 23 dạng phân tử PE; có một dạng phân tử PE được phát hiện thêm so với hai mẫu của cầu gai vàng là PE 16:0/20:4, tuy nhiên nó chiếm tỉ lệ rất thấp, đều dưới 1% ở cả mẫu thân và mẫu trứng.

Đối với lớp chất phosphatidic acid PA đã xác định được 11 dạng phân tử trong mẫu trứng và thân của cả cầu gai vàng và cầu gai đen. Đối với 2 mẫu trứng và thân của loài cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*, trong thành phần lớp chất

phosphatidylcholine xác định được 73 tín hiệu, tương ứng với 73 dạng phân tử và cầu gai đen ghi nhận 77 dạng phân tử PC.

Các phân tử lyso phosphatidylcholine (LPC) được hình thành do PC bị mất đi một nhóm acid béo. Trong mẫu thân và trứng của cầu gai vàng ghi nhận 21 dạng LPC và cầu gai đen ghi nhận 20 dạng phân tử LPC.

LPE là các PE khi mất đi một gốc acid béo. Lyso-phosphatidyl-ethanolamines (lysocephalins, LysoPtdEtn, LysoPE, hoặc LPE) thuộc nhóm este phospholipid trong phospholipid. Có 10 dạng phân tử LPE được phát hiện trong cả hai loài cầu gai.

4.5. Kết quả nghiên cứu quá trình thủy phân trứng cầu gai vàng và cầu gai đen bằng enzyme Alcalase

Bảng 4.22. Ảnh hưởng của tỉ lệ nước bổ sung đến hàm lượng protein hoà tan thu được của dịch thủy phân trứng cầu gai

Tỉ lệ nước/nguyên liệu (v/w)	Cầu gai vàng Hàm lượng protein hoà tan tổng số (mg/g)	Cầu gai đen Hàm lượng protein hoà tan tổng số (mg/g)
0,5/1,0	140,24 ^c ± 0,17	138,24 ^c ± 0,16
1,0/1,0	171,29 ^a ± 0,21	150,24 ^a ± 0,13
1,5/1,0	165,71 ^b ± 0,30	146,69 ^b ± 0,21
2,0/1,0	163,81 ^c ± 0,09	153,81 ^c ± 0,09
2,5/1,0	159,87 ^d ± 0,15	143,27 ^d ± 0,11

Bảng 4.23. Kết quả nghiên cứu tỉ lệ enzyme Alcalase bổ sung thích hợp

Tỉ lệ enzyme (%) (v/v)	Cầu gai vàng Hàm lượng protein hoà tan tổng số (mg/g)	Cầu gai đen Hàm lượng protein hoà tan tổng số (mg/g)
0,5	171,30 ^b ± 0,34	150,26 ^b ± 0,21
1,0	199,48 ^a ± 0,21	190,24 ^a ± 0,13
1,5	198,50 ^a ± 0,22	190,30 ^a ± 0,12
2,0	197,18 ^a ± 0,31	189,12 ^a ± 0,16
2,5	196,04 ^a ± 0,17	189,14 ^a ± 0,15

Bảng 4.24. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của pH tới quá trình thủy phân

pH	Cầu gai vàng Hàm lượng protein hoà tan tổng số (mg/g)	Cầu gai đen Hàm lượng protein hoà tan tổng số (mg/g)
6,0	146,11 ^d ± 0,34	141,26 ^c ± 0,21
6,5	183,65 ^b ± 0,21	175,41 ^b ± 0,13
7,0	198,40 ^a ± 0,24	190,34 ^a ± 0,13
7,5	183,42 ^b ± 0,13	173,13 ^c ± 0,13
8,0	172,84 ^c ± 0,17	169,14 ^d ± 0,15

Bảng 4.25. Kết quả ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân tới quá trình thủy phân

Nhiệt độ (°C)	Cầu gai vàng Hàm lượng protein hoà tan tổng số (mg/g)	Cầu gai đen Hàm lượng protein hoà tan tổng số (mg/g)
35	141,13 ^c ± 0,12	129,26 ^d ± 0,17
40	186,51 ^c ± 0,19	153,45 ^c ± 0,13
45	203,34 ^a ± 0,18	193,34 ^a ± 0,13
50	189,13 ^b ± 0,13	176,34 ^b ± 0,13
55	171,31 ^d ± 0,16	153,42 ^c ± 0,13

Bảng 4.26. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được

Thời gian thủy phân (giờ)	Cầu gai vàng Hàm lượng protein hoà tan tổng số (mg/g)	Cầu gai đen Hàm lượng protein hoà tan tổng số (mg/g)
5,0	159,28 ^d ± 0,15	148,19 ^d ± 0,13
5,5	203,48 ^c ± 0,24	193,25 ^c ± 0,16
6,0	219,51 ^a ± 0,17	210,13 ^a ± 0,12
6,5	218,24 ^a ± 0,33	210,15 ^a ± 0,14
7,0	201,41 ^b ± 0,27	197,35 ^b ± 0,17

Áp dụng phương pháp phân tích hồi quy các số liệu thực nghiệm, thu được mô hình đa thức bậc hai thể hiện hàm lượng protein hòa tan tổng số có trong dịch sau thủy phân như sau:

Với mẫu trứng câu gai đen:

$$Y = 203,14 + 38,25*A - 3,8*B + 41,13*C + 17,61*A*B + 33,90*A*C - 10,01*B*C - 47,27*A^2 - 53,55*B^2 - 78,60*C^2$$

Với mẫu trứng câu gai vàng:

$$Y = + 217,73 + 46,41*A + 0,95*B + 44,49*C + 8,04*A*B + 36,33*A*C - 11,53*B*C - 56,48*A^2 - 62,41*B^2 - 78,43*C^2$$

Trong đó **Y** là hàm lượng protein hòa tan thu được, các giá trị **A**, **B**, **C** lần lượt là các giá trị của các yếu tố **A**: Tỷ lệ enzyme (%); **B**: Tỷ lệ giữa nước/nguyên liệu (v/w); **C**: Thời gian thủy phân (giờ). Xem xét ảnh hưởng của từng yếu tố (khi các yếu tố khác được giữ ở mức trung bình trong khoảng chạy của chúng). Theo phương trình hồi quy thu được cho thấy yếu tố tác động đến hàm lượng protein hòa tan là nhiệt độ, tiếp đến là tỉ lệ nước/ nguyên liệu và thời gian thủy phân. Phân tích ANOVA được sử dụng để đánh giá mô hình. Kết quả phân tích ANOVA được thể hiện qua bảng 4.28 và bảng 4.29.

Bảng 4.28. Phân tích phương sai ANOVA của mô hình thủy phân trứng câu gai đen

Nguồn	SS	DF	MS	Chuẩn F	Giá trị P
Model	84291,84	9	9365,76	373,46	< 0,0001
A - Tỷ lệ enzyme	11706,03	1	11706,03	466,78	< 0,0001
B - Nước/Nguyên liệu	115,29	1	115,29	4,60	0,0692
C - thời gian thủy phân	13535,88	1	13535,88	539,75	< 0,0001
AB	1240,10	1	1240,10	49,45	0,0002
AC	4596,16	1	4596,16	183,27	< 0,0001
BC	400,80	1	400,80	15,98	0,0052
A ²	9408,82	1	9408,82	375,18	< 0,0001
B ²	12073,66	1	12073,66	481,44	< 0,0001
C ²	26015,11	1	26015,11	1037,36	< 0,0001
Residual	175,55	7	25,08		
Lack of Fit	88,43	3	29,48	1,35	0,3763
Sai số	87,11	4	21,78		
SS tổng số	84467,39	16			

Bảng 4.29. Phân tích phương sai ANOVA của mô hình thủy phân trứng cầu gai vàng

Nguồn	SS	DF	MS	Chuẩn F	Giá trị P
Model	101300	9	11250,80	270,87	< 0,0001
A- Tỷ lệ enzyme	17233,89	1	17233,89	414,92	< 0,0001
B-Nước/Nguyên liệu	7,16	1	7,16	0,17	0,0690
C-thời gian thủy phân	15834,88	1	15834,88	381,24	< 0,0001
AB	258,73	1	258,73	6,23	0,0412
AC	5279,48	1	5279,48	127,11	< 0,0001
BC	531,76	1	531,76	12,80	0,0090
A ²	13434,04	1	13434,04	323,43	< 0,0001
B ²	16400,17	1	16400,17	394,85	< 0,0001
C ²	25901,88	1	25901,88	623,61	< 0,0001
Residual	290,75	7	41,54		
Lack of Fit	190,74	3	63,58	2,54	0,1945
Sai số	100,01	4	25,00		
SS tổng số	101500	16			

SS: Tổng phương sai; **DF:** Bậc tự do; **MS:** Trung bình phương sai; **Chuẩn F:** Chuẩn Fisher; **Residual:** Phần dư; **“Lack of Fit”:** Chuẩn đánh giá độ không tương thích của mô hình với thực nghiệm,

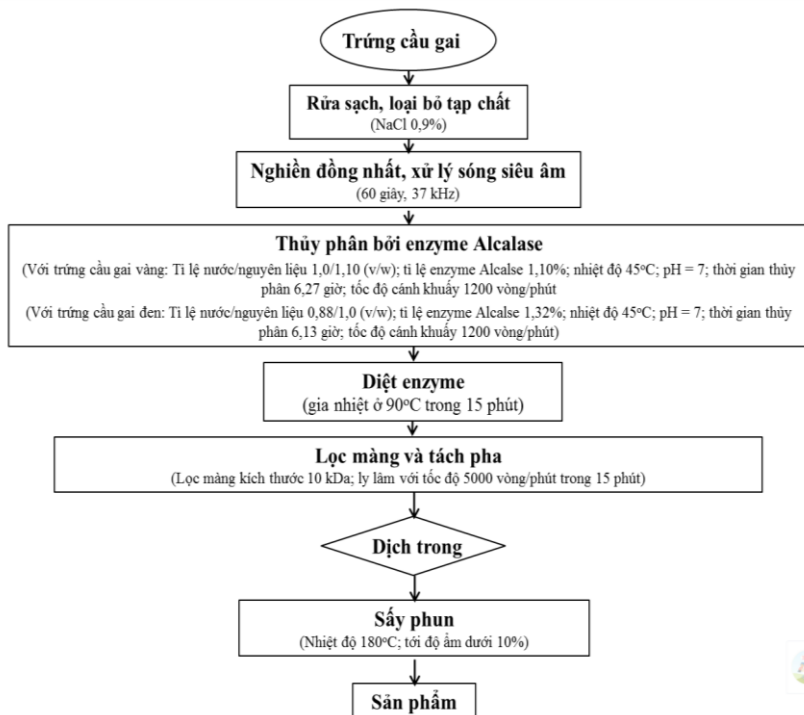
Kiểm tra sự có ý nghĩa và sự tương thích của mô hình được tiến hành bằng phân tích bảng 4.28 và bảng 4.29, phân tích ANOVA ta thấy giá trị xác suất của mô hình P-value < 0,0001 < 0,05 do đó mô hình được lựa chọn có ý nghĩa. Hệ số hồi quy $R^2 = 0,9954$, Kết quả này cho thấy có 99,54% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán của mô hình, Sử dụng phương pháp hàm kỳ vọng để tối ưu hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được từ dịch thủy phân trứng cầu gai bằng phần mềm Design-Expert. Tương tác giữa tỉ lệ enzyme và thời gian thủy phân (tỉ lệ nước/nguyên liệu được giữ ở mức trung bình) là lớn nhất, tiếp đến đó mô hình tương tác giữa tỉ lệ enzyme và tỉ lệ nước/nguyên liệu (thời gian thủy phân được giữ ở mức trung bình) và ít tương tác nhất mô hình tương tác giữa tỉ lệ nước/nguyên liệu và thời gian thủy phân (tỉ lệ enzym được giữ ở mức trung bình). Trong đó, phương án tốt nhất để cực đại hàm mục tiêu là: tỉ lệ enzyme 1,32%, tỉ lệ nước/nguyên liệu 0,88/1,0 mL/g nguyên liệu, thời gian thủy phân 6,13 giờ. Khi đó hàm lượng protein hoà tan tổng số đạt được trong các điều kiện trên theo tính toán là 212,63 mg/g trứng cầu gai. Kết quả này có độ tương thích cao so với kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm.

Quy trình chung thủy phân protein từ trứng cầu gai

Xử lý nguyên liệu: 1 kg trứng cầu gai cấp đông ở nhiệt độ -20°C được rã đông ở điều kiện nhiệt độ thường. Sau đó toàn bộ khối trứng được rửa qua 3 lần nước sạch để loại bỏ tạp chất bám trên bề mặt trứng cầu gai. Toàn bộ trứng cầu gai sau đó được nhúng ngập trong chậu nước chứa dung dịch muối NaCl 0,9% và tiến hành rửa nhẹ nhàng kết hợp loại bỏ toàn bộ phần gân cơ thuộc khoang cơ thể của trứng cầu gai, Sau đó trứng cầu gai được để trên khay có lỗ thoát nước và để ráo.

Trứng cầu gai sau khi để ráo được cho vào thiết bị nghiền trực vít, bật máy nghiền để xay nhỏ nguyên liệu. Nguyên liệu sau khi nghiền nhỏ được đưa vào thiết bị phát sóng siêu âm ở tần số 37KHz trong 60 giây.

Thủy phân trứng cầu gai: Sau đó, Khối dịch trứng cầu gai sau khi nghiền nhỏ được bổ sung nước với tỉ lệ nước/nguyên liệu 1/1,1 (v/w) với trứng cầu gai vàng và 0,88/1 (v/w) với cầu gai đen; bổ sung enzyme Alcalase với tỉ lệ 1,1% với cầu gai vàng và 1,32% với cầu gai đen và được đưa vào thiết bị thủy phân tự động có cánh khuấy. Cài đặt các thông số cho thiết bị thủy phân bao gồm nhiệt độ 45°C , pH = 7,0 và thời gian là 6,27 giờ với trứng cầu gai vàng và 6,13 giờ với trứng cầu gai đen, tốc độ cánh khuấy duy trì 1200 vòng/phút.



Diệt enzyme và diệt vi sinh vật: Kết thúc quá trình thủy phân, tắt cánh khuấy và cài đặt nhiệt độ của thiết bị lên 90°C. Theo dõi khi nào máy báo nhiệt độ khối dịch đạt 90°C thì bắt đầu tính thời gian 15 phút. Sau 15 phút, tắt hoàn toàn thiết bị và để nguội ở nhiệt độ phòng, thu được bán thành phẩm.

Lọc dịch thủy phân: Sau 60 phút, hỗn hợp thủy phân - bán thành phẩm đã đạt tới nhiệt độ 25°C, toàn bộ khối dịch được đưa qua màng lọc protein có kích thước lỗ màng 10 kDa và đưa vào máy vắt ly tâm. Tiến hành ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 15 phút, thu được dịch lọc và bã rắn, trong đó dịch lọc chứa các acid amin tự do, oligopeptide và protein hòa tan phân tử lượng thấp (nhỏ hơn 10 kDa) và pha dầu, còn bã chứa các thành phần trứng cầu gai không thủy phân được, bã rắn này được sấy khô, đóng gói sử dụng làm chất dẫn dụ bổ sung vào thức ăn gia súc.

Sấy khô và thu hồi các acid amin tự do, oligopeptide và protein phân tử lượng thấp: Các acid amin tự do, oligopeptide và protein phân tử lượng thấp hòa tan đi qua màng được thu hồi, sấy phun ở nhiệt độ 180°C cho tới khi đạt độ ẩm nhỏ hơn 10%, thu được sản phẩm bột trứng cầu gai thủy phân giàu acid amin, oligopeptide và protein phân tử lượng thấp (<10 kDa). Bột trứng cầu gai thủy phân thu được có thể được bổ sung acid sorbic với tỷ lệ bằng 0,2% so với khối lượng bột sau sấy để bảo quản được tốt hơn. Bột trứng cầu gai thủy phân thu được có thể sử dụng làm thực phẩm bổ sung dinh dưỡng có tác dụng tăng cường sinh lực, bồi bổ cơ thể cho người suy nhược.

Hoàn thiện quy trình sản xuất, sản xuất thử nghiệm với nguyên liệu trứng cầu gai. Đề tài xây dựng tiêu chuẩn cho sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe từ trứng cầu gai. Độc tính cấp và độc tính trường diễn, đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, phân tích hàm lượng protein tổng số, acid amin, lipid tổng, thành phần acid béo và thành phần khoáng của sản phẩm đều đã được phân tích.

Bảng 4.30. Kết quả tổng hợp các mẻ sản xuất thử nghiệm trứng cầu gai

STT	Khối lượng nguyên liệu (kg)	Khối lượng sản phẩm thu được (kg)	Hiệu suất (%)
1	20,3	1,95	9,60
2	20,1	2,01	10,02
3	19,8	2,07	10,45
	$\Sigma = 60,2$	$\Sigma = 6,08$	TB = 10,02

Bảng 4.31. Số lượng chuột chết, biểu hiện bên ngoài của chuột khi uống TPBVSK trứng cầu gai

Lô	TPBVSK trứng cầu gai (g/kg)	Số chuột chết trong 72 giờ	Biểu hiện bên ngoài trong vòng 0 - 72 giờ
1	5	0	Sau khi uống mẫu, chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt
2	6	0	Sau khi uống mẫu 24h, chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt.
3	7	0	Sau khi uống mẫu 24h, chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt.
4	8	0	Sau khi uống TPBVSK trứng cầu gai một số con ít di chuyển, khả năng thu nhận thức ăn và nước uống giảm.
5	9	0	Sau khi uống TPBVSK trứng cầu gai một số con ít di chuyển, khả năng thu nhận thức ăn và nước uống giảm
6	10	0	Sau khi uống TPBVSK trứng cầu gai một số con ít di chuyển, khả năng thu nhận thức ăn và nước uống giảm

Bảng 4.32. Kết quả theo dõi khối lượng của chuột ở các lô

Lô (g/kg)	Khối lượng trung bình của chuột thí nghiệm			
	Trước khi uống	Ngày 1	Ngày 4	Ngày 7
5	21,09± 0,27	21,17 ± 0,31	22,08 ± 0,28	23,13 ± 0,25
6	21,33 ± 0,30	21,37 ± 0,35	22,32 ± 0,31	23,42 ± 0,32
7	21,28 ± 0,33	21,32 ± 0,32	22,23 ± 0,26	23,36 ± 0,30
8	21,55 ± 0,31	21,60 ± 0,26	22,65 ± 0,33	23,68 ± 0,29
9	21,47 ± 0,28	21,55 ± 0,31	22,51 ± 0,34	23,65 ± 0,30
10	21,34 ± 0,34	21,31 ± 0,29	22,23 ± 0,31	23,39 ± 0,26
<i>P</i>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Bảng 4.33. Ảnh hưởng của TPBVSK trứng cầu gai đến thể trọng thỏ

Lô TNo	Trọng lượng cơ thể (kg/con)		
	Trước thí nghiệm	Sau 2 tuần	Sau 4 tuần
ĐC	1,93 ± 0,27	2,41 ± 0,34	2,58 ± 0,41
TPBVSK trứng cầu gai (100 mg/kg/ngày)	1,91 ± 0,24	2,37 ± 0,35	2,63 ± 0,38
TPBVSK trứng cầu gai (300 mg/kg/ngày)	1,88 ± 0,25	2,17 ± 0,29	2,54 ± 0,36
TPBVSK trứng cầu gai (500 mg/kg/ngày)	1,83 ± 0,31	2,13 ± 0,32	2,49 ± 0,42

Bảng 4.34. Ảnh hưởng của TPBVSK trứng cầu gai đến số lượng hồng trong máu thỏ

Các chỉ tiêu	Đối chứng	TPBVSK trứng cầu gai liều 100 mg/kg/ngày	TPBVSK trứng cầu gai liều 300 mg/kg/ngày	Trứng TPBVSK trứng cầu gai liều 500 mg/kg/ngày
Bạch cầu ($\times 10^9/L$)	5,90 ± 0,82	5,95 ± 0,75	5,93 ± 1,03	5,90 ± 0,82
Hồng cầu ($\times 10^{12}/L$)	5,21 ± 0,38	5,26 ± 0,47	5,21 ± 0,43	5,25 ± 0,53
Hemoglobin (g/L)	9,75 ± 1,05	9,88 ± 1,23	9,62 ± 1,03	9,86 ± 1,38
HCT (fl)	62,38 ± 1,42	63,98 ± 1,59	61,86 ± 1,92	61,78 ± 1,68
MCV (g/L)	5,96 ± 0,96	5,93 ± 0,78	5,93 ± 1,03	5,90 ± 0,98
Tiểu cầu ($\times 10^9/L$)	326,12 ± 12,39	328,90 ± 15,53	334,68 ± 19,23	331,12 ± 12,39

Bảng 4.35. Ảnh hưởng của TPBVSK trứng cầu gai đến hoạt độ AST, ALT, Creatinin trong máu thỏ

Các chỉ tiêu	Đối chứng	TPBVSK trứng cầu gai liều 100 mg/kg/ngày	TPBVSK trứng cầu gai liều 300 mg/kg/ngày	TPBVSK trứng cầu gai liều 500 mg/kg/ngày
AST (UI/L)	42,73 ± 3,62	41,90 ± 2,82	41,88 ± 3,17	42,16 ± 3,54
ALT (UI/L)	55,26 ± 4,71	56,63 ± 4,33	57,01 ± 3,53	61,20* ± 4,42
Creatinin (UI/L)	1,18 ± 0,18	1,17 ± 0,20	1,21 ± 0,16	1,20 ± 0,15

Bảng 4.36. Kết quả mổ giải phẫu một số cơ quan nội tạng khi uống TPBVSK trứng cầu gai

Mô	Đối chứng	TPBVSK trứng cầu gai liều 100 mg/kg/ngày	TPBVSK trứng cầu gai liều 300 mg/kg/ngày	Trứng TPBVSK trứng cầu gai liều 500 mg/kg/ngày
Gan	Màu nâu, mô gan đồng nhất, không có tổn thương hay hoại tử	Màu nâu, mô gan đồng nhất, không có tổn thương hay hoại tử	Màu nâu, mô gan đồng nhất, không có tổn thương hay hoại tử	Màu nâu, mô gan đồng nhất, không có tổn thương hay hoại tử
Thận	Màu nâu nhạt, hai thận đều nhau, không có hiện tượng ứ nước	Màu nâu nhạt, hai thận đều nhau, không có hiện tượng ứ nước	Màu nâu nhạt, hai thận đều nhau, không có hiện tượng ứ nước	Màu nâu nhạt, hai thận đều nhau, không có hiện tượng ứ nước
Lách	Màu nâu đậm, mô đồng nhất, không sưng	Màu nâu đậm, mô đồng nhất, không sưng	Màu nâu đậm, mô đồng nhất, không sưng	Màu nâu đậm, mô đồng nhất, không sưng

Bảng 4.37. Sự thay đổi trọng lượng của chuột cho dùng TPBVSK trứng cầu gai

Lô TNo	Trọng lượng trung bình của chuột khi uống TPBVSK trứng cầu gai (g/con)				
	Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 21	Ngày 28
Đối chứng	21,20 ± 0,46	24,88 ± 0,44	26,35 ± 0,82	28,29 ± 1,22	30,31 ± 1,47
TPBVSK trứng cầu gai liều 100 mg/kg/ngày	21,50 ± 0,41	24,87 ± 0,42	26,48 ± 0,40	28,02 ± 0,42	30,38 ± 0,56
TPBVSK trứng cầu gai liều 300 mg/kg/ngày	21,35 ± 0,90	24,98 ± 1,05	27,10 ± 0,93	28,09 ± 0,87	29,80 ± 0,69
TPBVSK trứng cầu gai liều 500 mg/kg/ngày	21,62 ± 0,34	24,47 ± 0,42	26,73 ± 0,39	28,73 ± 0,71	30,60 ± 0,81

Bảng 4.38. Các chỉ tiêu huyết học khi chuột uống TPBVSK trứng cầu gai

Các chỉ tiêu	Đối chứng	TPBVSK trứng cầu gai liều 100 mg/kg/ngày	TPBVSK trứng cầu gai liều 300 mg/kg/ngày	TPBVSK trứng cầu gai liều 500 mg/kg/ngày
Bạch cầu ($\times 10^9/L$)	6,21 \pm 0,42	6,34 \pm 0,07	6,20 \pm 0,34	3,73 \pm 0,92
Hồng cầu($\times 10^{12}/L$)	8,16 \pm 0,25	8,54 \pm 0,17	8,41 \pm 0,16	8,47 \pm 0,22
Hemoglobin (g/L)	121,67 \pm 2,67	127,33 \pm 2,03	127,67 \pm 0,88	126,67 \pm 2,85
HCT (fl)	0,42 \pm 0,01	0,43 \pm 0,00	0,43 \pm 0,01	0,44 \pm 0,01
MCV (g/L)	51,27 \pm 0,19	51,47 \pm 0,48	51,03 \pm 0,62	51,50 \pm 0,65
MCH (pg)	14,90 \pm 0,15	14,83 \pm 0,33	14,80 \pm 0,40	14,93 \pm 0,12
MCHC (g/L)	290,33 \pm 1,76	288,00 \pm 1,53	290,00 \pm 2,08	289,67 \pm 1,76
RDW (%)	11,90 \pm 0,35	12,10 \pm 0,21	12,10 \pm 0,25	12,10 \pm 0,35
HDW (g/L)	15,43 \pm 0,18	16,63 \pm 0,58	16,07 \pm 0,23	16,40 \pm 0,70
CHCM (g/L)	275,67 \pm 1,33	277,00 \pm 2,65	278,00 \pm 4,62	277,67 \pm 3,48
CH (pg)	14,13 \pm 0,12	14,27 \pm 0,12	14,67 \pm 0,32	14,30 \pm 0,06
MPV (fL)	6,23 \pm 0,07	6,57 \pm 0,07	6,60 \pm 0,06	6,60 \pm 0,15
% NEUT	10,23 \pm 3,22	11,87 \pm 0,35	11,70 \pm 0,59	11,80 \pm 1,30
% LYMPH	51,80 \pm 2,47	46,60 \pm 2,00	45,77 \pm 2,74	46,23 \pm 6,35
% MONO	26,80 \pm 2,51	33,97 \pm 1,51	34,80 \pm 1,54	34,30 \pm 3,46
% EOS	0,30 \pm 0,06	0,43 \pm 0,03	0,47 \pm 0,03	0,50 \pm 0,12
% BASO	0,27 \pm 0,03	0,33 \pm 0,07	0,33 \pm 0,07	0,30 \pm 0,10
% LUC	7,27 \pm 1,23	6,77 \pm 0,18	6,90 \pm 0,72	6,83 \pm 2,60
Tiểu cầu ($\times 10^9/L$)	677,67 \pm 2,60	639,67 \pm 8,57	666,00 \pm 7,23	656,00 \pm 16,74

Bảng 4.39. Chỉ tiêu hóa sinh khi uống TPBVSK trứng cầu gai

Các chỉ tiêu	Đối chứng	TPBVSK trứng cầu gai liều 100 mg/kg/ngày	TPBVSK trứng cầu gai liều 300 mg/kg/ngày	TPBVSK trứng cầu gai liều 500 mg/kg/ngày
AST (UI/L)	118,80 \pm 1,88	118,70 \pm 1,46	117,00 \pm 2,25	118,53 \pm 2,09
ALT (UI/L)	34,17 \pm 0,79	35,57 \pm 0,69	37,33 \pm 0,75	39,73* \pm 0,67
Creatinin (UI/L)	25,67 \pm 0,66	26,00 \pm 1,01	26,10 \pm 0,38	26,20 \pm 0,64

Bảng 4.50. Kết quả mô giải phẫu các cơ quan nội tạng chuột thí nghiệm khi uống TPBVSK trứng cầu gai

<i>Lô Tno</i>	Kết quả mô giải phẫu các cơ quan nội tạng chuột thí nghiệm khi uống TPBVSK trứng cầu gai		
	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
TPBVSK trứng cầu gai liều 100 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
TPBVSK trứng cầu gai liều 300 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
TPBVSK trứng cầu gai 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

Bảng 4.51. Trọng lượng của một số cơ quan nội tạng (gram/10 gram thể trọng)

<i>Lô Tno</i>	Trọng lượng của một số nội quan (gram/10 gram thể trọng)		
	Gan	Thận	Lách
Đối chứng	0,388 ± 0,017	0,105 ± 0,004	0,038 ± 0,001
TPBVSK trứng cầu gai liều 100 mg/kg/ngày	0,394 ± 0,034	0,103 ± 0,005	0,039 ± 0,002
TPBVSK trứng cầu gai liều 300 mg/kg/ngày	0,397 ± 0,025	0,104 ± 0,003	0,039 ± 0,001
TPBVSK trứng cầu gai liều 500 mg/kg/ngày	0,396 ± 0,011	0,102 ± 0,003	0,038 ± 0,001

Bảng 4.52. Ảnh hưởng của chế phẩm TPBVSK trứng cầu gai lên hoạt độ ức chế superoxid anion của huyết thanh chuột

Lô nghiên cứu	n	Độ ức chế	%ĐC	P
ĐC	11	27,44 ± 0,62	100	
TN1	11	36,25 ± 1,54	132,11	< 0,05
TN2	11	39,70 ± 2,43	144,67	< 0,05

Bảng 4.53. Thành phần protein tổng số và acid amin của TPBVSK trứng cầu gai

Thành phần	Hàm lượng (% MK)	Thành phần	Hàm lượng (% MK)
Protein hòa tan	74,67	Tyrosine	2,038
Acid Aspartic	4,956	Cysteine	4,385
Aspartic	4,970	Valine*	2,365
Serine	2,834	Methionine*	1,548
Histidine*	1,820	Phenynalanine*	2,558
Glycine	4,965	Isoleucine*	2,987
Threonine*	2,653	Leucine*	2,582
Alanine	2,475	Lysine*	4,965
Agarginine	4,296	Proline	2,120

Bảng 4.54. Thành phần lipid và acid béo của TPBVSK trứng cầu gai

Thành phần	Hàm lượng (% MK)	Thành phần	Hàm lượng (% MK)
Lipid tổng số	21,56	C18:3 (n-6)	0,93
C12:0	0,07	C20:0	0,45
C14:0	13,67	C20:3 (n-3)	0,65
C14:1 (n-7)	2,14	C20:4 (n-6) (AA)	9,85
C15:0	0,60	C20:5 (n-3) (EPA)	7,18
C16:1 (n-9)	8,64	C20:2 (n-6)	0,83
C16:0	19,82	C20:1 (n-9)	2,76
C16:2 (n-4)	1,01	C20:4 (n-3)	1,42
C16:1 (n-7)	2,73	C22:6 (n-3) (DHA)	2,51
C18:0	2,07	C22:1 (n-9)	0,67
C18:2 (n-6)	2,76	C22:6 (n-6)	0,12
C18:1 (n-9)	11,73	C22:4 (n-6)	0,31
C18:4 (n-3)	3,13	Khác	1,51
C18:1 (n-7)	0,78	Tổng acid béo no	36,68
C18:3 (n-3)	1,66	Tổng acid béo không no	61,81

Bảng 4.55. Thành phần hormone của TPBVSK trứng cầu gai

Mẫu	Carotenoid tổng số (ng/g vck)	Testosteron (ng/g vck)	Estradiol (ng/g vck)	Progesteron (ng/g vck)
TPBVSK trứng cầu gai	331,54	0,32	30,81	0,16

Thành phần nguyên tố đa vi lượng
Bảng 4.56. Thành phần nguyên tố đa vi lượng của TPBVSK trứng cầu gai

Mẫu	Zn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Fe (mg/kg)	As (mg/kg)	Se (mg/kg)
TPBVSK trứng cầu gai	158,35	17,03	9,98	50,25	7,39	8,16



Sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe trứng cầu gai thủy phân

KẾT LUẬN

1. Kết quả nghiên cứu hóa học, thành phần các lớp chất lipid, phospholipid

- Thành phần hóa học chính của trứng và thân cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* và loài cầu gai đen *Diadema savignyi* thu thập tại vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa đã được nghiên cứu. Trong đó hàm lượng nước chiếm 75,28% trong trứng và 68,12% trong thân cầu gai vàng; chiếm 80,13% và 71,51% tương ứng trong trứng và thân cầu gai đen. Hàm lượng protein tổng số của trứng của cả hai loại cầu gai cao hơn trong thân khoảng 3,5 lần, protein tổng số trong trứng cầu gai vàng là 12,45% và 11,74% với cầu gai đen. Hàm lượng protein hòa tan của trứng cầu gai vàng là 141,48 mg/g trong khi của cầu gai đen là 82,43 mg/g, protein hòa tan trong thân thấp hơn nhiều chiếm 38,71 mg/g và 26,91 mg/g với thân cầu gai vàng và cầu gai đen.

- Đây là công trình đầu tiên nghiên cứu sâu về thành phần hóa học lipid, các lớp chất lipid, thành phần acid béo và các dạng phân tử phospholipid có trong thân, trứng của loài cầu gai vàng *Tripneuster gratilla* và loài cầu gai đen *Diadema savignyi*.

- Hàm lượng lipid tổng trong trứng của cả hai loài cầu gai nghiên cứu đều cao hơn trong thân khoảng 3 lần. Lipid tổng của trứng cầu gai vàng chiếm 4,41% và cầu gai đen là 3,18% trong khi trong mẫu thân tỉ lệ này là 1,32% và 1,33% tương ứng.

- Đã phát hiện được trong lipid tổng của trứng và thân của hai loài cầu gai vàng đều gồm 7 lớp chất là: Lipid phân cực, monoacyl và diacyl glycerol; sterol; acid béo; triglyceride; monoalkyl diacylglycerol; hydrocacbon và sáp. Trong khi đó với lipid từ thân và trứng cầu gai đen chỉ nhận được 6 lớp chất lipid và không có thành phần monoacyl và diacyl glycerol.

- Trong cả hai loài nghiên cứu, trong lipid tổng hàm lượng triglyceride là cao nhất sau đó tới sterol, acid béo và lipid phân cực. Với mẫu cầu gai vàng hàm lượng triglyceride chiếm 78,37% (trong trứng) và 76,10% (trong thân); với cầu gai đen chiếm 55,27% (trong trứng) và 32,39% (trong thân) - thấp hơn nhiều so với cầu gai vàng. Ngược lại hàm lượng sterol và lipid phân cực của cầu gai đen lại cao hơn nhiều so với cầu gai vàng. Cụ thể, sterol trong cầu gai đen là 12,45% (trong trứng) và 19,57% (trong thân) còn ở cầu gai vàng là 5,69% (trong trứng) và 6,63% (trong thân). Lipid phân cực có trong trứng cầu gai đen là 20,47%, trong thân cầu gai đen là 33,94% trong khi của cầu gai vàng là 4,41% trong trứng và 6,36% trong thân.

- Thành phần các acid béo trong lipid tổng của 4 mẫu trứng và thân cầu gai đã được nghiên cứu, trong đó ghi nhận 25 acid béo trong mẫu trứng cầu gai vàng và 29 acid béo trong mẫu trứng cầu gai đen. Các acid béo điển hình trong cả trứng cầu gai vàng và cầu gai đen là: 14:0; 16:1 (n-9); 16:0; 18:1 (n-9) và 20:4 (n-6).

- Công trình đã báo cáo được dạng phân tử phospholipid của thân và trứng cầu gai đen và cầu gai vàng. Kết quả nhận được, PL của thân và trứng cầu gai có 7 lớp chất gồm PI; PS; PE; PA; PC; LPC; LPE. Trong đó PE có 24 dạng phân tử; 76 dạng phân tử của PC; 16 dạng phân tử PS; 11 dạng phân tử PA; 24 dạng phân tử của PI; 19 dạng phân tử của LPC; 10 dạng phân tử LPE. Lipid tổng của các mẫu nghiên cứu còn phát hiện được 23 dạng phân tử SQDG. Đây là những số liệu lần đầu được tìm thấy trong mẫu lipid của thân và trứng cầu gai vàng *Tripneuster gratilla* và cầu gai đen *Diadema savignyi*.

2. Kết quả nghiên cứu tạo sản phẩm ứng dụng trong công nghệ thực phẩm

- Công trình nghiên cứu đã xây dựng được quy trình thủy phân trứng cầu gai vàng và cầu gai đen thu sản phẩm protein có khối lượng phân tử thấp (dưới 10 kDa) bằng enzyme Alcalase và đưa ra được phương trình hồi quy mô tả hàm lượng protein hòa tan của cả trứng cầu gai vàng và cầu gai đen trong điều kiện tối ưu hóa 3 thông số công nghệ có ảnh hưởng lớn nhất tới quá trình thủy phân là: Tỉ lệ enzyme (%); B: Tỉ lệ nước/nguyên liệu (mL/g); C: Thời gian thủy phân (giờ).

- Với trứng cầu gai đen *Diadema savignyi* các thông số công nghệ bao gồm: Tỉ lệ nước/nguyên liệu: 0,88/1 (w/v); tỉ lệ enzyme Alcalase: 1,32%; nhiệt độ thủy phân 45°C; thời gian thủy phân 6,13 giờ; pH duy trì tại 7 và hàm lượng protein hòa tan thu được đạt 212,63 mg/g.

- Với trứng cầu gai vàng *Tripneuster gratilla* các thông số công nghệ bao gồm: Tỉ lệ nước/nguyên liệu 1/1 (v/w); tỉ lệ enzyme Alcalase: 1,1%; nhiệt độ thủy phân 45°C; thời gian thủy phân 6,27 giờ; pH duy trì tại 7 và hàm lượng protein hòa tan thu được đạt 230,045 mg/g. Công nghệ sản xuất có tính ổn định cao, hiệu suất thu hồi đạt 10,02%.

- Đã đánh giá chất lượng và khảo sát hoạt tính sinh học của sản phẩm nghiên cứu. Kết quả cho thấy hàm lượng protein hòa tan của sản phẩm đạt 74,67% (mẫu khô), đây là thành phần protein phân tử lượng thấp dưới 10 kDa, đã được chứng minh là các peptide có hoạt tính sinh học cao. Thành phần acid amin và acid béo của sản phẩm đã được phân tích. Sản phẩm có chứa 17 acid amin trong đó có đầy đủ 8 acid amin thiết yếu, đặc biệt hàm lượng acid amin Lysine cao, chiếm 4,965%. Thành phần acid béo đa dạng và có đủ 3 acid béo thiết yếu là AA (9,85%); EPA (7,18%) và DHA (2,51%).

- Sản phẩm được đánh giá tác dụng độc tính cấp *in vivo* (không thuộc nhóm gây độc theo đường uống) và tác dụng độc tính bán trường diễn *in vivo* (không gây độc) trên đối tượng nghiên cứu là chuột.

- Sản phẩm có chứa carotenoid 331,54 (ng/g vck) và các steroid quan trọng cho cơ thể như testosterone (0,32 ng/g vck), progesteron (0,16 ng/g vck), estradiol (30,81 ng/g vck) và carotenoid 331,54 (ng/g vck).

- Sản phẩm protein thủy phân từ trứng cầu gai đã được đăng ký và công bố chất lượng sản phẩm, đạt tiêu chuẩn là thực phẩm bảo vệ sức khỏe với tên “Thực phẩm bảo vệ sức khỏe Trứng cầu gai”.

KIẾN NGHỊ

- Cần nghiên cứu sâu hoạt tính sinh học cũng như khả năng hấp thụ dinh dưỡng của các đối tượng sử dụng khác nhau như người già, trẻ em, người trưởng thành đối với sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe trứng gà gai. Do đó cần tiến hành thêm các thử nghiệm chuyên sâu trước khi đưa quy trình vào sản xuất công nghiệp.

- Cần phân tách sản phẩm bột protein thủy phân thành các phân đoạn khác nhau dựa trên kích thước nhỏ hơn 10 kDa, từ đó đánh giá hoạt tính sinh học có lợi của từng phân đoạn thu được và định hướng tạo các sản phẩm khác nhau, có hoạt tính khác nhau và áp dụng cho các đối tượng người sử dụng khác nhau.

- Các dạng phân tử phospholipid tìm được, đặc biệt là các dạng phân tử chiếm tỉ lệ lớn cần được tách riêng và thử nghiệm hoạt tính sinh học có lợi. Để chứng minh chặt chẽ hơn nữa cấu trúc hóa học của các dạng phân tử phospholipid trong từng lớp chất phospholipid thì cần phải phân tích thành phần acid béo của từng phân lớp phospholipid thay vì chỉ phân tích thành phần acid béo của mẫu lipid tổng.

- Cần đi sâu phân tích thành phần sterol của lipid trong mẫu trứng và thân của loài gà gai đen vì nó chiếm tỉ lệ rất lớn trong lipid tổng của loài gà gai này.