

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



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

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

Hà Nội - 2024

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC CÁC HỢP CHẤT THIÊN NHIÊN

Mã số: 9 44 01 17

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2

PGS. TS. Đoàn Lan Phương TS. Nguyễn Phi Hùng

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây 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 2024

Tác giả

Đinh Thị Kim Hoa

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được tiến hành tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu tại Học viện, tôi luôn nhận được sự trợ giúp, hướng dẫn, chỉ bảo tận tình của quý thầy cô, các anh chị kỹ thuật viên và các học viên khác.

Đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới PGS.TS Đoàn Lan Phương và TS. Nguyễn Phi Hùng, Viện Hóa học các hợp chất Thiên nhiên đã tận tình hướng dẫn và chỉ dạy cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu để tôi có thể hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự quan tâm giúp đỡ của Ban lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ, Ban lãnh đạo và các phòng chức năng của Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên đã tạo mọi điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin cảm ơn anh chị em kỹ thuật viên phòng hóa sinh hữu cơ, phòng phân tích hóa học và các phòng ban khác - Viện hóa học các hợp chất Thiên nhiên đã luôn hỗ trợ, động viên tôi trong suốt thời gian tôi học tập tại viện.

Tôi xin cảm ơn GS.TS Phạm Quốc Long, PGS.TS. Trần Quốc Toàn, PGS. TS Trần Thị Thu Thủy, TS. Đặng Thị Phương Ly, TS. Trịnh Thị Thu Hương, TS. Hoàng Thị Bích, PGS.TS. Phạm Minh Quân đã chỉ cho tôi rất nhiều kỹ năng cũng như kinh nghiệm quý báu trong quá trình thực nghiệm và viết luận án.

Đồng thời, tôi gửi lời cảm ơn tới ban lãnh đạo trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên, Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên và đồng nghiệp đã hỗ trợ tôi việc giảng dạy để tôi yên tâm học tập và nghiên cứu tại Hà Nội.

Cuối cùng, tôi xin được biết ơn sâu sắc đến gia đình tôi, những người luôn động viên tinh thần cho tôi vượt qua mọi khó khăn để có được kết quả như ngày hôm nay.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày tháng năm 2024

Tác giả

Đinh Thị Kim Hoa

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC BẢNG	vii
DANH MỤC HÌNH VÀ SƠ ĐỒ.....	x
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT.....	xii
MỞ ĐẦU.....	1
1. Lý do chọn đề tài	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài.....	3
5. Những đóng góp mới của luận án	3
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	4
1.1. Tổng quan về nguyên liệu nghiên cứu	4
1.1.1. Tổng quan chung về Cầu gai	4
1.1.2. Tổng quan về Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i>	11
1.1.3. Tổng quan về Cầu gai đen <i>Diadema savignyi</i>	13
1.2. Tổng quan về phospholipid	16
1.2.1. Khái niệm và phân loại phospholipid.....	16
1.2.2. Hoạt tính sinh học của phospholipid	20
1.2.3. Tình hình nghiên cứu các phương pháp tách chiết phospholipid.....	21
1.3. Tổng quan về công nghệ thủy phân protein bằng enzyme	23
1.3.1. Giới thiệu chung về quá trình thủy phân protein.....	23
1.3.2. Tổng quan về hệ enzyme thủy phân protein.....	24
1.3.3. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước về quá trình thủy phân protein	26
CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	31
2.1. Nguyên liệu nghiên cứu.....	31
2.1.1. Mẫu Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i>	31
2.1.2. Mẫu Cầu gai đen <i>Diadema savignyi</i>	31
2.2. Phương pháp nghiên cứu	32

2.2.1. Phương pháp phân tích thành phần hóa học.....	32
2.2.2. Phương pháp phân lập và nhận dạng các phospholipid	34
2.2.3. Phương pháp tối ưu hóa quá trình thủy phân protein đa nhân tố	35
2.2.4. Phương pháp xác định hoạt tính sinh học.....	35
2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu	36
CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM.....	37
3.1. Xác định thành phần hóa học của nguyên liệu trứng và thân Cầu gai vàng và Cầu gai đen.....	37
3.1.1. Xác định hàm lượng protein tổng số bằng phương pháp Kjeldahl	37
3.1.2. Xác định hàm lượng protein hòa tan	39
3.1.3. Xác định hàm lượng tro tổng số	42
3.1.4. Xác định hàm lượng nước	42
3.1.5. Xác định thành phần và hàm lượng acid amin	42
3.2. Chiết tách lipid tổng và xác định thành phần của lipid tổng	44
3.2.1. Chiết tách lipid tổng	44
3.2.2. Xác định thành phần và hàm lượng các lớp chất lipid trong lipid tổng	44
3.2.3. Xác định thành phần acid béo của lipid tổng	44
3.3. Phân lập và nhận dạng các phospholipid.....	45
3.3.1. Phân lập các phospholipid	45
3.3.2. Nhận dạng các phospholipid	45
3.4. Thủy phân protein từ trứng Cầu gai	47
3.4.1. Sơ đồ quy trình thực nghiệm thủy phân trứng Cầu gai	47
3.4.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của các đơn nhân tố tới quá trình thủy phân trứng Cầu gai	48
3.4.3. Tối ưu hóa quá trình thủy phân trứng Cầu gai	49
3.5. Đánh giá hoạt tính sinh học của sản phẩm protein thủy phân.....	51
3.5.1. Độc tính cấp.....	51
3.5.2. Đánh giá độc tính bán trường diễn của sản phẩm TPBVSK trứng Cầu gai.....	51
CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	52
4.1. Thành phần hóa học của thân, trứng Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i> và Cầu gai đen <i>Diadema savignyi</i>	52

4.2. Các lớp chất lipid, hàm lượng của chúng và thành phần acid béo trong mẫu thân, trứng Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i> và Cầu gai đen <i>Diadema savignyi</i>	54
4.2.1. Thành phần và hàm lượng các lớp chất lipid của mẫu thân, trứng Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i>	54
4.2.2. Thành phần và hàm lượng các lớp chất lipid của mẫu thân, trứng Cầu gai đen	56
4.2.3. Thành phần và hàm lượng của các acid béo trong mẫu thân, trứng Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i>	58
(SFA: Acid béo bão hòa, MUFA: Acid béo chưa no có một nối đôi, PUFA: Acid béo chưa no đa nối đôi)	59
4.2.4. Thành phần và hàm lượng acid béo của mẫu thân, trứng Cầu gai đen <i>Diadema savignyi</i>	60
4.3. Dạng phân tử phospholipid của lipid tổng từ mẫu thân, trứng Cầu gai vàng và Cầu gai đen.....	63
4.3.1. Dạng phân tử phosphatidylinositol (PI)	64
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 <i>Tripneustes gratilla</i> (Bảng 4.6) và 23 dạng phân tử PI của mẫu thân và 24 dạng phân tử PI của trứng Cầu gai đen <i>Diadema savignyi</i> (Bảng 4.7).	64
4.3.2. Dạng phân tử phosphatidylserine (PS)	70
4.3.3. Dạng phân tử phosphatidylethanolamine (PE).....	73
4.3.4. Dạng phân tử acid phosphatidic (PA)	79
4.3.5. Dạng phân tử phosphatidylcholine (PC)	82
4.3.6. Dạng phân tử lyso phosphatidylcholine (LPC)	92
4.3.7. Dạng phân tử lysophosphatidylethanolamine (LPE).....	94
4.3.8. Dạng phân tử sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG)	95
4.4. Kết quả nghiên cứu quá trình thủy phân trứng Cầu gai vàng và Cầu gai đen bằng enzyme Alcalase	98
4.4.1. Kết quả nghiên cứu đơn nhân tố ảnh hưởng tới quá trình thủy phân protein.....	98
4.4.2. Kết quả nghiên cứu tối ưu hóa quá trình thủy phân protein.....	104
4.4.3. Quy trình thủy phân protein từ trứng Cầu gai	109

4.4.4. Kết quả sản xuất thử nghiệm sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) trứng Cầu gai	110
4.4.5. Đánh giá tác dụng độc tính cấp in vivo của TPBVSK trứng Cầu gai	111
4.4.6. Đánh giá độc tính bán trường diễn in vivo của TPBVSK trứng Cầu gai	113
4.4.7. Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của TPBVSK trứng Cầu gai	121
4.4.8. Kết quả phân tích một số thành phần hóa sinh của sản phẩm TPBVSK trứng Cầu gai	122
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	126
KẾT LUẬN	126
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN TỚI LUẬN ÁN...129	
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	130
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Một số loài Cầu gai phổ biến tại vùng biển của Việt Nam	4
Bảng 1.2. Tác dụng dược lý của một số sắc tố có trong Cầu gai	7
Bảng 1.3. Công thức cấu tạo của glycerophospholipid thường gặp	18
Bảng 1.4. Hoạt tính sinh học của một số lipid chiết tách từ sinh vật biển	21
Bảng 3.1. Bố trí ống nghiệm xây dựng đường chuẩn với Albumin	40
Bảng 3.2. Giá trị OD thu được với các dung dịch chuẩn Albumin	40
Bảng 3.3. Chương trình gradient cho pha động HPLC	43
Bảng 3.4. Các mức của thí nghiệm tối ưu hóa quá trình thủy phân	50
Bảng 3.5. Bố trí 17 thí nghiệm tối ưu hóa	50
Bảng 4.1. Kết quả phân tích thành phần hóa học của thân và trứng Cầu gai	52
Bảng 4.2. Kết quả thành phần và hàm lượng lớp chất lipid của mẫu trứng và thân Cầu gai <i>Tripneustes gratilla</i>	55
Bảng 4.3. Kết quả nhận dạng các lớp chất lipid mẫu trứng và thân Cầu gai <i>Diadema savignyi</i>	57
Bảng 4.4. Thành phần acid béo của thân và trứng Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i>	59
Bảng 4.5. Thành phần và hàm lượng acid béo trong mẫu trứng và thân Cầu gai <i>Diadema savignyi</i>	62
Bảng 4.6. Các dạng phân tử của lớp PI có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i>	67
Bảng 4.7. Các dạng phân tử của lớp PI có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai đen <i>Diadema savignyi</i>	69
Bảng 4.8. Các dạng phân tử của lớp PS có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i>	70
Bảng 4.9. Các dạng phân tử của lớp PS có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai đen <i>Diadema savignyi</i>	71
Bảng 4.10. Các dạng phân tử của lớp PE có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i>	76
Bảng 4.11. Các dạng phân tử của lớp PE có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai đen <i>Diadema savignyi</i>	77

Bảng 4.12. Các dạng phân tử của lớp PA có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i>	80
Bảng 4.13. Các dạng phân tử của lớp PA có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai đen <i>Diadema savignyi</i>	80
Bảng 4.14. Các dạng phân tử của lớp PC có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i>	85
Bảng 4.15. Các dạng phân tử của lớp PC có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai đen <i>Diadema savignyi</i>	88
Bảng 4.16. Các dạng phân tử LPC trong mẫu trứng và thân Cầu gai vàng	92
Bảng 4.17. Các dạng phân tử LPC trong mẫu thân và trứng Cầu gai đen	93
Bảng 4.18. Các dạng phân tử LPE trong mẫu thân và trứng Cầu gai vàng.....	94
Bảng 4.19. Các dạng phân tử LPE trong mẫu thân và trứng Cầu gai đen.....	95
Bảng 4.20. Các dạng phân tử SQDG trong mẫu thân và trứng Cầu gai vàng.....	96
Bảng 4.21. Các dạng phân tử SQDG trong mẫu thân và trứng Cầu gai đen.....	97
Bảng 4.22. Ảnh hưởng của tỉ lệ nước bổ sung đến hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được của dịch thủy phân trứng Cầu gai	99
Bảng 4.23. Kết quả nghiên cứu lựa chọn tỉ lệ enzyme Alcalase bổ sung thích hợp ...	100
Bảng 4.24. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của pH tới quá trình thủy phân	101
Bảng 4.25. Kết quả ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân tới quá trình thủy phân.....	102
Bảng 4.26. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được từ trứng Cầu gai vàng và Cầu gai đen	103
Bảng 4.27. Ma trận thực nghiệm Box-Behnken ba yếu tố và hàm lượng protein hòa tan thu được trong các điều kiện thủy phân khác nhau.....	104
Bảng 4.28. Phân tích phương sai ANOVA của mô hình thủy phân trứng Cầu gai đen.....	105
Bảng 4.29. Phân tích phương sai ANOVA của mô hình thủy phân trứng Cầu gai vàng....	106
Bảng 4.30. Kết quả tổng hợp các mẻ sản xuất thử nghiệm trứng Cầu gai	111
Bảng 4.31. Số lượng chuột chết, biểu hiện bên ngoài của chuột khi uống TPBVSK trứng Cầu gai.....	111
Bảng 4.32. Kết quả theo dõi khối lượng của chuột ở các lô	112
Bảng 4.33. Ảnh hưởng của TPBVSK trứng Cầu gai đến thể trọng thỏ	113
Bảng 4.34. Ảnh hưởng của TPBVSK trứng Cầu gai đến số lượng hồng trong máu thỏ .	114

Bảng 4.35. Ảnh hưởng của TPBVSK trứng cầu gia đến hoạt độ AST, ALT, Creatinin trong máu thỏ	114
Bảng 4.36. Kết quả mô giải phẫu một số cơ quan nội tạng khi uống TPBVSK trứng Cầu gai	115
Bảng 4.37. Sự thay đổi trọng lượng của chuột cho dùng TPBVSK trứng Cầu gai.....	117
Bảng 4.38. Các chỉ tiêu huyết học khi chuột uống TPBVSK trứng Cầu gai	118
Bảng 4.39. Chỉ tiêu hóa sinh khi uống TPBVSK trứng Cầu gai.....	119
Bảng 4.40. Kết quả mô giải phẫu các cơ quan nội tạng chuột thí nghiệm khi uống TPBVSK trứng Cầu gai.....	120
Bảng 4.41. Trọng lượng của một số nội quan (gram/10 gram thể trọng).....	120
Bảng 4.42. Ảnh hưởng của chế phẩm TPBVSK trứng Cầu gai lên hoạt độ ức chế superoxid anion của huyết thanh chuột.....	122
Bảng 4.43. Thành phần protein tổng số và acid amin của TPBVSK trứng Cầu gai ...	122
Bảng 4.44. Thành phần lipid và acid béo của TPBVSK trứng Cầu gai	123
Bảng 4.45. Thành phần hooc mon của TPBVSK trứng Cầu gai.....	123
Bảng 4.46. Thành phần nguyên tố đa vi lượng của TPBVSK trứng Cầu gai	124

DANH MỤC HÌNH VÀ SƠ ĐỒ

Hình 1.1. Hình ảnh thân và trứng Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i>	12
Hình 1.2. Thân và trứng Cầu gai <i>Diadema savignyi</i>	13
Hình 1.3. 06 hợp chất được tìm từ dịch chiết metanol của Cầu gai <i>Diadema savignyi</i> .	14
Hình 1.4. 12 hợp chất steroid được phân lập từ Cầu gai <i>Diadema savignyi</i>	15
Hình 1.5. Cấu tạo phân tử: a) glycerophospholipid, b) sphingophospholipid.....	16
Hình 1.6. Mô hình phân tử glycerophospholipid	17
Hình 1.7. Cấu trúc hóa học tổng quát của lysophospholipid.....	19
Hình 1.8. Công thức cấu tạo của sphingophospholipid.....	19
Hình 1.9. Công thức cấu tạo của CAEP 16:0/18:2.....	20
Hình 1.10. Quá trình thủy phân protein.....	23
Hình 1.11. Phân loại enzyme dựa vào vị trí cắt liên kết peptide.....	25
Hình 2.1. Mẫu Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i>	31
Hình 2.2. Cầu gai đen <i>Diadema savignyi</i>	31
Hình 3.1. Sơ đồ thực nghiệm chung	37
Hình 3.2. Đường chuẩn sự liên hệ giữa nồng độ protein hòa tan và mật độ quang	41
Hình 3.3. Sơ đồ thực nghiệm nghiên cứu quá trình thủy phân trứng Cầu gai	47
Hình 4.1. Hình ảnh TLC hàm lượng từng lớp chất lipid của mẫu trứng Cầu gai <i>Tripneustes gratilla</i> chạy phần mềm Sorbfil	54
Hình 4.2. Hình ảnh TLC hàm lượng từng lớp chất lipid mẫu thân Cầu gai <i>Tripneustes gratilla</i> chạy phần mềm Sorbfil	55
Hình 4.3. Hình ảnh TLC hàm lượng lớp chất lipid mẫu trứng Cầu gai <i>Diadema savignyi</i> chạy phần mềm Sorbfil.....	56
Hình 4.4. Hình ảnh TLC hàm lượng từng lớp chất lipid mẫu thân Cầu gai <i>Diadema savignyi</i> chạy phần mềm Sorbfil.....	57
Hình 4.5. Hình ảnh TLC phân tích các loại PoL của mẫu trứng và thân Cầu gai đen <i>Diadema savignyi</i> và Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i>	63
Hình 4.6. Sắc ký đồ HPLC-HR/MS của PL tổng từ mẫu trứng Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i>	64

Hình 4.7. (A) HPLC–HR/MS phổ khối phân giải cao của tổng các dạng phân tử của lớp PI; (B) HPLC–HR/MS của một dạng phân tử PI với m/z 885,5662; (C) phân mảnh MS ⁻ ; (D) phân ảnh MS ²⁻ của PI 18:0/20:4.....	65
Hình 4.8. (A) Cấu trúc hóa học của dạng phân tử PI 18:0/20:4; (B) và (C) phân mảnh của PI 38:4 với tín hiệu phổ MS ²⁻	66
Hình 4.9. (A) HPLC–HR/MS phổ khối phân giải cao của tổng các dạng phân tử của lớp PS; (B) HPLC–HR/MS của một dạng phân tử PS với m/z 842,5962; (C) phân mảnh MS ²⁻ của PS 20:1/20:1.....	72
Hình 4.10. Phân mảnh của PS 40:2 (PS 20:1/20:1) với ion phổ khối MS ²⁻	72
Hình 4.11. Cấu tạo chung dạng phân tử PE	74
Hình 4.12. Các event xuất hiện trên phần mềm khi giải phổ PE.....	75
Hình 4.13. (A) HPLC–HR/MS phổ khối phân giải cao của tổng các dạng phân tử của lớp PE; (B) HPLC–HR/MS của một dạng phân tử PE với m/z 750,5424; (C) phân mảnh MS ²⁻ của PE 18:1e/20:4; (D) Phân mảnh MS ²⁻ của PE 38:5e (PE 18:1e/20:4)	78
Hình 4.14. (A) HPLC–HR/MS phổ khối phân giải cao của tổng các dạng phân tử của lớp PA; (B) HPLC–HR/MS của một dạng phân tử PA với m/z 750,5424; (C) phân mảnh MS ²⁻ của PA 20:1/20:1; (D) Phân mảnh MS ²⁻ của PA 40:2 (PA 20:1/20:1).....	81
Hình 4.15. (A) HPLC–HR/MS phổ khối phân giải cao của tổng các dạng phân tử của lớp PC; (B) HPLC–HR/MS của một dạng phân tử PC với m/z 782,5703; (C) phân mảnh MS ²⁻ của PC 16:0/20:4; (D) Phân mảnh MS ²⁻ của PC 36:4 (PC 16:0/20:4).....	91
Hình 4.16. Bề mặt đáp ứng hàm lượng protein hoà tan tổng số.....	107
Hình 4.17. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu hàm lượng protein hoà tan tổng số	107
Hình 4.18. Bề mặt đáp ứng hàm lượng protein hoà tan tổng số.....	108
Hình 4.19. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu hàm lượng protein hoà tan tổng số thủy phân từ trứng Cầu gai vàng	108
Hình 4.20. Sơ đồ quy trình công nghệ thủy phân trứng Cầu gai.....	109
Hình 4.21. TPBVSK Trứng Cầu gai	124

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

STT	Kí hiệu	Tên tiếng Anh	Tên tiếng Việt
1	AA	Arachidonic Acid	Acid arachidonic
2	AST	Aspartate Aminotransferase	Enzyme chuyển hóa acid amin aspartic
3	ALT	Alanine Aminotransferase	Enzyme chuyển hóa acid amin alanin
4	CAEP	Ceramide Amino Ethyl Phosphonate	Amin etyl photphat ceramic
5	CK		Chất khô
6	DAG	Diacylglycerol	Diacylglycerol
7	ĐC		Đối chứng
8	DHA	Docosahexaenoic Acid	Acid Docosahexaenoic
9	DPA	Docosapentaenoic acid	Acid Docosapentaenoic
10	DPG	Diphosphatidylglycerol	Photpho lipid glycerol
11	DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	Gốc tự do
12	EPA	Eicosapentaenoic acid	Acid Eicosapentaenoic
13	FFA	Free Fatty Acid	Acid béo tự do
14	GC	Gas Chromatography	Sắc ký khí
15	GCMS	Gas Chromatography/Mass Spectroscopy	Sắc ký khí khối phổ
16	GL	Glycolipid	Glyco Lipid
17	HC	Hydrocacbon	Hydrocacbon
18	HPLC	High-performance Liquid Chromatography	Sắc kí lỏng hiệu năng cao
19	HL-60	Human Leukemia 60	Dòng tế bào ung thư huyết tương
	IT	Ion Trap	Bẫy ion
20	LCMS	Liquid chromatography–mass spectrometry	Sắc ký lỏng khối phổ
21	LPC	Lyso phosphatidylcholine	Lyso phosphatidylcholine
22	LPE	Lyso phosphatidylethanol amine	Lyso phosphatidylethanol amin
23	LPI	Lyso phosphatidylinositol	Lyso phosphatidylinositol
24	LPS	Lyso phosphatidylserine	Lyso phosphatidylserine

STT	Kí hiệu	Tên tiếng Anh	Tên tiếng Việt
25	PA	Phosphatidic acid	Phosphatidic acid
26	PC	Phosphatidylcholine	Phosphatidylcholine
29	PC-3		Dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt
27	PE	Phosphatidylethanolamine	Phosphatidylethanolamine
28	PG	Phosphatidylglycerol	Phosphatidylglycerol
29	PI	Phosphatidylinositol	Phosphatidylinositol
30	PL	Phospholipid	Photpho lipid
31	PoL	Polar Lipid	Lipid phân cực
32	PUFA	Polyunsaturated fatty acids	Acid béo không no đa nối đôi
33	PHNQ	PolyHydroxy NaphthoQuinones	
34	ROS	Reactive Oxygen Species	Các gốc tự do
35	SNU-C5	Seoul National University C5	Dòng tế bào ung thư dạ dày
36	SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerol	Sulfoquinovosyldiacylglycerol
37	SFA	Saturated Fatty Acids	Acid béo bão hòa
38	SM	Sphingomyelin	Sphingomyelin
39	SOD	Superoxid dismutase	
40	ST	Sterol	Sterol
41	TPBVSK		Thực phẩm bảo vệ sức khỏe
42	TAG	Triacylglycerol	Lipid trung tính
43	TL	Total Lipid	Lipid tổng
44	TN		Thí nghiệm
45	TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng
46	TOF	Time of Flight	Khối phổ kế thời gian bay
47	VSV		Vi sinh vật
48	WE	Wax	Sáp

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Hệ sinh thái biển là một kho dược liệu quý báu, các sản phẩm có nguồn gốc từ hải sản gần đây đã trở thành trọng tâm nghiên cứu của nhiều nhà khoa học do giá trị dinh dưỡng cao, tác dụng dược lý quý giá và độc tính thấp của nó. Ngày càng có nhiều các hoạt tính sinh học quý được tìm ra từ sinh vật biển như phòng ngừa ung thư, kháng viêm, chống oxy hóa....Cầu gai là một trong những đối tượng đang được quan tâm nghiên cứu trong nhiều năm gần đây.

Cầu gai là một nhóm lớn thuộc động vật biển không xương sống trong ngành Echinodermata (động vật da gai). Cầu gai có giá trị dược liệu và thực phẩm lâu đời ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới. 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. Bên cạnh đó, trứng Cầu gai có giá trị dinh dưỡng cao, giàu vitamin, khoáng chất, protein, acid béo, phospholipid, polysaccharide và có chất chống ung thư, chống đông máu, chống huyết khối, kháng khuẩn và đặc tính chống oxy hóa. 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. Trứng của Cầu gai còn được coi là một loại thực phẩm rất giàu dinh dưỡng, có giá trị cao tại các nước châu Á và Địa Trung Hải, cũng như ở phương Tây.

Mặc dù có giá trị dược liệu và dinh dưỡng cao như vậy, nhưng hiện nay công nghệ sản xuất, chế biến các sản phẩm từ Cầu gai chủ yếu ở dạng đơn giản, phổ thông, mà chưa có nhiều nghiên cứu tập trung vào các chế phẩm hay sản phẩm hoàn thiện. Chính vì vậy 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 công nghệ cao hay dược phẩm nhằm nâng cao giá trị cho Cầu gai.

Vì thế, nghiên cứu sản xuất protein có khối lượng phân tử thấp từ trứng Cầu gai nhờ quá trình thủy phân bằng hệ enzyme protease là một hướng nghiên cứu mới và có nhiều triển vọng, vì khi tiến hành thủy phân protein bằng enzyme sẽ cho hiệu quả cao, điều kiện phản ứng nhẹ nhàng, an toàn đối với người lao động và sản phẩm có chất lượng tốt. Bột protein thủy phân từ trứng Cầu gai thu được có nhiều khả năng ứng dụng trong y tế hay bổ sung vào thực phẩm khác làm tăng giá trị dinh dưỡng và tạo ra được nhiều sản phẩm thực phẩm chức năng dễ hấp thụ cho trẻ em và người cao tuổi.

Trứng Cầu gai còn được biết đến là rất giàu các phospholipid (PL) và acid béo quý. Ngoài vai trò quan trọng trong màng tế bào, PL có tầm quan trọng đối với hoạt

động của cơ thể như: Phosphatidylcholine (PC) có chức năng tiêu hóa và trao đổi chất trong mật để hòa tan cholesterol và các thành phần chất béo trong thực phẩm và thuốc, vận chuyển chất béo giữa ruột và gan, là nguồn cung cấp acetylcholine và acid béo. Phosphatidylserine (PS) là một thành phần của phức hợp lipid - calcium - phosphate để động cặn trong quá trình hình thành xương, điều hòa quá trình chết tế bào và đông máu... Như vậy, việc xác định thành phần các dạng phân tử PL cũng như hàm lượng của chúng có trong thân và trứng Cầu gai là hướng nghiên cứu hoàn toàn mới và quan trọng. Do đó, chúng tôi lựa chọn đề tài: **“Nghiên cứu hoá học lipid của loài Cầu gai vàng (*Tripneustes gratilla*) và Cầu gai đen (*Diadema savignyi*) ở vùng biển Nha Trang, Khánh Hoà và định hướng ứng dụng trong công nghệ thực phẩm”**.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- 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 Hoà.

- Nghiên cứu sâu hóa học lipid của trứng và thân Cầu gai vàng (*Tripneustes gratilla*) và Cầu gai đen (*Diadema savignyi*) bao gồm: thành phần các lớp chất lipid; thành phần acid béo; các lớp chất phospholipid; các dạng phân tử phospholipid.

- Tạo được sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe có thành phần chính là protein khối lượng phân tử thấp bằng công nghệ thủy phân enzyme, đây là sản phẩm thực phẩm đầu tiên từ Cầu gai tại Việt Nam.

3. Nội dung nghiên cứu

- Xác định các thành phần hóa học cơ bản trong 4 mẫu nghiên cứu từ thân và trứng của Cầu gai vàng (*Tripneustes gratilla*) và Cầu gai đen (*Diadema savignyi*);

- Xác định 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 công nghệ thủy phân trứng Cầu gai vàng (*Tripneustes gratilla*) và Cầu gai đen (*Diadema savignyi*) bằng enzyme Alcalase và tối ưu hóa các thông số công nghệ có ảnh hưởng lớn tới quá trình thủy phân; đánh giá chất lượng sản phẩm, sản xuất thử nghiệm và công bố chất lượng sản phẩm protein thủy phân từ trứng Cầu gai vàng.

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

4.1. Ý nghĩa khoa học

- Đề tài đã cung cấp các thông số về hàm lượng lipid, thành phần các lớp chất lipid, thành phần và hàm lượng các acid béo, các dạng phân tử PL có trong trứng và thân của hai loài Cầu gai (*Tripneustes gratilla*) và Cầu gai đen (*Diadema savignyi*);
- Đề tài đã xây dựng được quy trình công nghệ tối ưu hóa thông số để tạo ra bột trứng Cầu gai (*Tripneustes gratilla*) và Cầu gai đen (*Diadema savignyi*) thủy phân;
- Độ tinh cấp và độ tinh bán trường diễn của sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe trứng Cầu gai thủy phân đã được nghiên cứu.

4.2. Ý nghĩa thực tiễn

Đề tài sản xuất thành công sản phẩm “Thực phẩm bảo vệ sức khỏe trứng Cầu gai”, góp phần tạo ra sản phẩm ứng dụng đầu tiên trong thực tiễn từ Cầu gai vàng (*Tripneustes gratilla*) và giúp nâng cao giá trị kinh tế cho Cầu gai.

5. Những đóng góp 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.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về nguyên liệu nghiên cứu

1.1.1. Tổng quan chung về Cầu gai



1.1.1.1. Phân bố của Cầu gai ở Việt Nam



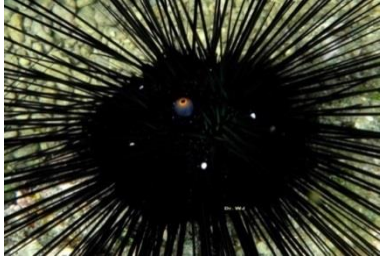
Cầu gai còn được gọi là nhím biển, có tên khoa học Echinoidea, là tên gọi chung của một lớp thuộc ngành động vật da gai (Echinodermata), sinh sống ở các đại dương.

Ở vùng biển Việt Nam, thường gặp Cầu gai ở bờ đáy đá, các vùng san hô. Các loài thường gặp: *Diadema setosum*, *Tripneustes gratilla*, *Peronella orbicularis*, *Clypeaster reticulatus*. Một số loài có giá trị kinh tế cao như: *Strongylocentrotus* (Cầu gai xanh), *Strongylocentrotus nudus* (Cầu gai đỏ), *Tripneustes gratilla* (Cầu gai sọ dừa - Cầu gai vàng), *Diadema setosum* (Cầu gai đen), *Heterocentrotus mammillatus* (Cầu gai bút chì hay nhum đá). Tại 7 vị trí san hô xung quanh đảo Ba Bình (còn có tên là đảo Itu - Aba, thuộc quần đảo Trường Sa) đã phát hiện 6 loài Cầu gai thuộc các họ: Diadematidae, Stomopneustidae, Toxopneustidae và Echinometridae.

Một số khảo sát tại vịnh Vân Phong - Bến Gỏi và vịnh Thái Lan phát hiện được loài *Heterocentrotus mammillatus* (Cầu gai bút chì) là loài có giá trị kinh tế cao. Ở vùng biển của Phú Yên, Khánh Hòa (đặc biệt là ở huyện đảo Trường Sa), Ninh Thuận, Bình Thuận và Côn Đảo đều có loài *Tripneustes gratilla* (Cầu gai sọ dừa) là loài thường được sử dụng làm thực phẩm.

Bảng 1.1. Một số loài Cầu gai phổ biến tại vùng biển của Việt Nam

Loài Cầu gai và địa điểm thu hoạch	Hình ảnh
Cầu gai vàng <i>Tripneustes gratilla</i> phân bố ở Phú Yên, Khánh Hòa, Côn Đảo, Đà Nẵng	
Cầu gai <i>Echinothrix calamaris</i> tại Thái Bình Dương	

<p>Cầu gai bút chì <i>Heterocentrotus mammillatus</i> phân bố ở vùng biển của Phú Yên, Khánh Hòa, Trường Sa</p>	
<p>Cầu gai đen <i>Diadema savignyi</i> phân bố ở vùng biển Nha Trang, Khánh Hòa</p>	
<p>Cầu gai đen <i>Diadema setosum</i> phân bố ở vùng ven biển miền Trung, vịnh Bắc Bộ, Trường Sa, Côn Đảo, Phú Quốc</p>	

1.1.1.2. Thành phần hóa học của Cầu gai

Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam

Số lượng các nghiên cứu thành phần hóa học từ vỏ, dịch khoang thân hay trứng của các loài Cầu gai ở Việt Nam còn rất ít.

Năm 2004, nhóm tác giả Châu Văn Minh và cộng sự đã phân lập được 4 hợp chất bao gồm 5,8-epidioxycholest-6-en-3-ol, cholesterol, glycerol 1-palmitate và glycerol 1,3-dioleate-2-stearate từ cặn chiết methanol của Cầu gai *Diadema setosum* [1].

Kết quả nghiên cứu của tác giả Nguyễn Xuân Duy năm 2011 về thành phần hóa học của trứng loài Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* cho thấy phần trứng chiếm 10,2% tổng khối lượng tươi, phần vỏ chiếm 23,3% còn 65,5% là nội tạng và các tạp chất khác. Trong trứng Cầu gai, hàm lượng nước chiếm 78,7%; tro chiếm 1,5%; protein chiếm 13,6%; chất béo tổng số là 3,2% và 1,8% glucide. Thành phần chất béo trong trứng Cầu gai rất đa dạng và có chứa phong phú các acid béo cần thiết bao gồm alpha linolenic (AIA), eicosapentaenoic (EPA) và docosahexaenoic (DHA) với hàm lượng 1,536g/100g chiếm 8,7% tổng số acid béo được phát hiện. Ngoài ra trong

trứng Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* còn chứa nhiều acid amin thiếu yếu như valine, leucine, isoleucine, threonine, methionine, phenylalanine, lysine và histidine với hàm lượng là 5,485g/100g khối lượng tươi, chiếm 44,11% tổng acid amin được phát hiện. Trứng Cầu gai là nguồn cung cấp dồi dào các chất khoáng đa lượng và vi lượng, trong đó hàm lượng của Na, K, P, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu và Se trong 100g khối lượng tươi của trứng Cầu gai lần lượt là 7,339; 1,171; 111; 105,3; 121,6; 37,31; 7,89; 4,71; 3,11 và 0,02 mg [2].

Năm 2015, tác giả Nguyễn Phương Thảo, đã phân lập được 12 steroid từ loài Cầu gai đen *Diadema savignyi* [3].

Tác giả Võ Mai Như Hiếu đã chiết tách quinonoid từ 4 loài Cầu gai *Diadema savignyi*, *Diadema setosum*, *Stomopneustes variolaris* và *Tripneustes gratilla* thu thập tại Khánh Hòa tương ứng thành phần như sau: Spinochrome E (14%; 6%; 26%; 72%), Echinochrome A (59%; 87%; 73%) tương ứng với 3 loài *Diadema savignyi*, *Diadema setosum*, *Stomopneustes variolaris*, Spinochrome D (8%) ở loài *Diadema savignyi*; Spinochrome A (26%) ở loài *Tripneustes gratilla*, những hoạt chất này đều được sử dụng làm nguyên liệu chế tạo chế phẩm mỹ phẩm [4].

Tình hình nghiên cứu ở thế giới

Trứng Cầu gai là nguồn giàu chất béo, carbohydrate, protein, vitamin A, vitamin B1 (thiamine), vitamin B2 (riboflavin), vitamin B3 (niacin), canxi, magie, sắt, kẽm, selen, germani, stronti, đồng, mangan, molybden và các nguyên tố vi lượng khác có lợi cho sức khỏe con người [5] [6]. Trứng Cầu gai chứa nhiều acid béo không bão hòa đa nối đôi (PUFA) có giá trị cao là acid béo omega 3 chuỗi dài, đặc biệt là acid eicosapentaenoic (EPA, C20:5 (n-3)) và acid docosahexaenoic (DHA 22:6 (n-3)).

Thành phần dinh dưỡng có trong trứng Cầu gai thay đổi một cách đáng kể theo mùa thu hoạch. Hàm lượng protein của trứng Cầu gai nằm trong khoảng từ 12% đến 18% và sự thay đổi về hàm lượng lipid dao động từ 3,1% đến 8,0%, theo báo cáo của Verachia và cộng sự [7], hàm lượng protein và lipid cao hơn khi Cầu gai được thu hoạch vào mùa đông và mùa xuân.

Theo Anderson và cộng sự, vỏ Cầu gai chứa phần lớn là khoáng chất (>90%), tiếp đó là protein, polysaccharit và các thành phần khác, trong khi trứng Cầu gai bao gồm polysaccharit, acid béo, protein, vitamin...[8]. Vỏ Cầu gai có chứa nhiều polyhydroxyl, sắc tố naphthoquinone, spinochrom [9] cũng như hợp chất tương tự echinochrom A. Trứng Cầu gai cũng rất giàu β -carotene xanthophyll [10]. Một lượng tương đối lớn sắc tố naphthoquinone được tìm thấy ở Cầu gai đỏ (*Strongylocentrotus franciscanus*, 121mg/100g) và Cầu gai xanh (*Strongylocentrotus droebachiensis*, 163

mg/100g) [11]. Trong năm 1990, các nhà nghiên cứu Nhật Bản đã nghiên cứu các sắc tố của Cầu gai và chỉ ra rằng các sắc tố chủ yếu là carotene như α -carotene, carotene-4-ketone, phytoanthin và monoether của nó và 1,4-naphthoquinone. Kể từ khi phân lập sắc tố quinone đầu tiên spinochrome A từ *Paracentrotus lividus* [12], khoảng 30 sắc tố quinoid đã được báo cáo. Một số sắc tố cụ thể được tóm tắt trong bảng 1.2.

Bảng 1.2. Tác dụng dược lý của một số sắc tố có trong Cầu gai

Loài Cầu gai	Sắc tố	Tác dụng dược lý	Tài liệu tham khảo
<i>Paracentrotus lividus</i>	Spinochrome A	Chống oxy hóa	[12]
<i>Anthocidaris crassispina</i>	Naphthoquinone pigments	Chống phóng xạ	[13]
<i>Strongylocentrotus intermedius</i>	Echinochrome	Hoạt động bảo vệ hệ tim mạch	[14]
<i>Scaphechinus mirabilis</i>	Echinochromes A và B	Chống oxy hóa	[15]
<i>Anthocidaris crassispina</i> , <i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> , <i>Pseudocentrotus depressu</i>	Spinochromes	Chống quá trình oxy hóa peroxyt	[16]

Theo nghiên cứu của Amarowicz và cộng sự, từ loài Cầu gai *Strongylocentrotus franciscanus* đã phân lập được ba hợp chất spinochrome B, echinochrome A và spinochrome E [17]. So sánh thành phần vỏ của Cầu gai ở các vùng biển khác nhau, Ryszard Amarowicz và Hideo Hatate đã phát hiện ra rằng vỏ Cầu gai đỏ (*Strongylocentrotus franciscanus*) và xanh (*Strongylocentrotus droebachiensis*) lần lượt chứa 4,06% và 4,99% protein [18]. Phân tích thành phần acid amin của Cầu gai Nhật Bản cho thấy, trứng Cầu gai chứa taurine, acid aspartic, threonine, serine, acid glutamic, proline, glycine, alanine và các loại khác, trong đó glycine có hàm lượng nhiều nhất [19].

Nghiên cứu của Liu và cộng sự đã phân lập được hợp chất 5 α ,8 α -epidioxycholest-6-en-3 β -ol từ loài Cầu gai *Tripneustes gratilla* [20]. Năm 2013, Chinprahast đã xác định được thành phần chính của vỏ loài Cầu gai *Diadema setosum* là: taurine, arginine, lysine, glycine, tyrosine, valine, leucine, isoleucine, alanine, acid glutamic và inosine 5'-monophosphate; vỏ loài Cầu gai *Salmacis sphaeroides* là arginine, lysine, glycine, alanine, ATP và adenosine 5'-diphosphate và

vỏ loài Cầu gai *Toxopneustes pileolus* là glycine, alanine, adenosine 5'-monophosphate, ATP và serine [21].

Các acid amin có nhiều nhất trong trứng Cầu gai *Stomopneustes variolaris* là tyrosine tiếp theo là acid glutamic, acid aspartic và arginine, trong khi ở *Holothuria forskali* là glycine, alanine và serine. Đối với *Paracentrotus lividus* acid aspartic, glycine, lysine và arginine có hàm lượng cao nhất. Polysaccarit là các đại phân tử hoạt động chính trong Cầu gai.

Trứng Cầu gai trưởng thành có nhiều loại estrogen, hoạt động mạnh nhất trong số đó là 17β -estradiol. Trứng của *Strongylocentotus intermedius* cũng chứa sphingosine, acid béo, glucozo và acid sialic. Manukin và cộng sự sử dụng huỳnh quang phân tích để phát hiện ra β -indole ethylamine, tồn tại trong phôi và buồng trứng của Cầu gai. Họ cũng phát hiện ra acetylcholine, GABA và catecholamine tồn tại trong các mô thần kinh hướng tâm của Cầu gai.

Cầu gai chứa một lượng đáng kể vitamin A, E. Salma và cộng sự (2016) báo cáo hàm lượng vitamin E và A (tương ứng là 23,5 và 1,8mg/100g) trong trứng *Diadema setosum* cao hơn so với cá thu, cá hồi, cá mòi, cá lóc và trứng [22]. Một hàm lượng lớn hơn của vitamin E (4,4 - 29,3 mg/100g) trong trứng Cầu gai tươi đã được báo cáo bởi Kalogeropoulos và cộng sự (2012) [23] và hàm lượng vitamin E được tìm thấy thấp hơn nhiều (0,6 - 4,0 mg/100 g) trong trứng Cầu gai đóng hộp.

1.1.1.3. Tình hình nghiên cứu hoạt tính sinh học của Cầu gai

* **Tình hình nghiên cứu hoạt tính sinh học của Cầu gai ở Việt Nam**

Theo nghiên cứu năm 2014 của Nguyễn Phương Thảo cặn chiết CH_2Cl_2 của loài Cầu gai đen *Diadema savignyi* thể hiện khả năng ức chế sự phát triển 3 dòng tế bào ung thư HL-60, PC-3 và SNU-C5 với giá trị IC_{50} lần lượt là 1,3; 2,8 và 3,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mười hai hợp chất steroid được phân lập từ cặn chiết CH_2Cl_2 của Cầu gai đen *Diadema savignyi* cũng được đánh giá hoạt tính ức chế sự phát triển 3 dòng tế bào ung thư HL-60, PC-3 và SNU-C5, trong đó có 2 hợp chất 5,8-epidioxycholest-6-en-3-ol và cholest-6-ene-5a,8a-epidioxy-3b-ol thể hiện khả năng ức chế mạnh hơn so với đối chứng dương mitoxantrone (IC_{50} của chất đối chứng dương với 3 dòng tế bào ung thư lần lượt là 6,80; 5,17 và 19,00 μM còn giá trị IC_{50} của hai hợp chất lần lượt là 4,9; 6,9 và 6,1 μM ; và 5,2; 5,4 và 6,8 μM tương ứng). Các hợp chất còn lại thể hiện khả năng ức chế yếu hơn. Cặn chiết CH_2Cl_2 và hai hợp chất 5,8-epidioxycholest-6-en-3-ol và cholest-6-ene-5a,8a-epidioxy-3b-ol cũng được tìm thấy gây ra quá trình chết theo chương trình của tế bào [3].

Nghiên cứu của Châu Văn Minh và cộng sự năm 2012 đã phân lập được hợp chất 5,8-epidioxycholest-6-en-3 β -ol từ loài Cầu gai *Diadema setosum* thể hiện hoạt

tính mạnh trên cả ba dòng tế bào ung thư người được thử nghiệm là ung thư biểu mô KB ($IC_{50} = 2,0 \mu\text{g/ml}$), ung thư gan Hep-G2 ($IC_{50} = 2,4 \mu\text{g/ml}$) và ung thư màng tử cung FL ($IC_{50} = 3,93 \mu\text{g/ml}$) [24].

Tác giả Võ Mai Như Hiếu đã đánh giá hoạt tính sinh học có lợi của hợp chất quinonoid từ 4 loài Cầu gai *Diadema savignyi*, *Diadema setosum*, *Stomopneustes variolaris* và *Tripneustes gratilla* thu thập tại Khánh Hòa, kết quả cho thấy chúng đều thể hiện hoạt tính chống oxy hóa và ức chế tyrosinae [4].

*** Tình hình nghiên cứu hoạt tính sinh học của Cầu gai trên thế giới**

Các acid béo không bão hòa đa nối đôi (PUFA), đặc biệt là acid eicosapentaenoic (EPA, C20:5 (n-3) và acid docosahexaenoic (DHA, C22:6 (n-3) trong Cầu gai có tác dụng có lợi đối với bệnh tăng huyết áp, viêm nhiễm, rối loạn nhịp tim, ung thư và chống oxy hóa. Hoạt chất sinh học có trong trứng Cầu gai giúp cải thiện sức khỏe thông qua việc tìm kiếm và cản trở các loại phản ứng oxy hóa khử. Hợp chất astaxanthin được phân lập từ trứng Cầu gai *Arbacia lixula* là một chất chống oxy hóa mạnh [25], ngoài ra nhiều chất chống oxy hóa khác bao gồm carotenoid và naphthoquinone polyhydroxyl hóa (PHNQ's) cũng được tìm thấy trong trứng Cầu gai [26].

Năm 1997, theo nghiên cứu của Sahara, hợp chất glycolipid 3'-sulphonoquinovosyl-1'-monoacylglyceride được tìm thấy trong Cầu gai *Strongylocentrotus intermedius*, thể hiện khả năng ức chế sự phát triển 2 dòng tế bào ung thư W14 và A549 với giá trị IC_{50} lần lượt là $33,0 \mu\text{g/mL}$ và $35,0 \mu\text{g/mL}$. Bên cạnh đó, nó cũng được chứng minh là có tác động đến sự phát triển các khối u của chuột mang khối u. Kết quả cho thấy, hợp chất này đã kìm hãm sự phát triển các khối u ở chuột [27]. Tiếp đó, năm 2003, Zhang và cộng sự đã tìm ra polysaccarit được chiết xuất từ Cầu gai ức chế sự phát triển dòng tế bào ung thư dạ dày (SGC-7901) và ung thư gan (Bel-7402) [28]. Theo công bố của Liu và cộng sự, loài Cầu gai *Strongylocentrotus nudus* có khả năng chống lại các tế bào khối u ở chuột. Các hợp chất polysaccarit trong Cầu gai có khả năng diệt các tế bào khối u [29].

Sulfolipid là một hợp chất chống ung thư tốt và có rất nhiều trong Cầu gai. Sulfoquinovosyl monoacylglycerol phân lập từ ruột Cầu gai ức chế hiệu quả sự phát triển của khối u rắn [27]. Trứng Cầu gai rất giàu PL khác nhau như cardiolipin, PI, PS, PC hoạt động như những chất chống ung thư tốt [30]. Hơn nữa, chiết xuất diclometan và steroid thu được từ Cầu gai đen *Diadema savignyi* có hoạt tính gây độc tế bào trong ống nghiệm đối với dòng tế bào bạch cầu promyelocytic (HL-60), ung thư tuyến tiền liệt (PC-3) và ung thư đại trực tràng (SNU-C5) ở người có tế bào ung thư [3]. Sulfolipid và sulphoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) cho thấy sự ức chế

hiệu quả chống lại sự phát triển của khối u [31]. Steroid phân lập từ *Diadema savignyi* điều chỉnh protein kinase của con đường kích hoạt protein kinase (MAPK) của Mitogen trong bệnh bạch cầu promyelocytic (HL-60), ung thư tuyến tiền liệt (PC-3) và ung thư đại trực tràng (SNU-C5) [3].

Trứng của Cầu gai rất giàu chất chống oxy hóa như polyhydroxylated naphthoquinone và echinochrom A [32]. Hơn nữa, hoạt động gom gốc DPPH của dịch thủy phân trứng Cầu gai màu tím được đánh giá cao [149]. Các phân đoạn peptide từ trứng của Cầu gai *Strongylocentrotus nudus* thể hiện tốt hoạt động chống oxy hóa trong cả DPPH và giảm năng lượng phản ứng [33]. Năm 2002, theo nghiên cứu của Hatate và cộng sự, phân đoạn giàu spinochrome từ vỏ và trứng loài Cầu gai *Anthocidaris crassispinata*, *Hemicentrotus pulcherrimus* và *Pseudocentrotus depressus* thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh [14]. Năm 2011, Qin và cộng sự đã chỉ ra phân đoạn peptide của loài Cầu gai *Strongylocentrotus nudus* có khả năng thu gọn gốc tự do DPPH và giảm hoạt tính khi giảm liều lượng [34]. Theo nghiên cứu của các nhà khoa học Mỹ, phân đoạn giàu phenol từ vỏ của loài Cầu gai *Psammechinus miliaris* có khả năng chống oxy hóa [35].

Năm 2017, Archana và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu khả năng chống oxy hóa cận chiết methanol từ trứng của loài Cầu gai *Stomopneustes variolaris* sử dụng thử nghiệm thu dọn gốc tự do DPPH. Kết quả cho thấy, hoạt động thu dọn gốc tự do DPPH của cận chiết tăng dần phụ thuộc vào liều lượng. Ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$, cận chiết methanol tạo ra sự ức chế là 89,5%, với giá trị IC_{50} là 57,8 $\mu\text{g/mL}$ [36].

Abubakar và cộng sự (2012) đã báo cáo các hoạt động kháng khuẩn của cận chiết methanol và chloroform từ ruột, trứng, gai và khoang miệng của Cầu gai *Tripneustes gratilla* [37]. Nghiên cứu này cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của Cầu gai *Tripneustes gratilla* tập trung chủ yếu ở chiết xuất ruột và trứng, ít hoặc không hoạt động kháng khuẩn nào được quan sát thấy trong chiết xuất từ gai và khoang miệng của loài cầu gai này. Bên cạnh đó, hoạt tính kháng khuẩn được quan sát thấy ở cả cận chiết methanol và chloroform tuy nhiên cận chiết methanol thể hiện hoạt tính kháng khuẩn cao hơn. Abubakar và cộng sự (2012) cũng nghiên cứu khả năng kháng nấm của dịch chiết methanol từ ruột và trứng của Cầu gai *Tripneustes gratilla*, kết quả cho thấy dịch chiết có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Penicillium* Spp. Tương tự, hai peptide kháng khuẩn mới là Strongylocin 1 và Strongylocins 2 đã được chiết xuất thành công từ tế bào trứng của loài Cầu gai xanh *Strongylocentrotus droebachiensis* cho thấy hoạt động kháng khuẩn tiềm năng chống lại cả vi khuẩn gram dương và vi khuẩn gram âm [38]. Ruột của *Strongylocentrotus nudus* được sử dụng để điều chế thuốc chống ung thư trong khi trứng của nó được sử dụng như thuốc chống bệnh

bạch cầu và chống mệt mỏi [28]. Vỏ của các loài Cầu gai như *Anthocidaris crassispina*, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Tripneustes gratilla*, *Strongylocentrotus nudus*, *Heterocentrotus mamillatus* [39], *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Glyptocidariscres nularis* và *Anthocidaris crassispina* [40] đã được nghiên cứu và kết quả cho thấy chúng là nguồn chứa tác nhân chống viêm tốt. Gai Cầu gai *Temnopleuru spleusus*, *Tripneustes gratilla* và *Toxopneuste spileolus* được dùng để bào chế thuốc chống ngộ độc [39].

Ngoài ra, một nghiên cứu được thực hiện trên Cầu gai *Tripneustes depressus*, cho thấy các phân đoạn bền nhiệt ở 56°C và 72°C của các peptide có mặt trong chất lỏng coelomic có hoạt tính kháng virus Suid herpesvirus loại 1 (SHV-1) và virus bệnh dại (RV), với tỉ lệ ức chế 74% và 99% tương ứng [41].

Chiết xuất ethanol từ hỗn hợp mô mềm của *Tripneustes ventricosus* (Lamarck, 1816) cho thấy tác dụng kháng nấm đối với *Candida albicans* ATCC 10231 với liều sử dụng $8,6 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$, tương tự như thuốc Fluconazole ($\text{IC}_{50} 8,0 \pm 0 \mu\text{g/mL}$) [41].

Chiết xuất methanol, dichloromethane và nước thu được từ *Diadema antillarum* được đánh giá chống lại các chủng nấm thực vật *Sclerotium* sp., *Rhizoctonia* sp. và *Fusarium* sp.; trong đó chiết xuất dichloromethane có hiệu quả chống lại *Fusarium* sp [42].

Các báo cáo chỉ ra rằng 4-hydroxyl-1-(16-metoxiprop-16-en-15-yl)-8-metyl-21, 22-dioxatricyclo [11.3.1.15,8] octadecane-3,19-dione, một diterpenoid được phân lập từ trứng của Cầu gai *Stomopneustes variolaris*, ức chế COX-2 ($\text{IC}_{50} = 2,37 \text{ mM}$) và enzyme 5-lipoxygenase (LOP-5) ($\text{IC}_{50} = 2,01 \text{ mM}$), cho thấy tiềm năng kháng viêm của dịch chiết từ loài Cầu gai này.

Các báo cáo trước đây đã chứng minh liên kết 32-sulfate α galactan thu được từ Cầu gai *Echinometra lucunter*, và cả α fucan 2-sulfate được phân lập từ Cầu gai *Strongylocentrotus franciscanus* đóng vai trò ức chế thrombin [43]. Fucan sunfat từ Cầu gai về cơ bản chứa các đơn vị fucose 2,4-disulfated đã tăng cường vai trò của fucose 2,4-disulfated trong quá trình đông máu và huyết khối [44].

1.1.2. Tổng quan về Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

Loài Cầu gai *Tripneustes gratilla* có vùng phân bố quanh vùng nhiệt đới kéo dài tới vùng cận nhiệt đới, sống phổ biến nhất ở vùng nước nông trên nhiều loại đá cứng và được tìm thấy ở độ sâu từ 2 đến 30 mét. Chúng kiếm ăn gần sát nền đá và chế độ ăn uống của chúng bao gồm tảo, sinh vật biển có rễ bám và cỏ biển. Cầu gai *Tripneustes gratilla* tăng trưởng nhanh và tuổi thọ thấp. Kích thước tối đa là 160 mm, tương ứng với độ tuổi từ bốn đến năm tuổi, chúng có thể đạt 75 mm trong năm đầu

tiên. *Tripneustes gratilla* có chu kỳ sinh sản hàng năm vào giữa và cuối mùa đông, khi nhiệt độ và độ dài ngày là thấp nhất.



Hình 1.1. Hình ảnh thân và trứng Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

Ở Việt Nam, các công trình nghiên cứu về thành phần hóa học của Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* còn rất hạn chế. Bên cạnh công trình nghiên cứu của tác giả Nguyễn Xuân Duy về thành phần dinh dưỡng có trong trứng Cầu gai vàng [2], tác giả Võ Mai Như Hiếu cũng đã nghiên cứu tách chiết sắc tố polyhydroxynaphthoquinone (PHNQ) và đánh giá hoạt tính sinh học của nó [45]. Sắc tố PHNQ từ Cầu gai vàng thể hiện khả năng thu dọn gốc tự do với DPPH hiệu quả với giá trị EC_{50} là 58,47 $\mu\text{g/mL}$, ức chế y 68.5% hoạt động của tyrosinase và hoạt động kháng khuẩn.

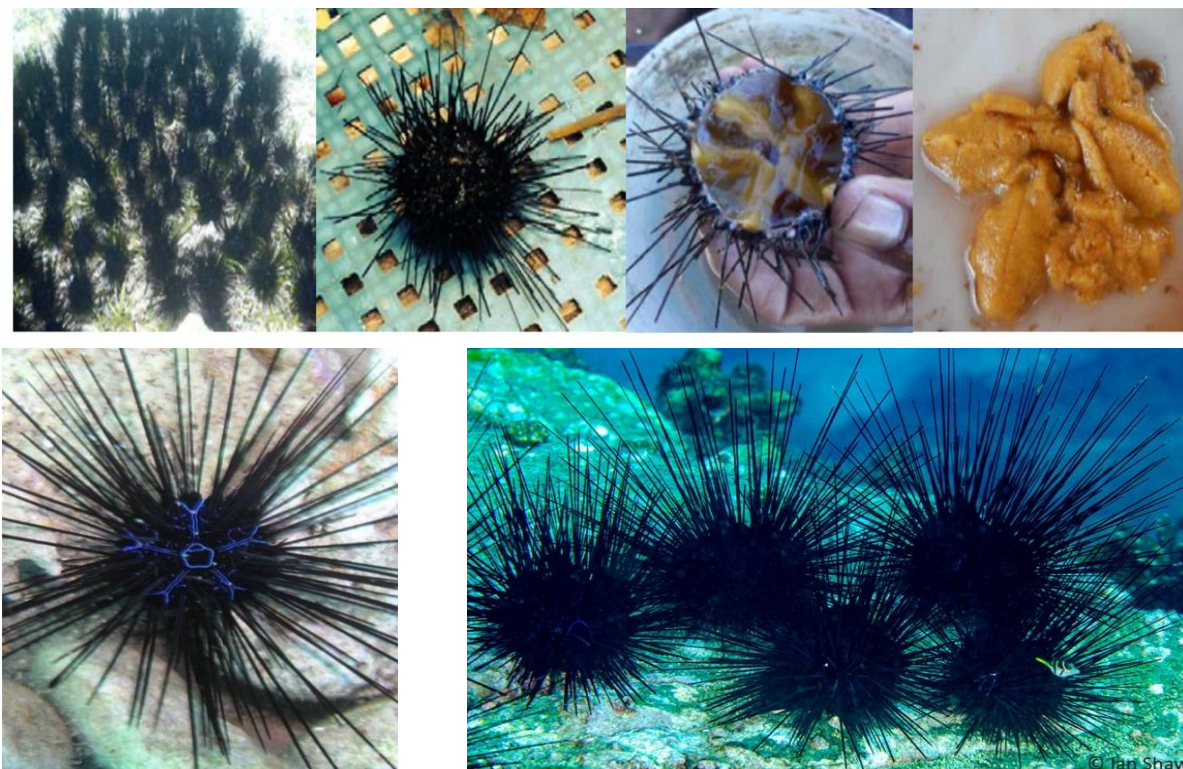
Trên thế giới, một số nghiên cứu đã chứng minh một số chiết xuất từ Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* thể hiện hoạt tính kháng khuẩn. Theo nghiên cứu của Abubakar và cộng sự (2012), hoạt tính kháng khuẩn chủ yếu có trong dịch chiết từ trứng và ruột. Nói chung, có rất ít hoặc không có hoạt động kháng khuẩn được phát hiện trong dịch chiết cả metanol và chloroform của gai và phần trứng Cầu gai vàng. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết metanol có khả năng ức chế ba chủng vi khuẩn ưa khô. Hầu hết các chiết xuất từ trứng và ruột thể hiện hoạt tính cao chống lại *Staphylococcus aureus* và *Salmonella typhi* so với *E. coli* khi tồn tại ở nồng độ muối cao (3% NaCl). Nghiên cứu này cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của Cầu gai *Tripneustes gratilla* dường như được tập trung chủ yếu ở chiết xuất từ ruột và trứng, chiết xuất từ xương, gai và dịch khoang cơ thể của Cầu gai hầu như không thể hiện hoạt tính sinh học. Tương tự như vậy, dịch chiết metanol của ruột và trứng Cầu gai cho thấy khả năng ức chế sự phát triển của *Penicillium Spp*; hoạt tính chống lại *Penicillium Spp* kém hơn đối với chiết xuất trong chloroform. Hoạt tính chống lại cả hai vi khuẩn gram dương và gram âm cũng như chống lại các loài nấm đã được chứng minh [37]. Tóm lại, nghiên cứu này cho thấy chiết xuất từ Cầu gai *Tripneustes gratilla* thể hiện các hoạt động kháng khuẩn, đặc biệt là các chiết xuất của ruột và trứng. Khả năng kháng một số vi khuẩn gây bệnh như *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*,

Vibrio fluvialis và *Vibrio damsela* của dịch chiết methanol và chloroform từ ruột, trứng và gai của Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* cũng được nghiên cứu [46]. Cặn chiết methanol từ ruột thể hiện hoạt tính kháng nhóm vi sinh vật gây bệnh nghiên cứu mạnh nhất, trong khi cặn chiết methanol từ trứng Cầu gai vàng thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Escherichia coli* mạnh nhất. Cũng trong nghiên cứu này, nồng độ ức chế tối thiểu của cặn chiết methanol từ ruột của Cầu gai vàng cũng được báo cáo. Kết quả cho thấy với *Enterococcus faecalis* nồng độ ức chế tối thiểu tương đối thấp là 400 µg/ml, trong khi với *Bacillus subtilis* là 600 µg/ml, và 800 µg/ml với *Escherichia coli* và *Vibrio damsela*.

Như vậy, thành phần hóa học có trong trứng, thân và gai Cầu gai vàng đã được các nghiên cứu cho thấy chúng có nhiều hoạt tính sinh học có lợi, phân lập và tinh sạch các hợp chất này là cần thiết để để xác định bản chất hóa học của chúng và để đánh giá chúng như tiềm năng cho các loại thuốc mới.

1.1.3. Tổng quan về Cầu gai đen *Diadema savignyi*

Cầu gai *Diadema savignyi* là một loài động vật không xương sống trong họ Diadematae, bộ Diadematoidea, lớp Echinoidea và ngành Echinodermata.

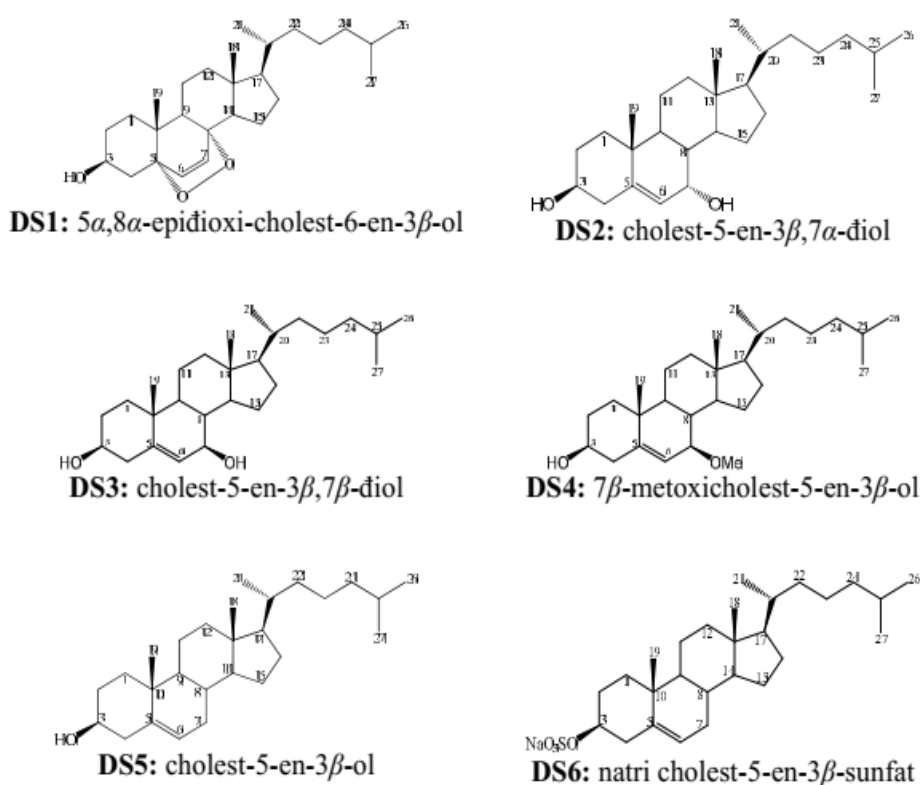


Hình 1.2. Thân và trứng Cầu gai *Diadema savignyi*

Kích thước đường kính ngang phổ biến của vỏ *Diadema savignyi* ở con trưởng thành thường nằm trong khoảng từ 40 đến 65 mm, đôi khi có thể lên đến 100 mm, và chiều cao dao động từ 20 đến 40 mm. *Diadema savignyi* thường sống trong các khu vực nước nông, chúng thường thấy trong rạn san hô ở độ sâu từ vùng triều đến khoảng 70

mét dưới biển. Loài này thường được tìm thấy ở ven biển Miền Trung và Quần đảo Hoàng Sa tại Việt Nam.

Ở Việt Nam, thành phần hóa học của *Diadema savignyi* lần đầu tiên được nghiên cứu bởi Đặng Ngọc Bách và nhóm nghiên cứu đã phân lập được 6 hợp chất từ dịch chiết methanol [47]. Cấu trúc của 06 các hợp chất này được xác định nhờ vào các phương pháp phổ hiện đại là **DS1**: 5 α ,8 α -epidioxi-cholest-6-en-3 β -ol; **DS2**: cholest-5-en-3 β ,7 α -diol; **DS3**: cholest-5-en-3 β ,7 β -diol; **DS4**: 7 β -metoxicholest-5-en-3 β -ol; **DS5**: cholest-5-en-3 β -ol; **DS6**: natri cholest-5-en-3 β -sunfat. Đây là lần đầu tiên các hợp chất này được phân lập từ loài Cầu gai *Diadema savignyi*.

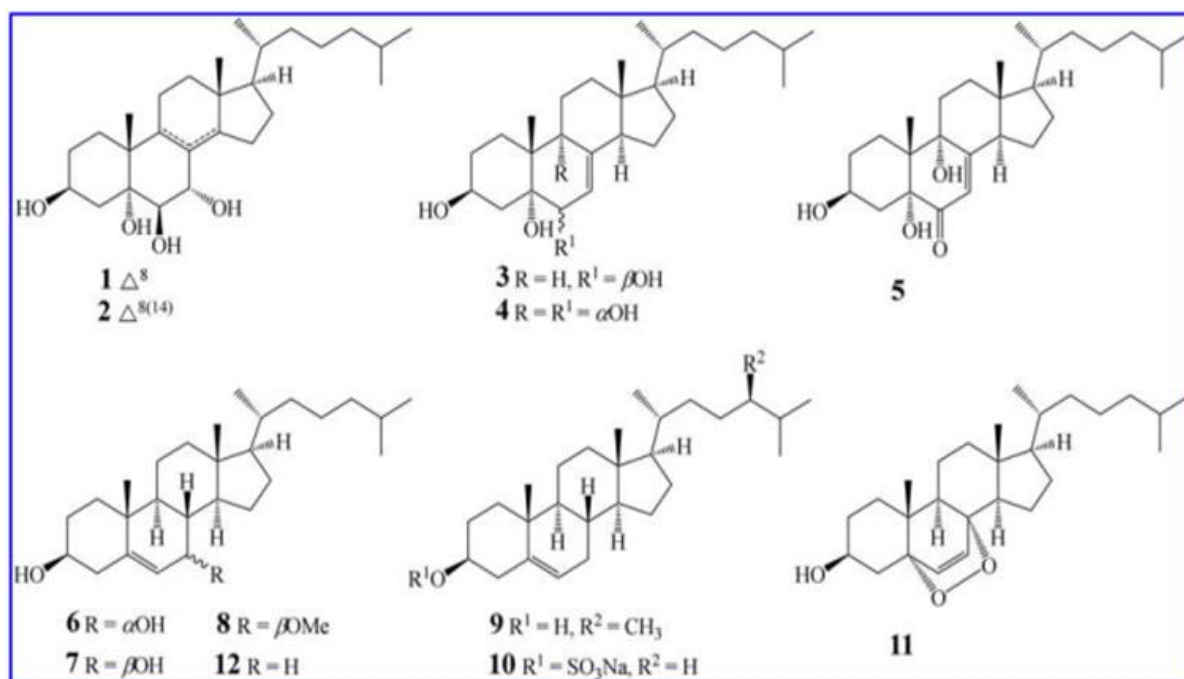


Hình 1.3. 06 hợp chất được tìm từ dịch chiết metanol của Cầu gai *Diadema savignyi*

Tác giả cũng đã tiến hành thử nghiệm hoạt tính gây độc đối với 3 dòng tế bào là HL-60 (ung thư máu), PC-3 (ung thư tuyến tiền liệt) và SNU-C5 (ung thư ruột kết) đối với các hợp chất đã phân lập được. Hợp chất **DS1** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh trên cả ba dòng tế bào ung thư người, **DS4** thể hiện hoạt tính mạnh trên hai dòng tế bào là HL-60 (ung thư máu) và PC-3 (ung thư tuyến tiền liệt). **DS2** chỉ thể hiện hoạt tính mạnh trên dòng HL-60 (ung thư máu), **DS3** thể hiện hoạt tính trung bình trên cả ba dòng tế bào, **DS6** thể hiện hoạt tính trung bình trên dòng HL-60 (ung thư máu) yếu trên dòng PC-3 (ung thư tuyến tiền liệt) và không thể hiện hoạt tính

trên dòng SNU-C5 (ung thư ruột kết). Hợp chất **DS5** không có biểu hiện hoạt tính trên cả ba dòng tế bào ung thư đã thử nghiệm.

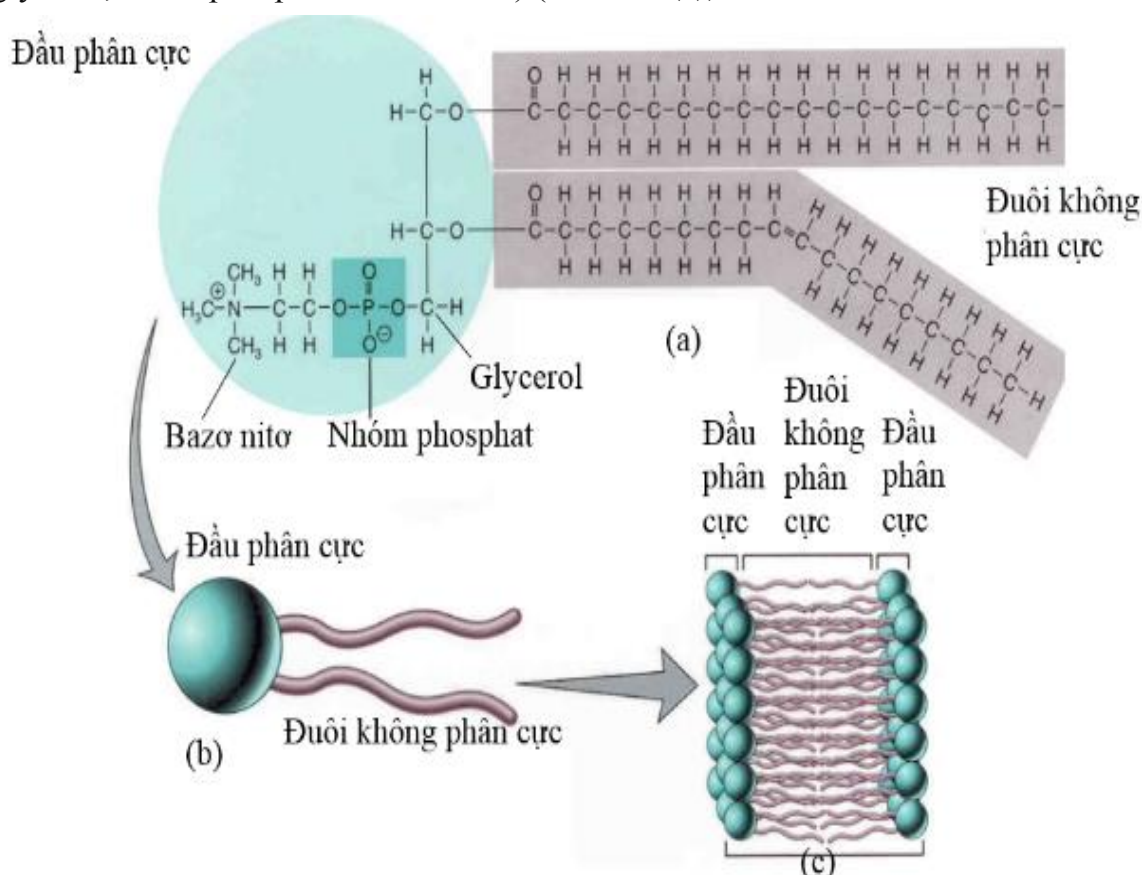
Ngoài ra còn có công trình nghiên cứu của tác giả Nguyễn Phương Thảo và cộng sự năm 2014 về thành phần steroid của loài Cầu gai này và tác động của nó tới quá trình chết của tế bào ung thư theo chu trình [3]. Bằng cách sử dụng nhiều phương pháp phân tích phổ khác nhau, tác giả đã phân lập và nhận dạng được 12 hợp chất steroid có trong cặn chiết CH_2Cl_2 . Đó là cholest-8-ene-3b,5a,6b,7a-tetraol (**1**), cholest-8(14)-ene-3b,5a,6b,7a-tetraol (**2**), cholest-7-ene-3b,5a,6b-triol (**3**), cholest-7-ene-3b,5a,6a,9a-tetraol (**4**), cholest-7-ene-6-one-3b,5a,9a-triol (**5**), cholest-5-ene-3b,7adiol (**6**), cholest-5-ene-3b,7b-diol (**7**), cholest-5-ene-7b-methoxy-3b-ol (**8**), campesterol (**9**), cholest-5-ene-3b-sulfat sodium (**10**), cholest-6-ene-5a,8a-epidioxy-3b-ol (**11**), và cholest-5-ene-3b-ol (**12**). Trong đó hợp chất (**1**) và (**2**) là lần đầu tiên được phát hiện.



Hình 1.4. 12 hợp chất steroid được phân lập từ Cầu gai *Diadema savignyi*

Hoạt tính gây độc tế bào của 12 steroid thu được từ cặn chiết CH_2Cl_2 được đánh giá trên ba dòng tế bào ung thư ở người (HL-60, PC-3 và SNU-C5). Tương tự như với chất đối chứng dương, mitoxantrone, dịch chiết CH_2Cl_2 (với nồng độ ức chế 50% IC_{50} nằm trong khoảng từ $1,37 \pm 0,15$ đến $3,11 \pm 0,15$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) và hợp chất (**2**) (có giá trị IC_{50} : $5,29 \pm 0,11$ - $6,80 \pm 0,67$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) và hợp chất (**11**) (IC_{50} trong khoảng từ $4,95 \pm 0,07$ đến $6,99 \pm 0,28$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) thể hiện tác dụng chống ung thư trên cả ba dòng tế bào ung thư được thử nghiệm ở người. Ngoài ra, chiết xuất CH_2Cl_2 và các hợp chất (**2**) và (**11**) đã được tìm thấy gây ra quá trình chết theo chương trình kèm theo sự thay đổi protein biểu hiện liên quan đến quá trình chết theo chương trình, làm

Glycerolphospholipid: Cấu tạo của glycerolphospholipid được thể hiện ở hình 1.5. Trong đó sự kết hợp của đầu kỵ nước (các gốc acid béo) và đuôi ưa nước (glycerol, nhóm phosphat và bazơ nitơ) (hình 1.5 (a)).



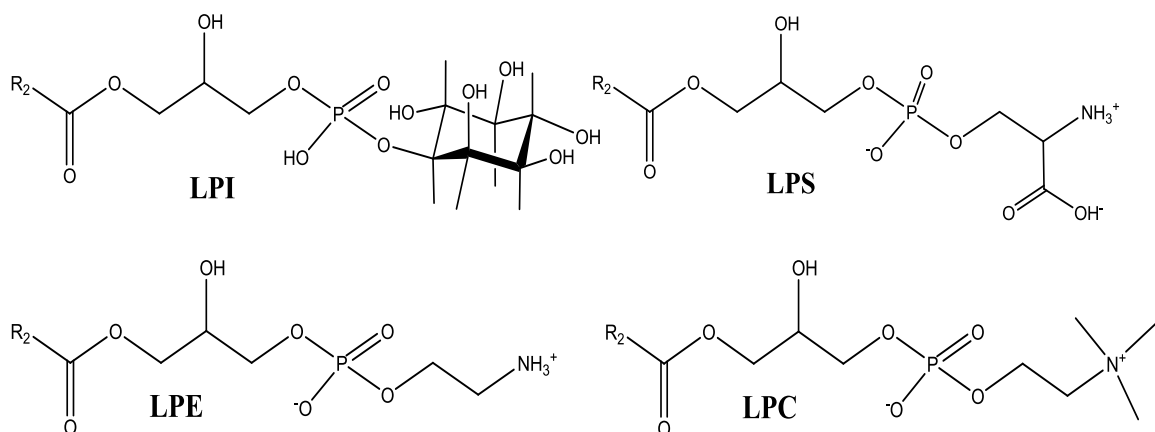
Hình 1.6. Mô hình phân tử glycerolphospholipid

Đa số các glycerolphospholipid có cấu trúc hình L vì trong cấu tạo có một nguyên tử cacbon bất đối. Gốc R1 (nhóm acyl, nhóm alkyl hoặc alkenyl) gắn với glycerol bằng liên kết este với nhóm acyl hoặc liên kết ether với nhóm alkyl hoặc alkenyl tại vị trí *sn*-1. Gốc R2 (nhóm acyl) luôn gắn với glycerol bằng liên kết este tại vị trí *sn*-2 (Hình 1.6 (a)). Nhóm phosphate và các đầu bazơ nitơ khác nhau liên kết với glycerol tại vị trí *sn*-3 tạo thành đuôi phân cực (Hình 1.6 (b)) [48]. Cấu tạo chi tiết của lớp PL kép tạo bởi đầu phân cực được mô tả trong hình 1.6 (c).

Bảng 1.3. Công thức cấu tạo của glycerophospholipid thường gặp

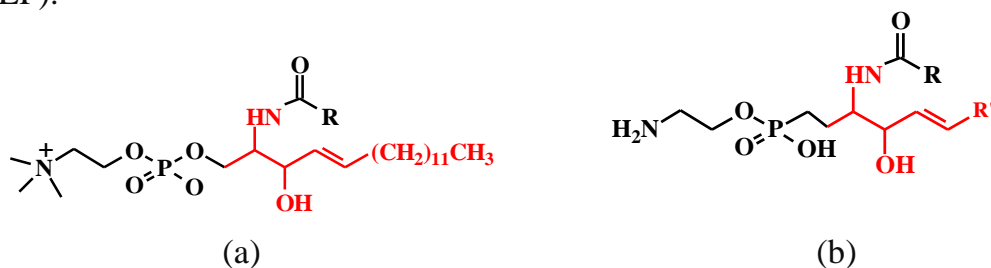
Tên gọi	Kí hiệu	Công thức phân tử	Công thức tổng quát		
			Diacyl	Ankyl acyl	Ankenyl acyl
Phosphatidyl-ethanolamine	PE	$C_xH_yNO_8P$ / $C_xH_yNO_7P$			
Phosphatidyl-choline	PC	$C_xH_yNO_8P$ / $C_xH_yNO_7P$			
Phosphatidyl-inositol	PI	$C_xH_yO_{13}P$ / $C_xH_yO_{12}P$			
Phosphatidyl-serine	PS	$C_xH_yNO_{10}$ P/ $C_xH_yNO_9P$			
Phosphatidyl-acid	PA	$C_xH_yO_8P$ / $C_xH_yO_7P$			
Phosphatidyl-glycerol	PG	$C_xH_yO_{10}P$ / $C_xH_yO_9P$			
Diphosphatidylglycerol (Cardiolipin)	DPG	$C_xH_yO_{17}P_2$			

Các nghiên cứu của E. Falch và cộng sự cho thấy chiều dài các mạch acid béo và độ bão hòa cũng phụ thuộc vào nguồn cung cấp PL. Ví dụ PL có nguồn gốc từ thực vật như đậu nành có các mạch acid béo không dài hơn 18 nguyên tử carbon và chỉ chứa 1-3 nối đôi, trong khi các PL từ lòng đỏ trứng gà hay từ các nguồn hải sản thường xuyên có mặt các acid béo C20, C22 với 4 - 6 liên kết đôi trong phân tử như các acid béo eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA). Trong lòng đỏ trứng gà chỉ chứa lượng nhỏ EPA, DHA còn trong hải sản, hàm lượng các acid béo này rất dồi dào [49]. Số lượng các gốc không phân cực trong phân tử có thể là 1 hoặc 2. Lysophospholipid chỉ có chỉ có một acid béo (thường ở vị trí sn-1) liên kết với mạch glycerol [6]. Bao gồm lysophosphatidylcholine (LPC), lysophosphatidylethanolamine (LPE), lysophosphatidylinositol (LPI), lysophosphatidylserine (LPS) (hình 1.7). Các lyso được tạo thành do quá trình phân hủy PL.



Hình 1.7. Cấu trúc hóa học tổng quát của lysophospholipid

Sphingophospholipid: được cấu tạo từ mạch khung chính là sphingosine và gồm hai dạng chính là sphingomyelin (SM) và ceramide aminoethylphosphonate (CAEP).

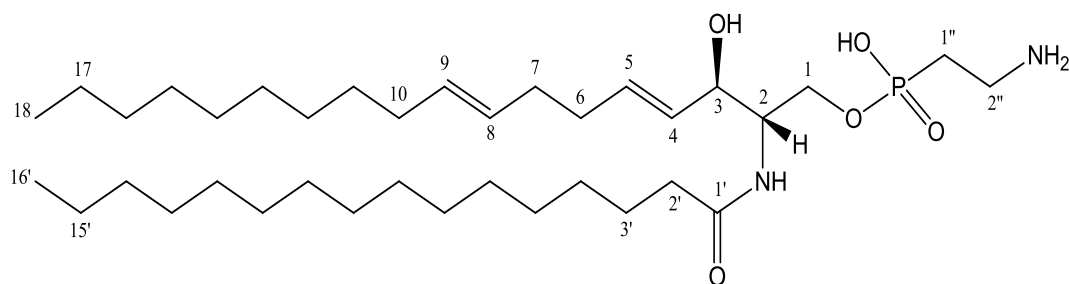


Hình 1.8. Công thức cấu tạo của sphingophospholipid

a) sphingomyelin (SM), b) ceramide aminoethylphosphonate (CAEP)

Sphingomyelin là sphingophospholipid quan trọng của màng tế bào động vật có vú [50], chiếm 25 % PL trong vỏ sợi trục tế bào thần kinh (myelin), 18 % PL trong hồng cầu và 30 - 70 % PL trong thủy tinh thể của đa số các loài động vật có vú [51] [52], trong thủy tinh thể của người SM chiếm 10 - 15% hàm lượng PL [53] [54]. SM và PC có cấu tạo hóa học phân tử tương tự nhau, nhưng SM là các phân tử không đối xứng còn PC thì đối xứng [55].

Ceramide aminoethylphosphonate cũng có nhiều trong tế bào động vật có vú và côn trùng, ký sinh trùng [53]. Gần đây cấu tạo của sphingophospholipid được phát hiện thông qua sử dụng các phương pháp khối phổ tiên tiến [56] [57]. Tác giả Đặng Thị Phương Ly và nhóm nghiên cứu đã xác định được cấu tạo CAEP 16:0/18:2 [58] [59] (hình 1.9).



Hình 1.9. Công thức cấu tạo của CAEP 16:0/18:2

Phospholipid là các este của acid photphoric (H_3PO_4). Hai lớp cơ bản của PL là glycerolphospholipid và sphingomyelin. Cấu trúc hóa học của glycerolphospholipid có thể được phân loại theo đầu phân cực, độ dài và độ bão hòa của chuỗi bên kỵ nước, kiểu liên kết giữa gốc acid béo và khung glycerol, và số lượng chuỗi acid béo [60]. Trong glycerolphospholipids, các nhóm hydroxyl tại vị trí sn-1 và sn-2 của glycerol được este hóa với hai acid béo và nhóm hydroxyl ở sn-3 vị trí là este hóa với acid photphoric. Nhóm hydroxyl tự do thứ hai của este photphat (acid photphatidic, PA) có thể phản ứng với các rượu khác (serine, choline, ethanolamine và inositol) để tạo thành phosphatidylserine (PS), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) và phosphatidylinositol (PI). Phosphatidylglycerol (PG) và diphosphatidylglycerol (DPG, hoặc cardiolipin) liên quan đến phân tử thứ hai của glycerol.

1.2.2. Hoạt tính sinh học của phospholipid

Hoạt tính sinh học của lipid cũng là hướng nghiên cứu được nhiều nhà khoa học hiện nay quan tâm, một số hoạt tính sinh học của PL được mô tả ở Bảng 1.4. Theo nghiên cứu của El Baky và cộng sự trên 5 loài vi tảo *Laurencia popillose*, *Galaxoura cylindriea*, *Ulva fasciata*, *Taonia atomaria*, *Dilophys fasciola* cho thấy hàm lượng PL chiếm từ 3-8% của lipid tổng số. Hoạt tính sinh học nổi trội được tìm thấy bao gồm kháng virus theo cơ chế giảm đám hoại tử. Trong đó hai loài ức chế HSV-1 mạnh nhất là PL từ *Laurencia papilose* và *Laurencia papilose*. Bên cạnh đó cặn chiết PL từ 5 loài tảo này đều cho thấy hoạt tính gây độc tế bào đối với tế bào ung thư vú và ung thư gan cao, có IC_{50} dao động trong khoảng 0,47-3,15 $\mu\text{g/ml}$. Hoạt tính kháng nấm cũng được chỉ ra cụ thể với PL từ *Galaxoura cylindriea*, *Ulva fasciata*, PL từ *Taonia atomaria* còn thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng nấm men trên các chủng *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* và *Candida albicans* [61].

Bảng 1.4. Hoạt tính sinh học của một số lipid chiết tách từ sinh vật biển

Tác giả	Nguồn gốc lipid	Hoạt tính sinh học	Tài liệu
Đặng Thị Phương Ly	San hô <i>Xenia sp.</i>	Kháng vi sinh vật kiểm định, kháng nấm và có khả năng gây độc tế bào	[62]
Pravat M. và cộng sự	Hải miên <i>Fasciospongia cavernosa</i>	Kháng khuẩn <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ở cá, <i>Staphylococcus pyrogenes</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Salmonella typhi</i>	[63]
El Baky và cộng sự	5 loài tảo <i>Laurencia popillose</i> , <i>Galaxoura cylindrica</i> , <i>Ulva fasciata</i> , <i>Dilophys fasciola</i> , <i>Taonia atomaria</i>	Gây độc tế bào ung thư, kháng virus, kháng khuẩn và chống oxy hóa	[64]

Đặng Thị Phương Ly đã chiết tách lipid tổng (TL), lipid phân cực và các phân lớp PL bao gồm PC, PE, CAEP, PS, PI, LPC từ san hô mềm loài *Xenia sp.* và chứng minh được hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và hoạt tính gây độc tế bào trên cặn chiết của PL. Trong đó kết quả triển vọng nhất về hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định là của các phân đoạn TL, LPE và CAEP. Ba phân đoạn thể hiện hoạt tính chống ung thư là TL, lipid phân cực và PI. Cặn chiết lipid phân cực gây độc đối với cả hai dòng tế bào Hep-G2 và LU-1. TL thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với dòng tế bào LU-1 và PI thể hiện hoạt tính đối với dòng tế bào Hep-G2 [62]. Oshima và cộng sự đã chứng minh hoạt tính chống oxy hóa của PE và PS mạnh hơn so với PC từ dịch chiết lipid cá [65]. Segawa và cộng sự tìm thấy sự tương tác chống oxy hóa của PE và PC với tocopherol trong dầu cá [66].

1.2.3. Tình hình nghiên cứu các phương pháp tách chiết phospholipid

Việc tách chiết, phân lập PL đã được đề cập tới từ những năm 1900 và có nhiều kỹ thuật được áp dụng để phân tích định tính và định lượng PL, tuy nhiên kỹ thuật được sử dụng nhiều nhất đó là sắc ký bản mỏng 1 chiều và sắc ký bản mỏng hai chiều. Bên cạnh đó, sắc ký cột cũng được sử dụng để thu được các phân đoạn của PL.

Bước đầu tiên trong bất kỳ phân tích nào về PL sẽ liên quan đến việc tách lipid khỏi mẫu sinh học. Các quy trình chiết xuất này là cần thiết để loại bỏ bất kỳ thành phần nào khác như protein, đường hoặc các phân tử nhỏ khác có thể cản trở các bước đo sắc ký. Có một số phương pháp chiết xuất lipid từ các mẫu bao gồm chiết xuất chất lỏng - lỏng và chiết xuất pha rắn [67].

Đối với các lipid phức tạp như PL, dung môi hữu cơ phân cực như metanol hoặc ethanol thường được sử dụng để tách chiết. Phương pháp chiết lipid lỏng - lỏng

phổ biến nhất được giới thiệu bởi Folch và cộng sự (1957). Kỹ thuật này sử dụng hệ dung môi chloroform : methanol (2:1) làm dung môi. Sau này đã có những phương pháp được cải tiến từ phương pháp này, bao gồm phương pháp Bligh và Dyer (1959), theo phương pháp này nước được bổ sung vào hệ dung môi tách chiết. Điều này cho phép phân tách lipid nhanh chóng. Nhìn chung, phương pháp Folch được áp dụng cho toàn bộ mẫu mô và phương pháp Bligh - Dyer được sử dụng cho chất lỏng sinh học [68]. Một phương pháp thường được sử dụng khác được công bố bởi Radin (1981) và sử dụng hệ dung môi hexane : isopropanol (3:2) và được đánh giá là ít độc hơn.

Các phương pháp chiết lỏng - lỏng có hiệu quả, nhưng việc sử dụng các dung môi hữu cơ có nguy cơ độc hại và tốn nhiều thời gian. Chiết suất rắn - lỏng sử dụng pha rắn và pha lỏng để phân tách mẫu. Pha rắn được làm từ vật liệu hỗ trợ chất hấp phụ, thường là silica hoặc silica được biến tính bằng các nhóm cyanopropyl-, aminopropyl- hoặc dihydroxypropoxypropyl [69]. Pha lỏng bao gồm các dung môi hữu cơ như methanol, chloroform hoặc hexan được sử dụng để rửa giải PL khỏi cột.

Sau khi chiết xuất được PL từ nguyên liệu, các phân tích tiếp theo cần có để phát hiện các phân tử PL riêng rẽ. Phương pháp sắc ký được sử dụng để phân tích PL. Tất cả các hệ thống sắc ký bao gồm pha tĩnh và pha động. Một mẫu được đặt trên pha tĩnh, là chất rắn hoặc chất lỏng, sau đó pha động, chất khí hoặc chất lỏng, được phép đi qua hệ thống. Các thành phần của mẫu sẽ được phân tách dựa trên các tính chất vật lý và hóa học khác nhau của chúng, tạo ra ái lực khác nhau cho hai pha. Sắc ký lớp mỏng (TLC) là phương pháp sắc ký sớm nhất được sử dụng để phân tích PL. Sắc ký khí (GC) có ứng dụng để xác định các acid béo riêng lẻ có trong PL, nhưng thường không được sử dụng để đánh giá PL. HPLC là kỹ thuật phổ biến nhất được sử dụng hiện nay để tách các lớp lipid. Tuy nhiên, những tiến bộ trong sắc ký lỏng - khối phổ (LC-MS), đặc biệt là những tiến bộ liên quan đến ion hóa phun điện (ESI), đã dẫn đến việc giảm các nghiên cứu sử dụng HPLC để đánh giá PL. Ngoại trừ TLC, có nhiều loại máy dò có thể được kết hợp với các phương pháp sắc ký trên bao gồm chỉ số khúc xạ (RI), tia cực tím (UV), huỳnh quang và phát hiện tán xạ ánh sáng bay hơi (ELSD) [67].

Vào những năm 1900, một số nghiên cứu về phương pháp phân lập và nhận dạng các dạng phân tử PL đã được đề cập [70] [71], phương pháp sắc ký lớp mỏng 1 chiều và 2 chiều đã được áp dụng để phân tích định tính và định lượng các lớp chất PL.

Hiện nay, LCMS-IT-TOF là hệ thống sắc ký lỏng có kết hợp với khối phổ tích hợp với hai kỹ thuật IT (ion trap) và TOF (time of fly) được xem là phương pháp

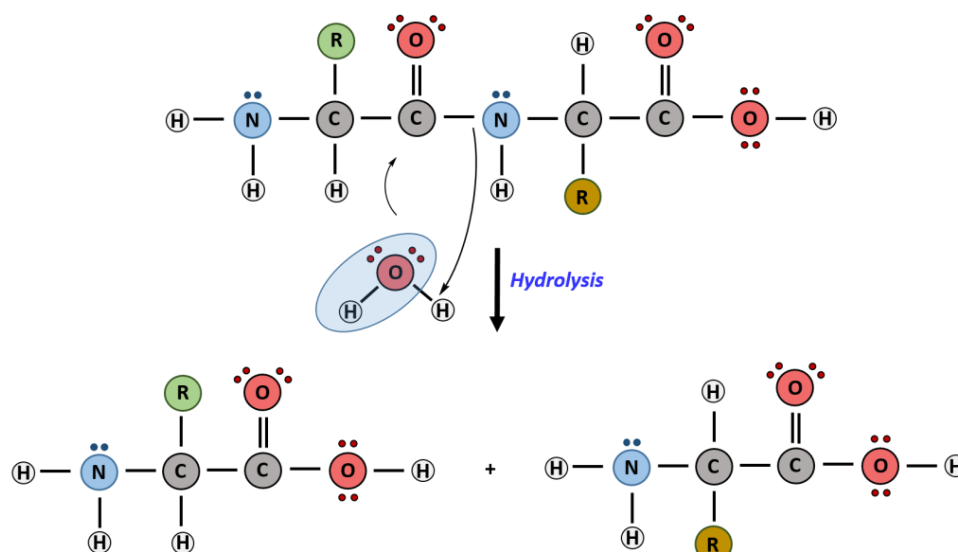
hiện đại áp dụng vào xác định các lớp chất và dạng phân tử của PL. Đây cũng là kỹ thuật phân tách PL nhanh bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) bởi hệ dung môi acetonitrin : methanol : acid phosphoric (100:10:1,8 v/v) kết hợp với đầu dò UV ở bước sóng 203 nm có giới hạn phát hiện ≈ 5 ng đã phân tách và xác định được PS, LPS, PC, LPC, PE, LPE, PI, PG, PA và SM [72].

1.3. Tổng quan về công nghệ thủy phân protein bằng enzyme

1.3.1. Giới thiệu chung về quá trình thủy phân protein

Protein được sử dụng rộng rãi làm nguyên liệu trong ngành công nghiệp thực phẩm và có thể được tìm thấy trong nhiều loại nguyên liệu như sữa (casein và whey), lúa mì (gluten), đậu nành, thịt (gelatine và chiết xuất từ thịt)... Những sản phẩm khác nhau chứa các protein có thuộc tính khác nhau. Một trong những phương pháp để thay đổi các thuộc tính này là thủy phân protein thành các peptide nhỏ hơn.

Bản chất của thủy phân protein là quá trình phá vỡ các liên kết peptide khi có mặt của nước. Liên kết peptide rất bền, nên quá trình thủy phân cần có mặt chất xúc tác. Các tác nhân xúc tác gồm: Tác nhân hóa học là acid hay bazo hay tác nhân sinh học là sử dụng enzyme thủy phân protein (protease).



Hình 1.10. Quá trình thủy phân protein

Ngày nay, tác nhân thủy phân protein được sử dụng phổ biến nhất là enzyme protease do các tính chất ưu việt và sự đa dạng của nó. Các ưu điểm của thủy phân protein bằng enzyme bao gồm điều kiện thủy phân ôn hoà, không đòi hỏi nhiệt độ cao, thường xảy ra ở khoảng 40 - 50°C, hoàn toàn không sử dụng hoá chất, không làm biến đổi thành phần acid amin ban đầu nên an toàn cho người sử dụng và giữ được giá trị dinh dưỡng [73].

Quá trình thủy phân protein bằng enzyme là một phương pháp thích hợp tạo ra các acid amin, peptide có phân tử lượng nhỏ dễ hấp thụ, cải thiện các đặc điểm

chức năng của protein. Phương pháp này đạt được tính chất chức năng mong muốn của protein thực phẩm và giảm thiểu phản ứng phụ không mong muốn làm suy giảm giá trị dinh dưỡng của protein.

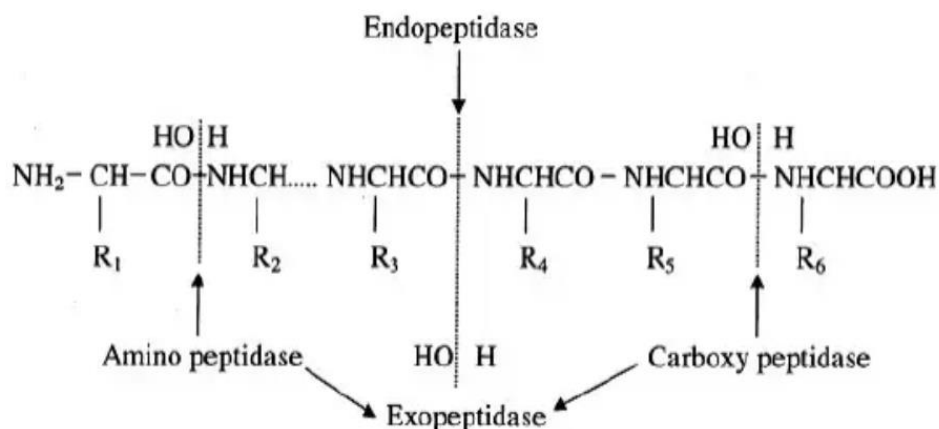
Khác với phương pháp sử dụng acid, thủy phân protein bằng enzyme thường có tính chọn lọc do enzyme có tính chất đặc hiệu. Ví dụ, enzyme papain có khả năng cắt liên kết peptide gần với arginine, lysine và phenylalanine; pepsin có khả năng cắt chuỗi peptide chứa phenylalanine hoặc leucine... Enzyme protease đóng vai trò quan trọng trong quá trình thủy phân protein, nó có thể cắt đứt các liên kết peptide theo hai cách: exopeptidase (cắt từ hai đầu của chuỗi) và endopeptidase (cắt ở vị trí bên trong chuỗi peptide). Do đó, bằng cách sử dụng enzyme một cách chọn lọc, quá trình thủy phân protein có thể mang lại những sản phẩm phù hợp với yêu cầu công nghệ, cũng như có những giá trị sinh học cao.

1.3.2. Tổng quan về hệ enzyme thủy phân protein

Enzyme là chất xúc tác sinh học, có bản chất là protein, hòa tan trong nước và trong dung dịch muối loãng. Enzyme có tính chất đặc hiệu và ưu việt so với các chất xúc tác hóa học khác do nó có khả năng phân cắt liên kết một cách chọn lọc, tạo ra sản phẩm mong muốn mà không gây ra nhiều phản ứng phụ không cần thiết. Enzyme hoạt động ở điều kiện nhiệt độ và pH tương đối ôn hòa, không đòi hỏi nhiệt độ cao hoặc môi trường quá acid hoặc kiềm. Điều này làm giảm nguy cơ gây biến tính và mất hoạt tính của enzyme. Vì những ưu điểm này, enzyme được sử dụng rộng rãi trong các ngành sản xuất thực phẩm, dược phẩm, y học, nông nghiệp, mĩ phẩm và công nghiệp hiện đại [74].

Cho tới nay, khoảng hơn 5000 enzyme đã được phát hiện, trong đó số các enzyme thủy phân thuộc lớp 3-hydrolase chiếm tới hơn 1200. Trong nhóm enzyme hydrolase, thì protease có ý nghĩa vô cùng lớn. Protease là các enzyme thủy phân protein, bẻ gãy các mạch liên kết peptide của polypeptide hoặc protein. Vì vậy, ngày nay để nói rõ bản chất là thủy phân các liên kết peptide trong protein nên từ “protease” thường hay được thay bằng “peptidase”.

Các loại enzyme protease có thể thu được từ nguồn khác nhau, bao gồm protease từ động vật, các protease thực vật và các protease từ vi sinh vật. Dựa vào vị trí phân cắt liên kết peptide ở nội mạch hay đầu mạch, enzyme protease chia thành 2 nhóm: endopeptidase và exopeptidase gồm carboxypeptidase và aminopeptidase [73]. Aminopeptidase cắt liên kết peptide ở đầu N cuối cùng, carboxypeptidase cắt liên kết ở đầu C cuối cùng trong mạch. Endopeptidase cắt các liên kết peptide trong nội mạch phân tử protein và hình thành nên các chuỗi peptide ngắn hơn.



Hình 1.11. Phân loại enzyme dựa vào vị trí cắt liên kết peptide

Protease được ghi nhận là hệ enzyme ứng dụng nhiều nhất trong ngành công nghiệp dược phẩm, thực phẩm và tẩy rửa [75]. Một đặc điểm vượt trội của protease là khả năng phân cắt liên kết peptide trong phân tử protein để giải phóng các peptide có hoạt tính sinh học cao và được áp dụng rộng rãi trong việc sản xuất các sản phẩm dinh dưỡng, thực phẩm chức năng [76].

Có rất nhiều enzyme protease thương mại được sử dụng như Alcalase, pancreatin, trypsin, pepsin, papain, neutrase, protamex, flavourzyme... được sử dụng để phân cắt các liên kết peptide của phân tử protein tạo thành các peptide mạch ngắn, có khối lượng phân tử thấp và các acid amin tự do có hoạt tính sinh học [77] [78] [79]. Peptide có hoạt tính sinh học (BP) là những đoạn protein đặc biệt đóng vai trò tích cực trong việc hỗ trợ các chức năng sinh học và tác động tích cực đến sức khỏe con người [80]. Chúng chủ yếu bao gồm các peptide được cấu tạo từ 2-20 acid amin có trọng lượng phân tử (MW) dưới 6 kDa [80]. Bên cạnh giá trị dinh dưỡng, các peptide hay acid amin là sản phẩm của quá trình thủy phân protein được chứng minh là có nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng như khả năng chống oxy hóa, khả năng kiểm soát hoạt động xúc tác của enzyme gây cao huyết áp [81] [82] [83] hay khả năng chống đột biến gen gây ung thư [84] [85] [86].

Alcalase đã được chứng minh là một trong các enzyme hiệu quả nhất trong việc giải phóng các peptide có hoạt tính sinh học từ các loại protein có nguồn gốc khác nhau [87]. Alcalase có tính đặc hiệu cao nên nó được sử dụng rộng rãi để thủy phân các loại protein khác nhau và luôn mang lại hiệu quả thủy phân cao, ngay cả khi nó được sử dụng riêng rẽ hay kết hợp với các loại enzyme protease khác. Ahmadifard

và cộng sự đã so sánh hiệu quả xúc tác của Alcalase, papain và một loại enzyme tổ hợp thương mại chứa trypsin, thymotrypsin và aminopeptidase khi tiến hành thủy phân gạo và protein đậu tương, kết quả cho thấy enzyme Alcalase cho hiệu quả thủy phân cao hơn vượt trội, gấp 10 lần so với các enzyme còn lại [88]. Alcalase phổ biến nhất trong sản xuất thực phẩm được sản xuất từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis*, hoạt tính 2,4 AU/g. Nhiệt độ tối ưu 30 - 65°C, dải pH hoạt động từ 7,0 - 9,0, được bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C. Ngày nay enzyme này được sản xuất bằng phương pháp lên men chìm sử dụng vi khuẩn *Bacillus licheniformis*.

1.3.3. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước về quá trình thủy phân protein

1.3.3.1. Tình hình nghiên cứu trong nước

Ở Việt Nam, việc sử dụng enzyme trong thu nhận các hợp chất có hoạt tính sinh học cao ngày càng được chú trọng, đặc biệt việc sử dụng hệ enzyme thủy phân để tạo ra các sản phẩm giàu acid amin, oligopeptide, hay protein có khối lượng phân tử thấp không chỉ dừng ở việc tạo ra các sản phẩm cho thức ăn chăn nuôi mà còn được nghiên cứu sâu hơn để tạo ra các sản phẩm thực phẩm cho con người. Hiện nay, việc sử dụng các loại protease khác nhau để sản xuất dịch đậm thủy phân từ phụ phẩm thủy sản đang được nghiên cứu để tạo sản phẩm giá trị gia tăng cho nguồn nguyên liệu thủy sản.

Nghiên cứu ứng dụng protease thủy phân protein để thu dịch đậm hòa tan giàu acid amin từ protein cá sẽ tạo tiền đề quan trọng cho việc sản xuất ra nhiều sản phẩm có giá trị kinh tế cao như các loại nước mắm cao cấp, các loại nước chấm cao đậm, hay sử dụng là thực phẩm bổ sung có hàm lượng dinh dưỡng cao, ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, nông nghiệp và lĩnh vực y dược [89]. Tác giả Thư và cộng sự (2018) đã nghiên cứu sử dụng hệ 0,2% Alcalase trong 12 giờ và kết hợp với 0,4% Flavourzyme trong 9 giờ để thủy phân phụ phẩm cá lóc thu được dịch đậm có hàm lượng đạm acid amin, hiệu suất thu hồi nitrogen và độ thủy phân cao nhất lần lượt là 6,58 g/L; 44,6% và 38,0%, trong khi hàm lượng đạm ammoniac thấp là 0,269 g/L [90].

Tác giả Nguyễn Văn Mười và cộng sự (2018) đã nghiên cứu khảo sát điều kiện tối ưu của enzyme Alcalase để thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ chân trắng, kết quả cho thấy sử dụng nồng độ enzyme Alcalase 20UI/g trong thời gian thủy phân 4 giờ ở pH 7,65 và nhiệt độ 58,78°C là điều kiện thích hợp để hiệu suất thủy phân cao (37,6%) và dịch thủy phân có hoạt tính chống oxy hóa cao (31,57%) [91].

Thủy phân bằng enzyme có ưu điểm là chỉ cần một lượng nhỏ enzyme trong điều kiện phản ứng ôn hòa, pH 6 - 8 và nhiệt độ phản ứng 40°C - 60°C. Các acid amin không bị phá hủy, sản phẩm thủy phân vẫn giữ được giá trị dinh dưỡng và đặc tính sinh học và không cần xử lý hóa học để loại bỏ tác nhân thủy phân. Enzyme dễ dàng bị bất hoạt bằng cách gia nhiệt lên đến nhiệt độ làm biến tính enzyme. Quá trình thủy phân được kiểm soát dễ dàng, không cần sử dụng thiết bị chịu acid, chịu kiềm, chịu nhiệt độ cao, không gây độc hại đối với người và thân thiện với môi trường. Tuy nhiên, giá thành của các enzyme hiện nay còn cao và hiệu suất thủy phân còn thấp hơn so với thủy phân bằng phương pháp hóa học, do đó làm hạn chế ứng dụng của quá trình này vào trong sản xuất ở qui mô lớn.

1.3.3.2. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Trên thế giới, có nhiều công trình nghiên cứu chứng minh hiệu quả của việc sử dụng enzyme thủy phân protease để tạo các sản phẩm có giá trị kinh tế cao từ các phụ phẩm của ngành thủy sản. Các phế phụ phẩm thủy sản đã được nghiên cứu, sử dụng để tạo sản phẩm protein thủy phân như xương cá hồi [92], đầu cá hồi [93], xương cá tuyết [78], đầu và nội tạng cá trích [94], phế liệu cá tầm [95]... Các enzyme được sử dụng phổ biến nhất để thủy phân protein từ nguồn phụ phẩm thủy sản là Protamex, Alcalase, Flavourzyme, Neutrase... [95] [93]

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào khả năng chống oxy hóa của peptide và protein thủy phân có nguồn gốc từ cả thực vật và động vật [96]. Các sản phẩm có hoạt tính sinh học cao từ protein và peptide có thể được điều chế thông qua quá trình thủy phân bằng các enzyme phân giải protein. Thành phần acid amin, chức năng và đặc tính chống oxy hóa bị ảnh hưởng nhiều bởi các điều kiện thủy phân, bao gồm thời gian thủy phân, pH, nhiệt độ, tỷ lệ chất đệm trên chất nền, và tỷ lệ enzyme - cơ chất (E/S). Các enzyme phân giải protein như Alcalase, Papain, Protamex, Flavourzyme, Neutrase, Bromelain, Pancreatin, Trypsin, Chymotrypsin và Thermolysin là những enzyme thương mại được sử dụng thường xuyên nhất cho quá trình thủy phân bằng enzyme [97].

Trọng lượng phân tử của các peptide thủy phân có hoạt tính sinh học (BP) là yếu tố quan trọng quyết định tới hoạt tính sinh học của nó [98]. Cần phải tách các BP dựa theo các khối lượng phân tử (MW) khác nhau có chức năng sinh học khác nhau. Aondona và cộng sự (2021) phát hiện thấy peptide có MW < 1kDa là chất ức chế mạnh nhất hoạt động chống lại enzyme chuyển angiotensin (ACE) (81%), trong khi

các peptide lớn hơn (MW > 3–5 và 5–10 kDa) là chất ức chế renin hiệu quả nhất (75%–85%) [99]. Vì vậy, nghiên cứu tách và tinh chế BP dựa trên công nghệ màng ngày càng thu hút được sự quan tâm của các nhà nghiên cứu.

Các đặc tính chức năng của các sản phẩm thủy phân protein như độ hòa tan, khả năng nhũ hóa và tạo bọt rất quan trọng đối với ngành công nghiệp thực phẩm [100]. Islam và cộng sự đã báo cáo rằng khả năng hòa tan protein là đặc tính chức năng quan trọng nhất, vì nó ảnh hưởng đến khả năng nhũ hóa, khả năng liên kết nước và đặc tính tạo bọt [97]. Trong số các tác động tích cực tới chế biến thực phẩm thì thủy phân protein cũng mang tới những lợi ích liên quan đến giá trị dinh dưỡng và tính chất chức năng của thực phẩm. Chúng bao gồm khả năng tiêu hóa được cải thiện, thay đổi về chất lượng cảm quan (như kết cấu hoặc hương vị) và các lợi ích cho sức khỏe, như cải thiện khả năng chống oxy hóa hoặc giảm các hợp chất gây dị ứng [101]. Nhiều trong số các quá trình có thể đạt được bằng cách thủy phân protein sử dụng các protease. Các quá trình phân giải protein thay cho các quá trình hóa học là một lựa chọn hấp dẫn khi có thể giữ được các thành phần dinh dưỡng khác của thực phẩm. Thủy phân protein thông qua xử lý acid trực tiếp sẽ ảnh hưởng đến các thành phần khác và/hoặc tạo ra các sản phẩm có thể gây hại.

Quá trình thủy phân protein bằng enzyme có thể cải thiện khả năng hòa tan cũng như các tính chất hóa lý khác và có thể dẫn đến việc tạo ra các peptide có hoạt tính sinh học [102]. Nhiều các nhà nghiên cứu và nhà sản xuất có xu hướng lựa chọn sử dụng phương pháp thủy phân bằng enzyme hơn, vì nó an hơn so với phương pháp thủy phân hóa học bằng acid hoặc kiềm mạnh. Các ứng dụng công nghiệp sử dụng quá trình thủy phân bằng acid hoặc kiềm có hiệu quả về chi phí và thời gian, nhưng hóa chất khắc nghiệt có thể làm giảm chất lượng dinh dưỡng của sản phẩm thực phẩm và sản xuất sinh thái ô nhiễm không thể chấp nhận được

Ngoài ra, cũng có nhiều nghiên cứu kết hợp nhiều tác nhân cùng lúc nhằm đưa ra điều kiện quy trình tối ưu nhất để đạt được kết quả thủy phân cao. Cụ thể, các nhà khoa học đã nghiên cứu thủy phân sử dụng các enzyme khác nhau, tiền xử lý mẫu bằng sóng siêu âm, đồng thời kết hợp gia nhiệt và khuấy trong khi thủy phân.

Trong số protease thủy phân protein thì Alcalase có hoạt tính endopeptidase có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis* [103], nhờ vào hoạt tính endopeptidase của Alcalase cắt liên kết peptide bên trong phân tử protein đem lại hiệu quả thủy phân cao và thủy phân liên kết peptide chủ yếu tại các nhóm -COOH kỵ nước bên

trong phân tử protein [104]. Flavourzyme có cả hoạt tính endopeptidase và exopeptidase nhưng chủ yếu là exopeptidase, có nguồn gốc từ *Aspergillus oryzae* [105]. Nhờ vào hoạt tính exopeptidase của flavourzyme, thủy phân từ đầu C hoặc đầu N của các acid amin kỵ nước cuối cùng của phân tử protein dẫn đến giảm vị đắng của dịch protein thu được [104].

Alcalase là enzyme endoprotease, một loại enzyme kiềm được sản xuất từ *Bacillus licheniformis* và được nghiên cứu bởi Novo Nordisk (Bagsvaerd, Đan Mạch). Alcalase là enzyme nhóm serine protease subtilisin A. Hoạt tính của Alcalase 2,4L là 2,4 AU/g, bị ức chế ở pH thấp hoặc nhiệt độ cao, điều kiện tối ưu của Alcalase là pH = 6,5 - 8,5; nhiệt độ 45 - 65°C. Alcalase là một trong những loại enzyme cho hiệu quả thủy phân protein cao, đã được chứng minh là một trong những enzyme tốt nhất để thủy phân protein từ cá, cho sản phẩm có đầy đủ các tính chất của protein cá nguyên bản. Sản phẩm thu được từ quá trình thủy phân bằng Alcalase có hàm lượng lipid thấp và tính chất chức năng, hoạt tính sinh học nổi trội. Các enzyme có nguồn gốc từ vi khuẩn phù hợp hơn vì chúng có nhiều hoạt động xúc tác cũng như độ ổn định về pH và nhiệt độ. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh Alcalase là enzyme hiệu quả nhất cho quá trình thủy phân protein để thu các peptide có hoạt tính sinh học cao [87]. Bên cạnh đó, tính chất protein của enzyme Alcalase ít biến đổi nhất, sản phẩm có hàm lượng lipid thấp cũng đã được chỉ ra khi sử dụng enzyme này để thủy phân các sản phẩm thủy sản. So với Papain và Neutrane, sản phẩm thủy phân từ Alcalase ít đắng hơn so với papain, đồng thời nó cũng tốn chi phí ít nhất. Alcalase khi thủy phân sẽ tạo ra nhiều các acid amin không hút nước, dẫn đến sản phẩm thủy phân không có vị đắng đồng thời sản phẩm có sự đa dạng và cân bằng về tỉ lệ các acid amin thiết yếu. Trong nghiên cứu của Kula và cộng sự, khi sử dụng riêng enzyme Trypsin và Alcalase thì mức độ thủy phân protein *Trachinus draco* đạt khoảng 44%, nhưng khi sử dụng theo cách tuần tự (2h đối với thủy phân trypsin và sau 2h thủy phân bằng Alcalase) mức độ thủy phân đạt giá trị khoảng 78%. Những kết quả này minh họa tác dụng hiệp lực của hai enzyme hoạt động ở các vị trí khác nhau của protein vì chúng có đặc tính khác nhau [106].

Có nhiều báo cáo so sánh các protease khác nhau để thu được peptide chống oxy hóa từ protein cá. Gelatin vảy cá rô phi sông Nile (*Oreochromis niloticus*) được thủy phân bằng Alcalase, Pronase E, Trypsin hoặc Pepsin, sản phẩm thủy phân thu được có nguồn gốc từ Alcalase thể hiện hoạt tính chống oxy hóa cao nhất [107]. Hoạt tính chống oxy hóa của protein thủy phân từ cá trắm cỏ (*Ctenopharyngodon idellus*) sử dụng Alcalase hoặc Papain đã được nghiên cứu [108], kết quả cho thấy ở cùng

mức độ thủy phân, sản phẩm thủy phân bằng Papain có khả năng quét gốc tự do DPPH cao hơn tuy nhiên và khả năng khử tốt hơn so với thủy phân bằng Alcalase. Ngoài ra, prtein từ cá ngừ vẫn được thủy phân bằng Pepsin, Trypsin, Neutrase, Papain hoặc Alcalase cũng được nghiên cứu. Sản phẩm thủy phân được điều chế bằng Alcalase và Neutrase, cho thấy khả năng chống oxy hóa mạnh nhất nhờ sự hiện diện của các peptide có kích thước phân tử nhỏ, chứa acid amin kỵ nước và acid amin thơm [109].

Như vậy việc sử dụng enzyme Alcalase để thủy phân protein sẽ tạo được các acid amin tự do, oligopeptide, peptide và protein có khối lượng phân tử thấp có hoạt tính sinh học cao, đây sẽ là một hướng ứng dụng đầy triển vọng của enzyme Alcalase trong việc nâng cao giá trị của các nguồn protein, đặc biệt là việc tận dụng các nguồn phế phụ phẩm của ngành sản xuất thực phẩm để tạo ra các sản phẩm thực phẩm có giá trị.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

2.1.1. Mẫu Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

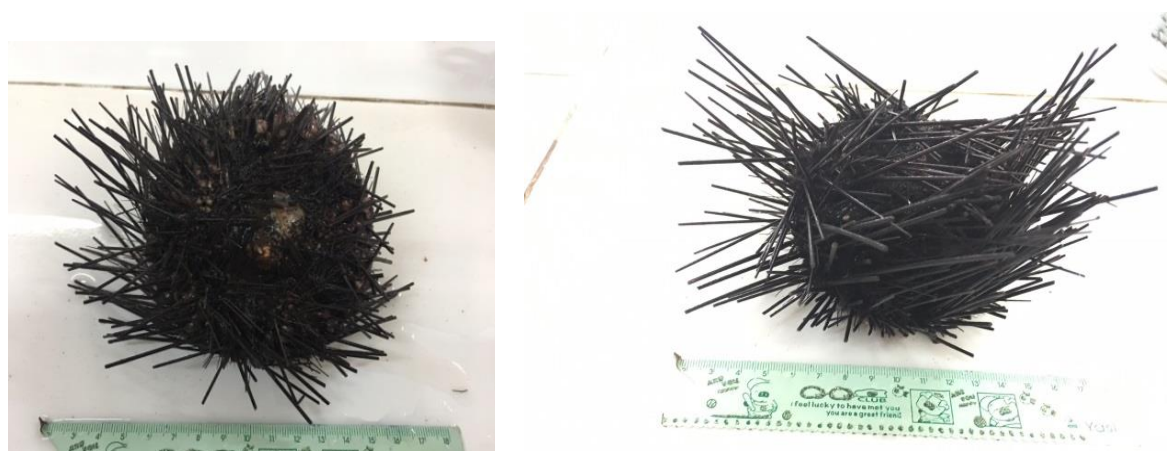
Mẫu Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* (Linnaeus, 1758) được thu thập vào tháng 11 năm 2016 tại Hòn Tằm, Nha Trang, Khánh Hòa. Mẫu được định danh bởi TS. Nguyễn An Khang Viện Hải dương học Nha Trang - Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam. Tất cả các mẫu đã được làm sạch và bảo quản ở 4°C trong điều kiện tiêu chuẩn và vận chuyển ra viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên.



Hình 2.1. Mẫu Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

2.1.2. Mẫu Cầu gai đen *Diadema savignyi*

Cầu gai đen *Diadema savignyi* (Audouin, 1809) được thu thập vào tháng 11 năm 2016 ở Hòn Tằm, Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam và được phân loại bởi TS. Nguyễn An Khang, Viện Hải dương học Nha Trang - Viện Hàn Lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam. Tất cả các mẫu đã được làm sạch và bảo quản ở 4°C trong điều kiện tiêu chuẩn và vận chuyển ra viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên.



Hình 2.2. Cầu gai đen *Diadema savignyi*

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân tích thành phần hóa học

2.2.1.1. Phương pháp phân tích hàm lượng nước

Hàm lượng nước trong trứng Cầu gai và thân Cầu gai được xác định theo TCVN 3700-90 [110] - quy định phương pháp xác định hàm lượng nước đối với các nguyên liệu, bán thành phẩm và sản phẩm thủy sản. Nguyên tắc là dùng nhiệt sấy mẫu ở nhiệt độ 100 - 150°C để loại bỏ nước khỏi mẫu thử, hiệu số khối lượng của mẫu thử trước và sau khi sấy khô là lượng nước có trong mẫu thử.

2.2.1.2. Phương pháp phân tích hàm lượng tro tổng số

Hàm lượng tro trong hầu nguyên liệu xác định theo TCVN 5105-90 [111] - qui định phương pháp xác định khối lượng tro tổng số và tro không tan trong nước đối với các nguyên liệu, bán thành phẩm và sản phẩm thủy sản. Nguyên tắc là dùng nhiệt độ cao (500 - 550°C) nung cháy hoàn toàn chất hữu cơ, sau đó định lượng phần cặn còn lại, đó chính là hàm lượng tro tổng số.

2.2.1.3. Phương pháp phân tích hàm lượng protein tổng số thông qua hàm lượng nitơ tổng số bằng phương pháp Kjeldahl

Hàm lượng protein tổng số trong mẫu nguyên liệu Cầu gai tươi được xác định theo TCVN 3705-90, qui định phương pháp xác định hàm lượng nitơ tổng số và protein thô đối với các nguyên liệu, bán thành phẩm và sản phẩm thủy sản [112].

Nguyên tắc chung: Vô cơ hóa mẫu thử bằng acid sunfuric đậm đặc, nitơ có trong mẫu thử chuyển thành amon sunfat. Dùng kiềm đặc đẩy amoniac ra khỏi amon sunfat trong máy cất đạm, tạo thành amon hydroxyt, rồi định lượng bằng acid. Hàm lượng nitơ trung bình trong phân tử protein của sản phẩm thủy sản là 16%. Vì vậy hàm lượng protein thô trong mẫu thử bằng hàm lượng nitơ tổng số nhân với hệ số 6,25.

2.2.1.4. Phương pháp phân tích hàm lượng protein hòa tan

Để định lượng được hàm lượng protein hòa tan, trước hết protein của mẫu trứng Cầu gai nguyên liệu được chiết xuất theo phương pháp muối/kiềm [113].

Hàm lượng protein hoà tan có trong mẫu trứng Cầu gai nguyên liệu và dịch thuỷ phân trứng Cầu gai được phân tích bởi phương pháp Lowry cải tiến [114]. Phương pháp này dựa trên cơ sở phức chất đồng protein khử hỗn hợp Photphomolipden - Photphovonphramat (thuốc thử Folin - Ciocalteu) tạo phức chất màu xanh da trời có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 660 nm. Cường độ màu của hỗn

hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ protein. Xây dựng đường chuẩn về mối quan hệ giữa mức độ hấp thụ quang học và nồng độ của protein chuẩn, ta có thể xác định được hàm lượng protein trong mẫu nghiên cứu.

2.2.1.5. Phương pháp phân tích hàm lượng lipid tổng

Lipid tổng trong mẫu nghiên cứu được chiết tách và định lượng theo phương pháp Bligh - Dyer cải tiến [115].

2.2.1.6. Phương pháp phân tích hàm lượng acid amin

Thành phần và hàm lượng acid amin được xác định trên máy Agilent 1200 HPLC. Hỗn hợp để phân tích sắc ký bao gồm 16 acid amin từ hỗn hợp acid amin chuẩn 250 pmol/ μ L standard mix (PN: 5061-3331) và citrulline và 6 acid amin bổ sung, được hòa trộn tại nồng độ khoảng 250 pmol/ μ L.

2.2.1.7. Phương pháp phân tích thành phần và hàm lượng các acid béo

Thành phần và hàm lượng acid béo xác định theo phương pháp ISO/DIS 5590:1998 (International Organisation for Standardisation/Final draft) trên máy sắc kí khí GC và sắc kí khí kết nối khối phổ GCMS, tất cả các acid béo phải được chuyển hóa thành dạng methyl este. Methyl este của acid béo (FAME) được phân tích bằng GCMS Shimadzu QP 2010 Ultra series, cột mao quản DXLLB, (30m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m), chương trình nhiệt độ GC 200°C trong 10 phút, từ 200°C đến 230°C trong 5 phút, 230°C trong 10 phút và He được sử dụng làm khí mang. Phổ khối của FAME được so sánh với thư viện khối phổ: WILEY275.L và NIST 98 [116].

2.2.1.8. Phương pháp phân tích các nguyên tố vi lượng và kim loại nặng

Các nguyên tố vi lượng và kim loại nặng được thực hiện bằng máy quang phổ hấp thụ nguyên tử cùng các bộ phận đi kèm: Thermo Elemental-Model Solaar M6 Dual Zeeman Atomic Absorption Spectrometer, hệ tạo hydrua VP 90-hydride generation, đèn catốt rỗng, HCL data Coded [117].

2.2.1.9. Phương pháp xác định hàm lượng carotenoid

Hàm lượng carotenoid tổng được xác định bằng phương pháp quang phổ [118]. Phương pháp này dựa trên quá trình trích ly carotenoid bằng dung môi ethanol 95% và đo độ hấp thụ tại bước sóng hấp thụ cực đại của chlorophyll a, chlorophyll b và carotenoid.

2.2.1.10. Phương pháp xác định hàm lượng các thành phần của hormone steroid

Thành phần của hormone steroid như testosterone, estradiol và progesteron được xác định bằng phương pháp ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent assay).

2.2.2. Phương pháp phân lập và nhận dạng các phospholipid

2.2.2.1. Phương pháp phân tích thành phần các lớp chất lipid, phospholipid

Thành phần các lớp chất lipid được xác định trên TLC tráng sẵn (6cm x 6cm, Sorbfil, Krasnodar, LB Nga), hiện hình bằng dung dịch acid $H_2SO_4/MeOH$ 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.

Thành phần các lớp chất PL được xác định bằng TLC 1 và 2 chiều trên bản mỏng tráng sẵn (6cm x 6cm, Sorbfil, Krasnodar, LB Nga), sử dụng các thuốc thử molybdate, ninhydrin và dung dịch acid $H_2SO_4/MeOH$ 10%.

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) [119].

2.2.2.2. Phương pháp sắc ký khối phổ hiệu năng cao để xác định dạng phân tử của các phân lớp lipid phân cực

Dạng phân tử của các phân lớp lipid phân cực của các mẫu Cầu gai được phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối phổ khối phân giải cao (HPLC-HRMS) trên thiết bị Shimadzu LCMS-IT-TOF, do hãng Shimadzu (Kyoto, Nhật Bản) ở điều kiện ion hóa hóa học áp suất khí quyển (APCI). LCMS-IT-TOF là phổ kế mới kết hợp các công nghệ khối phổ (MS), bẫy ion (ion trap - IT) và thời gian bay (time of flight - TOF).

Trong phương pháp này, các chất cần phân tích trước hết phải được chuyển sang dạng dẫn xuất dễ bay hơi, tiếp đó được ion hóa bằng phương pháp thích hợp. Các ion sau đó được nghiên cứu trong bộ phân tích khối của máy khối phổ. Hiện nay, kiểu quét ion dương (+) và ion âm (-) thường được tích hợp cùng nhau. Trong kỹ thuật bẫy ion (IT) sự thay đổi thế trong bẫy sẽ giữ lại một hay vài ion nhất định (trong chế độ chọn lọc ion) hay gia tốc các ion (trong chế độ MS nhiều lần). IT có khả năng tích lũy các ion, phân tích khối, phân lập ion và phân rã ion bằng va chạm vì thế đây là phương tiện hiệu quả để nghiên cứu cơ chế phân mảnh. Kỹ thuật TOF

dựa trên sự khác nhau về vận tốc của các ion có khối lượng khác nhau khi ở trong cùng một mức năng lượng. TOF có độ phân giải cao và số khối chính xác (tới 0,0001) [120].

2.2.3. 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 thí 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.

2.2.4. Phương pháp xác định hoạt tính sinh học

2.2.4.1. Phương pháp nghiên cứu độc tính cấp của sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe trứng Cầu gai

Sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe trứng Cầu gai được đánh giá độc tính *in vivo* theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới và hướng dẫn của Bộ Y tế Việt Nam về thuốc thử có nguồn gốc từ dược liệu [121], [122].

Các thử nghiệm *in vivo* được tiến hành tại Viện Dược liệu Trung ương:

- Động vật thí nghiệm (ĐVTN): Chuột nhắt trắng chủng Swiss albino (cả đực và cái) của Viện Vệ Sinh dịch tễ Trung ương cung cấp; Chuột cống trắng Wistar (cả đực và cái) của Cơ sở cung cấp động vật thí nghiệm Đan Phượng, Hà Nội.

- Cân nặng: Chuột Swiss albino (21 ± 3 g); chuột Wistar (80 - 100 g).

- Điều kiện chăm sóc: Chuột được nuôi trong điều kiện chuồng thoáng mát, đảm bảo vệ sinh, nhiệt độ duy trì $24 \pm 1^\circ\text{C}$, ăn uống theo nhu cầu, chu kỳ sáng tối là 12/12 h (sáng từ 7:00 - 19:00).

2.2.4.2. Phương pháp nghiên cứu độc tính bán trường diễn của sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe trứng Cầu gai

Sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe trứng Cầu gai được đánh giá độc tính bán trường diễn *in vivo* theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới [121].

2.2.4.3. Phương pháp nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của thực phẩm bảo vệ sức khỏe Trứng Cầu gai

Tác dụng chống oxy hóa của thực phẩm bảo vệ sức khỏe Trứng Cầu gai được thực hiện theo phương pháp của Imanari và cộng sự [123]. Cơ sở của phương pháp là dựa trên đặc điểm của superoxide dismutase (SOD) là một trong những enzyme quan trọng trong việc loại bỏ gốc tự do, có hoạt tính chống oxy hóa. Trong cơ thể sinh vật,

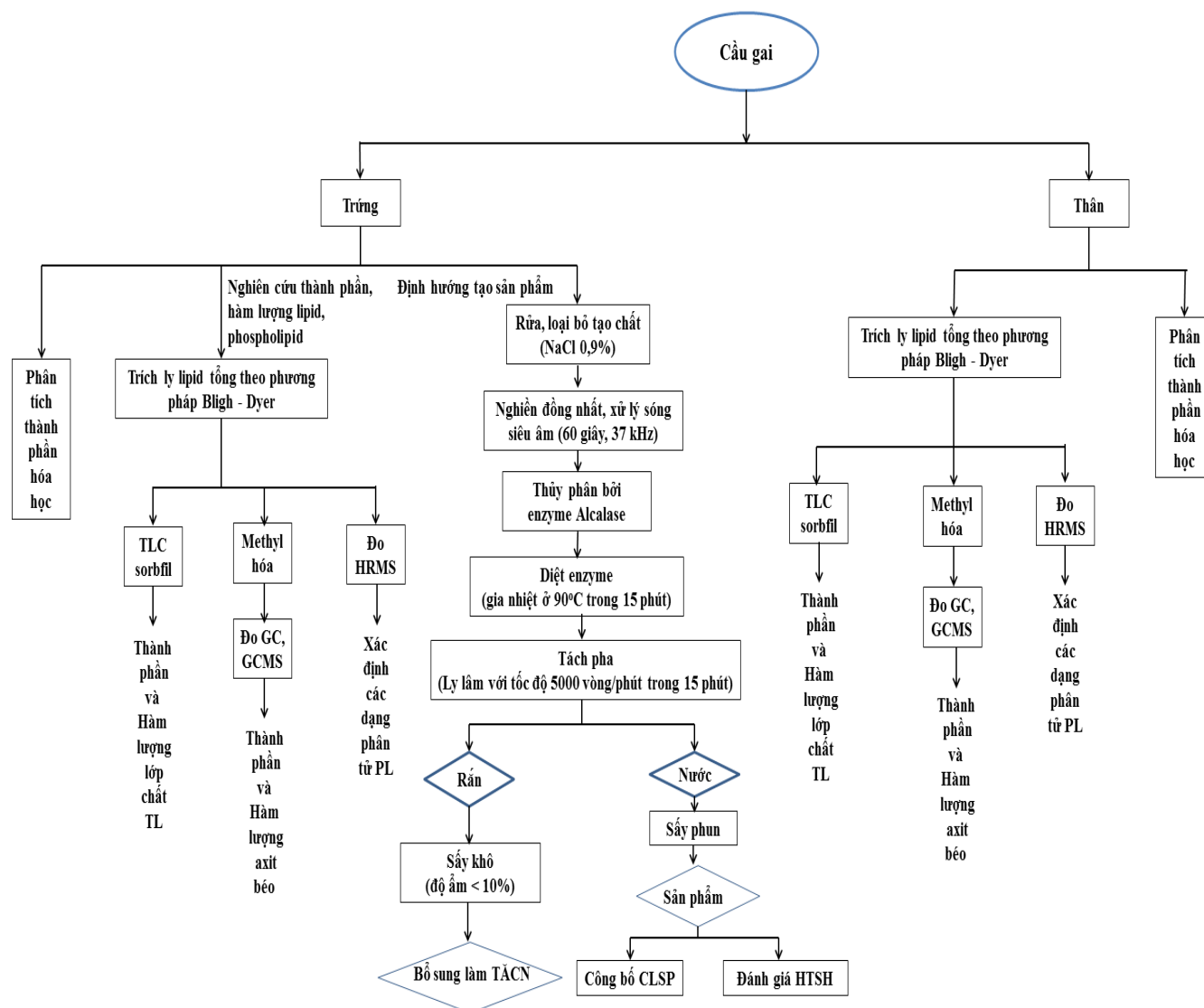
hoạt tính của enzyme SOD càng cao thì độ ức chế sinh ra superoxide anion càng cao, hay nói cách khác hoạt tính chống oxy hóa càng cao.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được tính toán trên máy tính bằng phần mềm excel 2013 và SPSS 20.0. Số liệu phân tích đơn yếu tố quá trình thủy phân được phân tích phương sai và so sánh cặp đôi các giá trị trung bình với mức $\alpha \leq 0,05$ bằng phần mềm SPSS (phiên bản 20). Phần mềm Design-Expert (phiên bản 7.1.5, Stat-Ease Inc., USA) được sử dụng để phân tích phương sai (ANOVA), tính toán hệ số của phương trình hồi quy và đề xuất giải pháp cho mô hình tối ưu hóa.

CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM

Quá trình thực nghiệm chung tiến hành theo sơ đồ Hình 3.1.



Hình 3.1. Sơ đồ thực nghiệm chung

3.1. Xác định thành phần hóa học của nguyên liệu trứng và thân Cầu gai vàng và Cầu gai đen

3.1.1. Xác định hàm lượng protein tổng số bằng phương pháp Kjeldahl

Trước khi cất đạm của mẫu phải kiểm tra thiết bị Kjeldahl bằng cách cất 14 ml dung dịch tiêu chuẩn amoni 0,05 mg N/ml với kiềm. Hàm lượng nitơ trong bình hứng được chuẩn độ vừa đủ hết 5 ml \pm 0,1 ml dung dịch 0,01N HCl tiêu chuẩn là đạt yêu cầu, nếu lượng HCl ít hơn là do thiết bị cất bị hở, nếu nhiều hơn có thể là do có kiềm từ bình cất hoặc do thiết bị không sạch, cần điều chỉnh.

Thí nghiệm được tiến hành gồm 3 bước:

Bước 1. Phân hủy mẫu: Cân $2 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ mẫu vào bình đốt đạm (không để dính mẫu ở cổ và thành bình). Thêm 1 g hỗn hợp xúc tác K_2SO_4 và CuSO_4 (tỉ lệ khối lượng 5:1), thêm 25 ml H_2SO_4 đặc. Chuẩn bị đồng thời hai mẫu trắng không có mẫu thử. Đặt hệ thống bình đốt đạm lên thiết bị đốt đạm, lắp hệ thống hút khí và bật tủ hút. Tăng dần nhiệt độ lên 200°C khoảng 120 phút, có khói trắng bay lên. Tiếp tục tăng dần nhiệt độ lên 400°C trong khoảng 60 phút đến khi dung dịch mẫu có màu xanh da trời và trong hoàn toàn. Để nguội, thêm từ từ 50 ml nước cất, đun sôi 10 phút. Chuyển sang bình định mức dung tích 200 ml , thêm nước cất đến vạch định mức, lắc đều, lọc hoặc để lắng trong.

Bước 2. Chung cất amoniac NH_3 : Lấy vào bình tam giác 250 ml một lượng dung dịch acid boric đã có hỗn hợp chỉ thị màu, lượng acid boric lấy phụ thuộc lượng nitơ trong bình cất (phải đảm bảo 1 mg nitơ ít nhất $0,5 \text{ ml}$ dung dịch acid boric bão hòa). Đặt bình hứng ngập dưới ống sinh hàn. Chuyển vào bình cất một lượng mẫu sau phân hủy có chứa $30 - 200 \text{ mg N}$, tráng phễu và dụng cụ đong bằng nước cất, dồn vào bình cất. Cho hệ thống làm lạnh hoạt động. Cho 50 ml dung dịch NaOH 40% qua phễu nhỏ rọt vào bình cất, giữ lại 1 ml trên phễu sau đó dùng khoảng 50 ml nước cất tráng phễu, và chuyển nước tráng vào bình cất giữ lại trên phễu 1 ml , khóa phễu và cho nước cất $1/2$ phễu. Tiến hành cất amoniac, điều chỉnh tốc độ sôi và tốc độ ngưng lạnh để nhiệt độ nước sau khi ngưng khoảng 35°C . Kết thúc quá trình cất khi hết amoniac (khi dung dịch ngưng khoảng 150 ml với lượng nitơ trong bình cất có dưới 100 mg N và 200 ml với lượng nitơ trong bình cất có nhiều hơn 100 mg N). Hạ thấp bình hứng, tia rửa đuôi ống sinh hàn vào bình hứng, để nguội.

Bước 3. Chuẩn độ Amoni tetraborat bằng dung dịch acid tiêu chuẩn HCl hoặc H_2SO_4 , lắc liên tục cho đến khi chuyển màu đột ngột từ xanh sang tím nhạt.

Hàm lượng nitơ theo phần trăm khối lượng được tính theo công thức:

$$\%N = \frac{(a - b) \times N \times 0,01401 \times 100}{m}$$

Trong đó: a) thể tích dung dịch acid tiêu chuẩn tiêu tốn quá trình chuẩn độ mẫu thử (ml); b) thể tích dung dịch acid tiêu chuẩn tiêu tốn trong quá trình chuẩn độ mẫu trắng (ml); N) nồng độ đương lượng acid tiêu chuẩn (N); 0,01401: mili đương lượng gam của nitơ (g); m) khối lượng mẫu tương ứng với thể tích dịch trích chung cất (g).

Xác định hàm lượng nitơ tổng số trong mẫu khô

Hàm lượng nitơ tổng số theo phần trăm khối lượng mẫu Cầu gai khô tính theo công thức: $\%N' = \%N \times K$. Trong đó: $\%N$ là hàm lượng nitơ theo phần trăm khối lượng tươi; K) hệ số khô kiệt, tính theo công thức: $K = KL \text{ mẫu tươi} / KL \text{ mẫu khô}$.

Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein thô (% P thô) tính bằng phần trăm theo công thức: $\%P = \%N' \times 6,25$. Trong đó: $\%N'$ là hàm lượng nitơ tổng số theo phần trăm khối lượng mẫu khô (%).

3.1.2. Xác định hàm lượng protein hòa tan

Trích ly protein hòa tan từ mẫu trứng Cầu gai: 0,5 g nguyên liệu trứng Cầu gai được đồng nhất hóa với 30 mL natri hydroxit (NaOH) 0,1 M trong natri clorua (NaCl) 3,5% bằng cách sử dụng thiết bị đồng hóa. Hỗn hợp đồng nhất này sau đó được ủ ở 60°C trong 90 phút, lọc qua màng lọc peptide có kích thước 10 kDa kết hợp ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C. Dịch trong sau đó được trữ đông lạnh ở - 20°C cho đến khi phân tích.

Hàm lượng protein hoà tan có trong mẫu Cầu gai nguyên liệu và dịch thủy phân trứng Cầu gai được phân tích bởi phương pháp Lowry cải tiến [114]. Phương pháp này dựa trên cơ sở phức chất đồng protein khử hỗn hợp Photphomolipden - Photphovonphramat (thuốc thử Folin - Ciocalteu) tạo phức chất màu xanh da trời có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 750 nm. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ protein. Dựa vào mức độ hấp thụ quang học của protein chuẩn, ta có thể xác định được hàm lượng protein trong mẫu nghiên cứu.

Hóa chất sử dụng: Dung dịch A: cân 4g NaOH và 20g Na₂CO₃ pha trong nước cất đạt thể tích 1000mL; Dung dịch B: cân 0,5g CuSO₄.5H₂O pha với Natri Xitrat (1%) hay Natri Kali Tactorat 1% đạt thể tích 100 mL; Dung dịch C: Hỗn hợp của hai dung dịch A và B theo tỉ lệ 49:1 (pha trước khi dùng); Thuốc thử Folin - Ciocalteu, Sigma-Aldrich 2N trước khi dùng pha loãng hai lần tới nồng độ 1N. Dung dịch gốc: Albumin huyết thanh bò 1%: Cân chính xác 0,1g (10mg Albumin huyết thanh bò) hoà tan trong nước cất và chuẩn thể tích tới 100ml.

Sau đó pha loãng dung dịch gốc (Albumin 0,1%) bằng nước cất với các nồng độ 50; 100; 150; 200; 250; 300 µg/mL để tiến hành xây dựng đồ thị chuẩn. Xác định mật độ quang của dãy dung dịch gốc tương tự như mẫu cần xác định protein nêu trên.

Mẫu đối chứng: 0,5 mL nước cất được cho vào ống nghiệm, bổ sung 2 mL dung dịch C sau đó tiến hành các bước tương tự như mẫu nghiên cứu. Thí nghiệm được lặp lại ba lần để có kết quả xây dựng đường hồi quy. Phương trình đường hồi quy mô tả sự liên hệ giữa nồng độ protein hòa tan và độ hấp thụ quang học. Xây dựng đường chuẩn với dung dịch protein chuẩn là Albumin của bò theo bảng sau để có được các dung dịch Albumin chuẩn có nồng độ protein từ 0 đến 300 $\mu\text{g/ml}$.

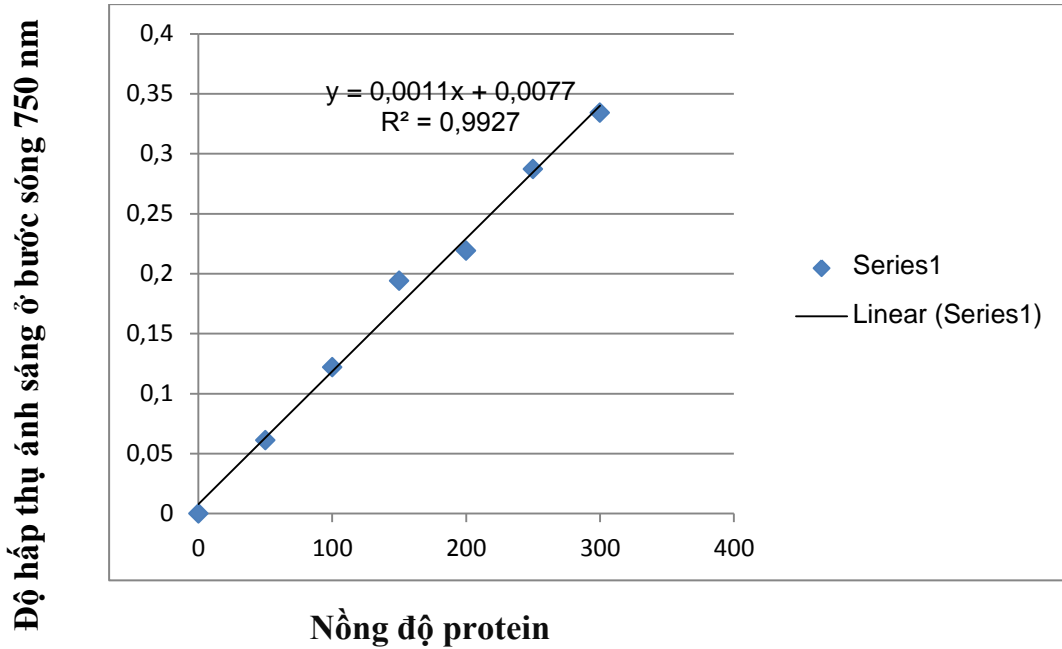
Bảng 3.1. Bố trí ống nghiệm xây dựng đường chuẩn với Albumin

Ống nghiệm số	0	1	2	3	4	5	6
Dung dịch gốc (ml)	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Nước cất (ml)	10	9,5	9,0	8,5	8,0	7,5	7,0
Nồng độ protein Albumin ($\mu\text{g/ml}$)	0	50	100	150	200	250	300

Tiến hành lấy chính xác 0,5 mL dịch chứa protein cho vào ống nghiệm, thêm vào đó 2 mL dung dịch C, lắc đều để yên trong 10 phút. Sau đó thêm vào hỗn hợp trong ống nghiệm 0,25 mL Folin 2N, phối trộn đều và giữ yên trong 30 phút, màu xanh da trời được hình thành sau màu vàng, tại đây cường độ màu đạt độ hấp thụ ánh sáng lớn nhất. Hỗn hợp dung dịch được đo mật độ quang ở bước sóng 750 nm. Lặp lại 3 lần đo và lấy giá trị trung bình. Với mẫu đối chứng làm tương tự.

Bảng 3.2. Giá trị OD thu được với các dung dịch chuẩn Albumin

Ống nghiệm số	0	1	2	3	4	5	6
Nồng độ protein Albumin ($\mu\text{g/ml}$)	0	50	100	150	200	250	300
Giá trị OD	0	0,061	0,122	0,194	0,219	0,287	3,334



Hình 3.2. Đường chuẩn sự liên hệ giữa nồng độ protein hòa tan và mật độ quang

Phương trình hồi quy tuyến tính mối quan hệ giữa nồng độ protein hòa tan và mật độ quang là $y = 0,0011x + 0,0077$ hay $x = (y - 0,0077)/0,0011$, với phương sai $R^2 = 0,9927$ là đáng tin cậy. Dựa vào phương trình đường chuẩn này có thể tính được hàm lượng protein hòa tan của mẫu Cầu gai cần phân tích, trong đó y là độ hấp thụ ánh sáng OD và x là nồng độ protein hòa tan.

+ Xác định hàm lượng protein hòa tan trong mẫu protein thủy phân.

Chuẩn bị mẫu phân tích gồm 0,5 ml dịch thủy phân đã lọc qua màng lọc peptide có kích thước dưới 10 kDa cho vào ống nghiệm, thêm vào đó 2 mL dung dịch C, lắc đều để yên trong 10 phút. Sau đó thêm vào hỗn hợp trong ống nghiệm 0,25 mL Folin 2N, phối trộn đều và giữ yên trong 30 phút, màu xanh da trời được hình thành sau màu vàng, tại đây cường độ màu đạt độ hấp thụ ánh sáng lớn nhất. Hỗn hợp dung dịch được đo mật độ quang ở bước sóng 750 nm. Lặp lại 3 lần đo và lấy giá trị trung bình. Với mẫu đối chứng làm tương tự.

Dựa vào đường chuẩn đã xác định suy ra nồng độ protein hòa tan có trong 1 ml mẫu phân tích.

Tính toán kết quả:

Hàm lượng protein hòa tan (P hòa tan):

$$P \text{ hòa tan} = \frac{(OD - 0,0077) \cdot 100 \cdot 100}{0,0011 \cdot 1000 \cdot m} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right)$$

Trong đó: 100: Thể tích dịch thủy phân sau khi định mức.

100: Hệ số pha loãng.

1000: Hệ số qui đổi từ μg thành mg .

m: khối lượng mẫu đem thủy phân.

3.1.3. Xác định hàm lượng tro tổng số

Cân 5 g mẫu Cầu gai cân phân tích vào chén nung. Đốt từ từ mẫu thử trên bếp điện có lót lưới amiang cho đến khi biến hoàn toàn thành than đen (khi đốt không được để mẫu thử cháy thành ngọn lửa). Cho chén than mẫu thử vào lò nung, nâng nhiệt độ từ từ cho đến $500 - 550^{\circ}\text{C}$ và giữ ở nhiệt độ đó trong khoảng 6 - 7 giờ để mẫu phân tích biến thành tro trắng. Tắt điện lò nung, chờ cho nhiệt độ hạ bớt, lấy chén tro ra, cho vào bình hút ẩm, để nguội 30 phút, cân khối lượng. Tiếp tục nung ở nhiệt độ trên trong 30 phút, để nguội và cân. Tiến hành nung và cân cho đến khi khối lượng giữa hai lần cân liên tiếp chênh lệch nhau không quá 0,001 g.

Hàm lượng tro tổng số (X) tính bằng phần trăm, theo công thức:

$$X = \frac{(G_1 - G) \times 100}{m} (\%)$$

Trong đó: G: Khối lượng chén nung (g); G_1 : Khối lượng chén nung + tro tổng số (g); m: Khối lượng mẫu thử, tính bằng (g); 100: Hệ số tính ra phần trăm.

3.1.4. Xác định hàm lượng nước

Cân 5 g mẫu thử vào chén cân, trộn đều mẫu thử, dàn thành lớp mỏng, sấy ở 150°C . Sau khi sấy, cho vào bình hút ẩm, để nguội, đem cân. Tiến hành sấy và cân cho đến khi khối lượng giữa hai lần cân liên tiếp chênh lệch nhau không quá 0,001g.

Hàm lượng nước (W) tính bằng phần trăm theo công thức:

$$W = \frac{(G_1 - G_2) \times 100}{m} (\%)$$

Trong đó: G_1 là khối lượng chén cân + nắp chén + đĩa thủy tinh + mẫu phân tích trước sấy (g); G_2 là khối lượng chén cân + nắp chén + đĩa thủy tinh + mẫu phân tích sau sấy (g); m: Khối lượng mẫu phân tích, tính bằng g; 100: Hệ số tính ra phần trăm. W là hàm lượng nước trong mẫu (%).

3.1.5. Xác định thành phần và hàm lượng acid amin

Nguyên lý

Acid amin được tách ra khỏi trứng Cầu gai bằng phương pháp thủy phân với HCl 6N trong môi trường khí trơ ở 125°C trong 24 giờ. Sau khi thủy phân, trung hòa với NaOH 4N đến trung tính, pha loãng thích hợp, dẫn xuất với thuốc thử OPA để

tạo sản phẩm phát huỳnh quang và định lượng bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao với detector

Điều kiện chạy máy

Chương trình gradient cho pha động

Bảng 3.3. Chương trình gradient cho pha động HPLC

Thời gian (phút)	% acetat – phosphat	% acetonitril	% H₂O
Nền	100	0	0
0,5	99	1	0
18,0	95	5	0
19,0	91	9	0
29,5	83	17	0
33,0	0	60	40
36,0	100	0	0

- Hệ thống sắc kí lỏng hiệu năng cao với detector RF HITACHI

- Cột sắc kí: C18, 250 mm - RESTEX

- Cột tách C 18 (250mm × 4,6 mm × 3,9 μm)

- Nhiệt độ buồng cột 37⁰C

- Tốc độ dòng 1 ml/phút

- Thể tích bơm mẫu 20μl

- Detector RF (λ_{ex} = 250; λ_{em} = 395)

- Thành phần pha động (Kênh A: đệm acetat-phosphat pH = 5,05; Kênh B: acetonitril; Kênh C: nước cất tinh khiết)

Tính toán kết quả

Tính kết quả acid amin có trong mẫu theo công thức sau:

$$X = (C \times V \times F)/m$$

Trong đó:

X : hàm lượng acid amin có trong mẫu (μg/g hoặc μg/ml)

C : nồng độ acid amin tính từ đường chuẩn (μg/ml)

V : thể tích định mức (ml)

F : hệ số pha loãng

M : khối lượng cân (m)

Kiểm soát chất lượng

Phân tích 2 lần song song không được lệch quá 10% so với giá trị trung bình.

3.2. Chiết tách lipid tổng và xác định thành phần của lipid tổng

3.2.1. Chiết tách lipid tổng

Mẫu Cầu gai tươi sau khi thu xong, đóng thùng chuyển ngay về Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên bằng đường hàng không. Sau đó, mẫu được rửa sạch, bỏ đôi và tách lấy phần trứng và thân. Mẫu thân ở đây bao gồm toàn bộ phần thịt trong thân Cầu gai, dịch thân Cầu gai và vỏ Cầu gai. Mẫu (1kg) được xay nhỏ bổ sung hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ tỉ lệ 1:2 theo thể tích (3 lit), siêu âm trong thời gian 120 phút. Phần dịch chiết được lọc ra, sau đó chiết lại 2 lần bằng dung môi CH_2Cl_2 (2×3 lit), siêu âm 120 phút. Toàn bộ dịch chiết được bổ sung 3 lit H_2O để phân lớp. Lớp lipid được làm khan bằng Na_2SO_4 trong 3h, lọc bỏ muối, đem cô cạn dung môi thu được dịch cô lipid tổng (TL). TL được hòa tan trong CHCl_3 và được bảo quản ở nhiệt độ -18°C để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2. Xác định thành phần và hàm lượng các lớp chất lipid trong lipid tổng

TL được chấm lên TLC Sorbfil (6 cm \times 6 cm, Sorbfil, Krasnodar, LB Nga) 3 vệt lipid tổng với lượng tương ứng 5 μl ; 10 μl , 15 μl chạy trong hệ dung môi n-hexan/diethyl ete/acid acetic (70:30:1, v:v:v) với toàn bộ bản mỏng và chạy chấm chân bằng hệ dung môi $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1, v:v). Bản mỏng được hiện màu bằng $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 5%, sau đó sấy bản mỏng ở nhiệt độ 240°C đến khi lớp chất hiện màu hoàn toàn trong khoảng thời gian 10 phút, scan trên máy Epson Perfection 2400 PHOTO (Nagano, Nhật Bản). Thành phần các lớp chất lipid được xác định bằng cách so sánh với chất chuẩn. Hàm lượng các lớp chất lipid và PL được xác định dựa trên sự đo diện tích và cường độ màu trong chương trình phân tích hình ảnh Sorbfil TLC Video densitometer, Krasnodar, LB Nga [62] [124] [125].

3.2.3. Xác định thành phần acid béo của lipid tổng

Mẫu lipid tổng cần phân tích thành phần acid béo (10mg) được thổi khô dung môi, bổ sung 2 ml $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ 2%, lắc kỹ, để ở nhiệt độ 80°C trong vòng 2h, để nguội tới nhiệt độ phòng, bổ sung thêm 1 ml H_2O và 2 ml n-hexane, để phân lớp, hút lớp phía trên, làm khan bằng Na_2SO_4 , lọc bỏ muối và cất loại dung môi. Hỗn hợp thu được hòa tan trong n-hexane, tinh sạch hỗn hợp methyl ester của acid béo trên bản mỏng điều chế với hệ dung môi n-hexane: Et_2O (90:10, v:v), cắt rìa bản mỏng, phun thuốc thử $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ 5% để phát hiện vệt chất, ghép lại bản mỏng như cũ để phát hiện vùng chất, cạo phân silica gel có chất, rửa hấp phụ bằng hỗn hợp dung môi n-

hexane:Et₂O (80:20, v:v), cô quay loại bỏ dung môi. Hỗn hợp methyl ester của acid béo được hòa tan trong n-hexane và phân tích trên máy GC và sắc ký khí kết nối khối phổ GC-MS, sử dụng thư viện phổ chuẩn NIST để so sánh.

Máy sắc ký khí (GC) hãng Shimadzu (Kyoto, Nhật Bản) với detector ion, cột Supercowas 10 (Supelco, Bellefonte, PA, USA), kích thước cột 30m × 0,25mm ID. Khí mang He với tốc độ 30 cm/s.

Máy sắc ký khí kết nối khối phổ (GCMS) hãng Shimadzu GCMS QP5050A (Kyoto, Nhật Bản), cột sắc ký MND 5s (Supelco, Bellefonte, PA, USA), với kích thước cột 30m × 0,25mm ID. Khí mang He với tốc độ 30 cm/s.

3.3. Phân lập và nhận dạng các phospholipid

3.3.1. Phân lập các phospholipid

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn 60 F₂₅₄ (Merck). Phát hiện chất dưới đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm bản mỏng Sorbfil PTLC AF-V (10 cm × 10 cm Sorbfil, Krasnodar, LB Nga). TLC chạy trong hệ dung môi CHCl₃:CH₃OH:NH₃:C₆H₆, 65:30:5:10 (v:v:v:v), phát hiện chất bằng các thuốc thử dung dịch axit H₂SO₄/EtOH 10% được phun đều trên bản mỏng, sấy khô rồi hơ nóng trên bếp điện đến khi hiện màu. Đối với sắc ký lớp mỏng điều chế, phát hiện vết chất bằng cách cắt rìa bản mỏng để phun thuốc thử hơ nóng ở nhiệt độ thích hợp để phát hiện vết chất, ghép lại bản mỏng như cũ để xác định vùng chất, sau đó cạo lớp Silica gel có chất, giải hấp phụ bằng dung môi thích hợp.

3.3.2. Nhận dạng các phospholipid

Sắc ký khí và sắc ký khí khối phổ

Máy sắc ký khí (GC) hãng Shimadzu (Kyoto, Nhật Bản) với detector ion hóa ngọn lửa, cột Supercowax 10 (Supelco, Bellefonte, PA, USA), kích thước cột 30m x 0,25mm ID. Khí mang He với tốc độ 30 cm/s. Chương trình nhiệt độ: nhiệt độ 155 - 220°C (1,5 °C/phút), tốc độ: 10°C/ phút, 260°C/5 phút; Split: 1:50; injector 250°C.

Máy sắc ký khí kết nối khối phổ (GC-MS) hãng Shimadzu GC/MS QP5050A (Kyoto, Nhật Bản), cột sắc ký MND 5s (Supelco, Bellefonte, PA, USA) với kích thước cột 30m x 0,25 mm ID. Khí mang He với tốc độ khí là 30 cm/s. Chương trình nhiệt độ: nhiệt độ 155-220°C (1,5°C/min), tốc độ 10°C/ phút, 260°C/5 phút; Split: 1:50; injector 250°C.

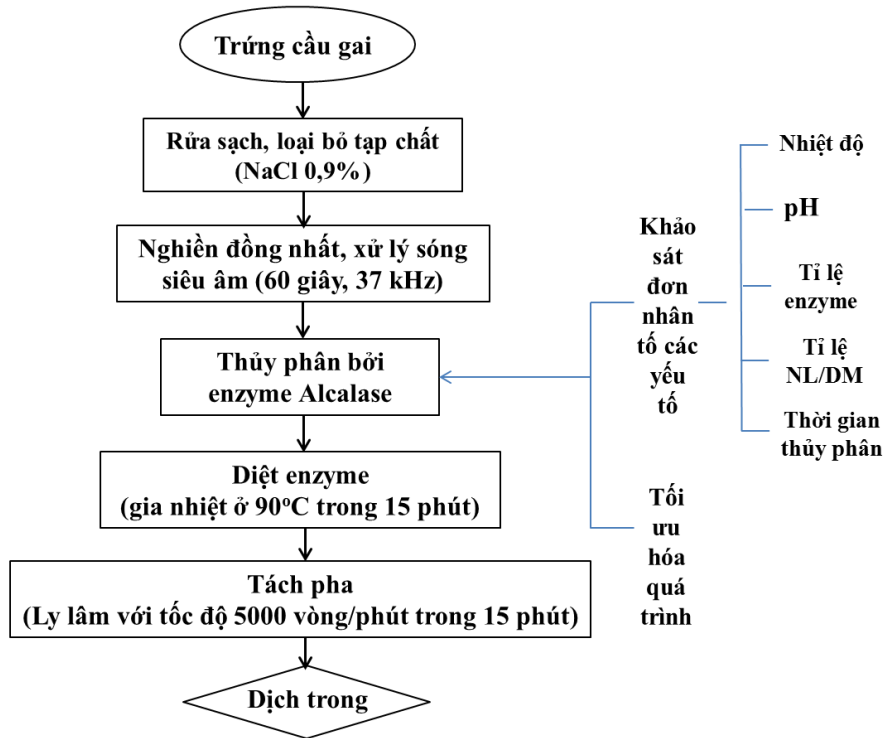
Sắc kí khối phổ hiệu năng cao

Các mẫu TL và các phân đoạn PE, PC, CAEP, PI, LPC, PS sau khi phân lập hàm lượng từ 1 - 10 mg/ml trong MeOH được tiến hành phân tích dạng phân tử trên thiết bị LCMS-IT-TOF. Sau khi bơm, các mẫu được phân lập bằng HPLC (hãng Shimadzu Prominence) sử dụng hai hỗn hợp dung môi A hexan:2-propanol:CH₃COOH:N(CH₃)₃ 82:17:1:0,08 (theo thể tích) và hỗn hợp dung môi B (propanol-2):H₂O:CH₃COOH:N(CH₃)₃ 85:14:1:0,08 (theo thể tích). Chương trình phân lập được thiết lập theo chế độ gradient bắt đầu từ 5% hỗn hợp B, sau đó phần trăm của B được tăng lên 80% trong 25 phút. Hỗn hợp đó được duy trì trong 1 phút trước khi quay trở lại 5% hỗn hợp dung môi B trong 10 phút và duy trì ở nồng độ đó 4 phút. Tổng thời gian chạy mẫu là 40 phút. HPLC được trang bị hai bộ bơm LC-20AD, mô-đun tạo hình áp suất cao, lò nung cột CTO-20A, máy lấy mẫu tự động SIL-20A, bộ nhận tín hiệu CBM-20A, bộ khử khí DGU-20A3 và cột diol Shim-Pack (ID 50 mm 4,6 mm, kích thước hạt 5 µm) (Shimadzu, Kyoto, Nhật Bản). Lipid được phát hiện bằng bẫy ion có độ phân giải cao kết hợp thời gian của phép đo phổ khối bay của thiết bị Shimadzu LCMS-IT-TOF (Kyoto, Nhật Bản) hoạt động ở cả chế độ ion dương và âm trong mỗi phân tích ở điều kiện ion hóa điện hóa (ESI). Nhiệt độ nguồn ion là 200°C, phạm vi phát hiện là m/z 100 - 1200 và thế năng trong nguồn ion lần lượt là 3,5 và 4,5 kV đối với chế độ âm và dương. Áp suất khí N₂ là 200 kPa. Lưu lượng khí của máy phun sương là 1,5l / phút.

Các dạng phân tử của từng phân lớp PL được phát hiện bởi HRMS và xác định bằng việc so sánh với bộ phổ chất chuẩn của hãng Shimadzu Solution với phần mềm xử lý V.3.60.361. Quá trình định lượng các loại phân tử của mỗi lớp chất lipid phân cực được tính toán theo diện tích mỗi pic chất thu được trên phổ ion âm (MS⁻, MS/MS⁻, MS/MS/MS⁻) và ion dương (MS⁺, MS/MS⁺).

3.4. Thủy phân protein từ trứng Cầu gai

3.4.1. Sơ đồ quy trình thực nghiệm thủy phân trứng Cầu gai



Hình 3.3. Sơ đồ thực nghiệm nghiên cứu quá trình thủy phân trứng Cầu gai

Trứng Cầu gai (đen và vàng) được rửa lần 1 với nước cất và lần 2 với dung dịch NaCl 0,9% để loại bỏ tạp chất. Nguyên liệu được phân tích hàm lượng protein hòa tan ban đầu có trong nguyên liệu tươi. Sau đó 50g trứng Cầu gai được nghiền nhỏ, xử lý sóng siêu âm trong thời gian 60 giây, cường độ siêu âm 37 kHz, sau đó khối dịch được gia nhiệt ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 15 phút để loại bỏ vi sinh vật bất lợi và giúp cho một số protein cao phân tử, lipid được cắt mạch, hỗ trợ cho quá trình thủy phân tiếp theo. Mẫu sau đó được thủy phân trong môi trường nước ở các tỷ lệ nguyên liệu/nước thay đổi lần lượt là: 1:0,5, 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:2,5 (w/v), trong các khoảng tỉ lệ enzyme Alcalase bổ sung là 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5% (w/v) với thời gian thủy phân trong các khoảng: 5; 5,5; 6; 6,5 và 7 giờ. Nhiệt độ thủy phân được nghiên cứu ở các khoảng: 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C. pH của dịch thủy phân được nghiên cứu với các mốc: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0. Dịch protein sẽ được khuấy đều bởi cánh khuấy tự động của thiết bị thủy phân. Kết thúc quá trình thủy phân, toàn bộ dịch thủy phân được gia nhiệt ở 90°C trong thời gian 15 phút để vô hoạt enzyme. Để tìm phương án tối ưu, phương pháp quy hoạch bậc hai Box - Behnken được sử dụng, tối ưu 3 yếu tố với 17 thí nghiệm trong đó có 5 thí nghiệm lặp tại kết quả tốt nhất từng đơn yếu tố.

Dịch protein thủy phân được lọc qua màng lọc có kích thước 10 kDa, trước khi được phân tích hàm lượng bằng phương pháp Lowry. Số liệu phân tích đơn yếu tố quá trình thủy phân được phân tích phương sai và so sánh cặp đôi các giá trị trung bình với mức $\alpha \leq 0,05$ bằng phần mềm SPSS (Version 20). Phần mềm Design-Expert (phiên bản 7.1.5, Stat-Ease Inc., USA) được sử dụng để phân tích phương sai (ANOVA), tính toán hệ số của phương trình hồi quy và đề xuất giải pháp cho mô hình tối ưu hóa.

3.4.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của các đơn nhân tố tới quá trình thủy phân trứng Cầu gai

3.4.2.1. Nghiên cứu lựa chọn tỉ lệ nguyên liệu/nước cho quá trình thủy phân trứng Cầu gai bằng enzyme Alcalase

Mẫu trứng Cầu gai (50 gam) được bổ sung nước với tỷ lệ nguyên liệu/nước thay đổi lần lượt là: 1:0,5, 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:2,5 (w/v); nghiền nhỏ và siêu âm trong thời gian 60 giây, tần số siêu âm: 37 KHZ, bổ sung 1% enzyme Alcalase theo khối lượng tươi nguyên liệu, pH 6,5; thủy phân ở điều kiện nhiệt độ 45°C. Khuấy đều trong suốt quá trình thủy phân. Sau thủy phân trong 5h, đem mẫu đi bất hoạt enzyme, dịch thu được định mức trong bình 100 ml. Hàm lượng protein hòa tan được xác định bằng phương pháp Lowry.

3.4.2.2. Nghiên cứu lựa chọn tỉ lệ enzyme Alcalase bổ sung thích hợp cho quá trình thủy phân trứng Cầu gai

Mẫu trứng Cầu gai (50 gam) được bổ sung nước với tỷ lệ nguyên liệu/nước chọn được từ mục 3.4.2.1; nghiền nhỏ và siêu âm trong thời gian 60 giây, tần số siêu âm 37 KHZ, bổ sung enzyme Alcalase theo khối lượng tươi nguyên liệu theo tỉ lệ lần lượt là 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% (v/w), pH 6,5; thủy phân ở điều kiện nhiệt độ 45°C. Khuấy đều trong suốt quá trình thủy phân. Sau thủy phân trong 5h, đem mẫu đi bất hoạt enzyme, dịch thu được định mức trong bình 100 ml. Hàm lượng protein hòa tan được xác định bằng phương pháp Lowry.

3.4.2.3. Nghiên cứu lựa chọn pH thủy phân trứng Cầu gai bằng enzyme Alcalase

Mẫu trứng Cầu gai (50 gam) được bổ sung nước với tỷ lệ nguyên liệu/nước chọn được từ mục 3.4.2.1; nghiền nhỏ và siêu âm trong thời gian 60 giây, tần số siêu âm: 37 KHZ, bổ sung enzyme Alcalase theo khối lượng tươi nguyên liệu theo tỉ lệ được lựa chọn từ mục 3.4.2.2, thay đổi pH của dịch thủy phân tương ứng với các giá trị 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0; thủy phân ở điều kiện nhiệt độ 45°C. Khuấy đều trong suốt quá trình thủy phân. Sau thủy phân trong 5h, đem mẫu đi bất hoạt enzyme, dịch thu được định

mức trong bình 100 ml. Hàm lượng protein hòa tan được xác định bằng phương pháp Lowry.

3.4.2.4. Nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ thủy phân trứng Cầu gai bằng enzyme Alcalase

Mẫu trứng Cầu gai (50 gam) được bổ sung nước với tỷ lệ nguyên liệu/nước được lựa chọn từ mục 3.4.2.1; nghiền nhỏ và siêu âm trong thời gian 60 giây, tần số siêu âm: 37 KHZ, bổ sung enzyme Alcalase theo tỉ lệ được lựa chọn từ mục 3.4.2.2, pH tối ưu được lựa chọn từ mục 3.4.2.3; thủy phân ở điều kiện nhiệt độ 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C. Khuấy đều trong suốt quá trình thủy phân. Sau thủy phân trong 5h, đem mẫu đi bất hoạt enzyme, dịch thu được định mức trong bình 100 ml. Hàm lượng protein hòa tan được xác định bằng phương pháp Lowry.

3.4.2.5. Nghiên cứu lựa chọn thời gian thủy phân trứng Cầu gai bằng enzyme Alcalase

Mẫu trứng Cầu gai (50 gam) được bổ sung nước với tỷ lệ nguyên liệu/nước chọn được từ mục 3.4.2.1; nghiền nhỏ và siêu âm trong 60 giây, tần số siêu âm 37 KHZ, bổ sung enzyme Alcalase theo khối lượng tươi nguyên liệu theo tỉ lệ được chọn từ mục 3.4.2.2; pH được lựa chọn từ mục 3.4.2.3; thủy phân ở điều kiện nhiệt độ đã được chọn từ mục 3.4.2.4. Thời gian thủy phân được khảo sát trong các khoảng: 5; 5,5; 6; 6,5 và 7 giờ. Khuấy đều trong suốt quá trình thủy phân. Sau thủy phân, đem mẫu đi bất hoạt enzyme, dịch thu được định mức trong bình 100 ml. Hàm lượng protein hòa tan được xác định bằng phương pháp Lowry.

3.4.3. Tối ưu hóa quá trình thủy phân trứng Cầu gai

Qua các khảo sát các yếu tố đơn nhân tố ở trên, tiến hành đánh giá 03 thông số công nghệ ảnh hưởng lớn nhất đến quá trình thủy phân trứng Cầu gai bằng enzyme Alcalase: Tỉ lệ enzyme (X_1 , °C), Tỉ lệ nguyên liệu/nước (X_2 , s), thời gian thủy phân (X_3). Hàm mục tiêu là hàm lượng protein hòa tan (Y , mg/g).

Sử dụng phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box-Behnken với ba biến ba cấp độ. Các số liệu thu được từ hàm lượng protein hoà tan được xử lý trên phần mềm Design-Expert 7.0 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, USA) ANOVA được dùng để đánh giá sản phẩm thủy phân thu được. Tiến hành giải bài toán tối ưu theo phương pháp “hàm mong đợi”. Sử dụng phần mềm Design-Expert 7.0 để tiến hành tối ưu hóa nhằm xác định được giá trị của ba yếu tố mà tại đó hàm lượng protein hòa tan là cao nhất.

Bảng 3.4. Các mức của thí nghiệm tối ưu hóa quá trình thủy phân

Biến chữ	Yếu tố	Đơn vị	Mức -1	Mức +1
A	Tỉ lệ enzyme	%	0,5	1,5
B	Tỉ lệ nguyên liệu/nước	w/v	1/0,5	1/1,5
C	Thời gian thủy phân	Giờ	5,5	6,5

Ma trận kế hoạch thực nghiệm với 17 thí nghiệm bao gồm 5 thí nghiệm ở tâm, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Bảng 3.5. Bố trí 17 thí nghiệm tối ưu hóa

Thí nghiệm	Tỉ lệ enzyme (%)	Tỉ lệ nguyên liệu/nước (w/v)	Thời gian thủy phân (giờ)	Hàm lượng protein hoà tan (mg/g) của Cầu gai đen	Hàm lượng protein hoà tan (mg/g) của Cầu gai vàng
1	0,50	0,50	6,00	89,90	53,03
2	1,50	0,50	6,00	126,09	135,14
3	0,50	1,50	6,00	43,33	46,44
4	1,50	1,50	6,00	149,95	160,72
5	0,50	1,00	5,50	30,23	32,40
6	1,50	1,00	5,50	44,04	47,20
7	0,50	1,00	6,50	42,69	45,76
8	1,50	1,00	6,50	192,09	205,88
9	1,00	0,50	5,50	20,75	22,24
10	1,00	1,50	5,50	36,94	39,59
11	1,00	0,50	6,50	125,05	137,24
12	1,00	1,50	6,50	101,20	108,47
13	1,00	1,00	6,00	209,87	224,94
14	1,00	1,00	6,00	204,81	219,52
15	1,00	1,00	6,00	203,11	217,70
16	1,00	1,00	6,00	197,55	211,74
17	1,00	1,00	6,00	200,35	214,74

Đánh giá mô hình chúng tôi sử dụng phân tích ANOVA và đưa ra hàm mục tiêu cho quá trình tối ưu hóa.

3.5. *Đánh giá hoạt tính sinh học của sản phẩm protein thủy phân*

3.5.1. *Độc tính cấp*

Số lượng 60 chuột nhắt trắng (bị bỏ đói hoàn toàn 16 giờ trước khi được uống mẫu) được chia làm 6 lô nghiên cứu độc tính cấp của TBBVSH trứng Cầu gai:

- **Lô 1 (n=10):** Uống chế phẩm liều 5 g/kg trọng lượng cơ thể
- **Lô 2 (n=10):** Uống chế phẩm liều 6 g/kg trọng lượng cơ thể
- **Lô 3 (n=10):** Uống chế phẩm liều 7 g/kg trọng lượng cơ thể
- **Lô 4 (n=10):** Uống chế phẩm liều 8 g/kg trọng lượng cơ thể
- **Lô 5 (n=10):** Uống chế phẩm liều 9g/kg trọng lượng cơ thể
- **Lô 6 (n=10):** Uống chế phẩm liều 10 g/kg trọng lượng cơ thể

Tiến hành theo sơ đồ nghiên cứu:

Ngày 0	Ngày 1	Ngày 3
Cân chuột	Uống TPBVSK trứng Cầu gai	
	Theo dõi và ghi nhận cử động tổng quát, biểu hiện về hành vi, ăn uống và số lượng chết	
	Cân xác định khối lượng	

3.5.2. *Đánh giá độc tính bán trường diễn của sản phẩm TPBVSK trứng Cầu gai*

Căn cứ vào kết quả thử nghiệm độc tính cấp trên cho thấy sản phẩm thuộc nhóm không có độc cấp với liều thử cao nhất là 10 g/kg. Do đó, trong thử nghiệm độc tính bán trường diễn chọn LD₀ là 10g/kg.

Thí nghiệm được thực hiện với hai đối tượng thí nghiệm là thỏ và chuột.

Với thỏ, nghiên cứu ảnh hưởng của TPBVSK trứng Cầu gai tới thể trọng thỏ tiến hành với 4 lô động vật thí nghiệm, lô đối chứng (thỏ chỉ uống nước); lô 1 thỏ được sử dụng sản phẩm TPBVSK trứng Cầu gai với liều lượng 100 mg/kg/ngày; lô số 2 với liều lượng 300 mg/kg/ngày và lô số 3 với liều lượng 500 mg/kg/ngày. Theo dõi thể trọng của thỏ từ trước lúc thí nghiệm, sau 2 tuần và sau 4 tuần dùng sản phẩm.

Cũng với các lô động vật thí nghiệm này, sau 4 tuần sẽ lấy máu, thu huyết thanh và phân tích các chỉ tiêu huyết học trong máu thỏ gồm: Số lượng bạch cầu, số lượng hồng cầu, nồng độ hemoglobin, chỉ số hematocrit (HCT), chỉ số thể tích trung bình hồng cầu (MCV). Sau đó đánh giá chức năng gan thận của nhóm thỏ thí nghiệm này thông qua các chỉ tiêu AST; ALT; creatinin. Sau 4 tuần nuôi, 4 lô thỏ thí nghiệm sẽ được mổ giải phẫu cơ quan nội tạng gồm gan, thận và lách và quan sát hình thái.

Đối với đối tượng thí nghiệm là chuột, biểu hiện bên ngoài, sự tăng trọng và các chỉ tiêu huyết học của chuột cũng được quan sát tương tự.

CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

Hàm lượng nước, tro tổng số, lipid tổng số, protein tổng số, protein hòa tan của mẫu thân và trứng Cầu gai vàng và Cầu gai đen đã được phân tích, kết quả thể hiện ở bảng 4.1.

Bảng 4.1. Kết quả phân tích thành phần hóa học của thân và trứng Cầu gai

STT	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

Kết quả Bảng 4.1 cho thấy, mẫu trứng và thân của Cầu gai vàng và Cầu gai đen đều có hàm lượng nước cao, với mẫu trứng đều trên 75% và mẫu thân vỏ đều cao hơn 68%. So sánh giữa Cầu gai đen và Cầu gai vàng thì hàm lượng nước có trong mẫu Cầu gai đen đều cao hơn trong Cầu gai vàng. So sánh với công trình nghiên cứu về thành phần hóa học của Cầu gai vàng thu thập tại tỉnh Phú Yên của Nguyễn Xuân Duy (2011) thì hàm lượng nước có trong trứng Cầu gai vàng nghiên cứu cũng không chênh lệch đáng kể (78% so với 75%) [126]. Tuy nhiên kết quả về hàm lượng nước trong mẫu thân và trứng Cầu gai vàng thu thập tại Nha Trang lại thấp hơn đáng kể so với cũng loài Cầu gai này trong nghiên cứu về sự biến đổi thành phần hóa học của trứng Cầu gai vàng trong công trình nghiên cứu của Yu-Chun Chen năm 2013. Trong nghiên cứu của Yu-Chun Chen về sự biến đổi hàm lượng nước trong trứng Cầu gai

vàng theo mùa là không đáng kể và đều trên 82% [127]. Kết quả nghiên cứu hàm lượng nước có trong mẫu trứng Cầu gai đen và Cầu gai vàng tương tự như trong báo cáo của Archana & Babu (2016) về hai loài Cầu gai *Stomopneustes variolaris* and *Paracentrotus lividus* [36].

Hàm lượng tro có trong trứng của hai mẫu Cầu gai nghiên cứu không chênh lệch đáng kể, và cao hơn so với nghiên cứu về mẫu Cầu gai vàng thu thập tại Phú Yên của Nguyễn Xuân Duy [126]. Tuy nhiên kết quả này lại thấp hơn khá nhiều so với nghiên cứu hàm lượng tro của hai loài Cầu gai *Stomopneustes variolaris* and *Paracentrotus lividus* của [36], với hàm lượng tro tổng số là 3,76 và 2,25 % tương ứng. Hàm lượng tro tổng số trong mẫu thân của cả hai loài Cầu gai đều cao hơn vượt trội so với mẫu trứng, điều này có thể giải thích là do các nguyên tố khoáng có trong lớp vỏ Cầu gai.

Lipid tổng thu được của Cầu gai vàng và Cầu gai đen có màu vàng đậm, không mùi. Kết quả cho thấy hàm lượng chất béo trong trứng Cầu gai phong phú hơn nhiều so với trong dịch khoang cơ thể Cầu gai. Hàm lượng lipid có trong trứng Cầu gai đen cao hơn trong mẫu thân gần 2,5 lần, tỉ lệ này là 3,34 lần đối với mẫu Cầu gai vàng. Hàm lượng lipid tổng số trong trứng Cầu gai thường nằm trong khoảng 2,37 - 6,1 % [128] [129] và thường có giá trị cao nhất vào mùa xuân và thấp nhất vào mùa đông. Với mẫu trứng Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* và Cầu gai đen *Diadema savignyi* nghiên cứu được thu thập vào mùa thu (11/2016), hàm lượng lipid của mẫu trứng và thân Cầu gai nằm ở mức thấp, tương ứng $4,41 \pm 0,03$ và $3,18 \pm 0,02$ %, kết quả này cũng tương tự với những nghiên cứu trước đó về một số loài Cầu gai khác cùng chi *Diadema* [36] [130]. Hàm lượng chất béo có trong mẫu Cầu gai vàng nghiên cứu (4,41%) cao hơn đáng kể so với cùng loài Cầu gai này được nghiên cứu với Nguyễn Xuân Duy (3,2%), nhưng lại tương đương với kết quả nghiên cứu về thành phần chất béo của một số loài Cầu gai khác [36].

Protein tổng số của mẫu trứng của cả Cầu gai vàng và Cầu gai đen đều tương đối cao và tương đồng khi so sánh với một số nghiên cứu khác [126] [36] [131], đều dao động trong khoảng từ 11 - 12% (so với trọng lượng mẫu tươi). Tuy nhiên trong mẫu dịch thân và vỏ Cầu gai thì hàm lượng protein tổng số lại thấp hơn nhiều so với mẫu trứng, chỉ bằng khoảng 1/3 hàm lượng protein tổng số của mẫu trứng. Chính vì

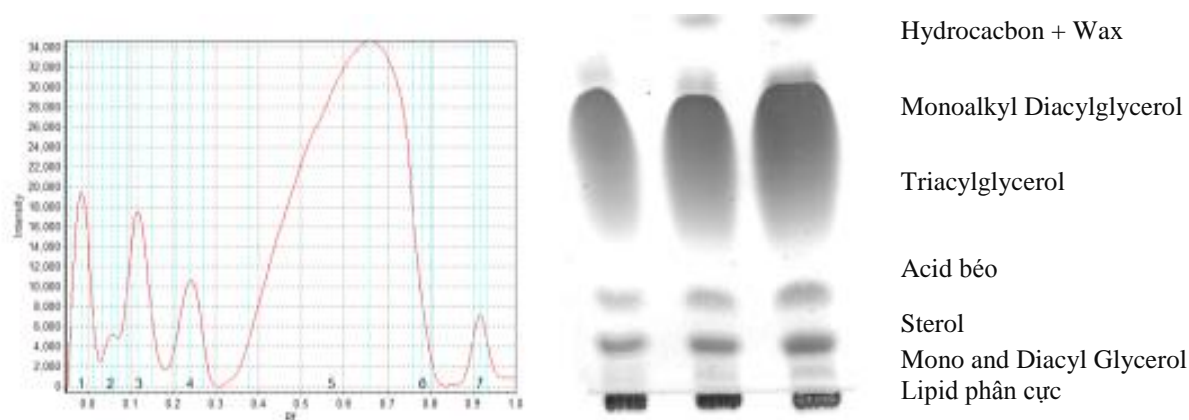
vậy xét về góc độ dinh dưỡng, thành phần đạm, hay chất béo của Cầu gai chủ yếu nằm trong trứng thay vì trong thành phần cơ thịt, dịch trong khoang vỏ Cầu gai.

Hàm lượng protein hòa tan trong cơ thể của Cầu gai là một thông số quan trọng để xác định giá trị và khả năng hấp thụ dinh dưỡng của chúng. Kết quả bảng 4.1 cho thấy hàm lượng protein hòa tan có trong trứng Cầu gai vàng cao hơn nhiều so với mẫu trứng Cầu gai đen, gấp khoảng 1,72 lần. Bên cạnh đó hàm lượng protein hòa tan trong mẫu cơ thịt và dịch khoang cơ thể của cả hai loại Cầu gai thấp hơn nhiều so với trong trứng Cầu gai, chỉ đạt khoảng 1/4 so với mẫu trứng.

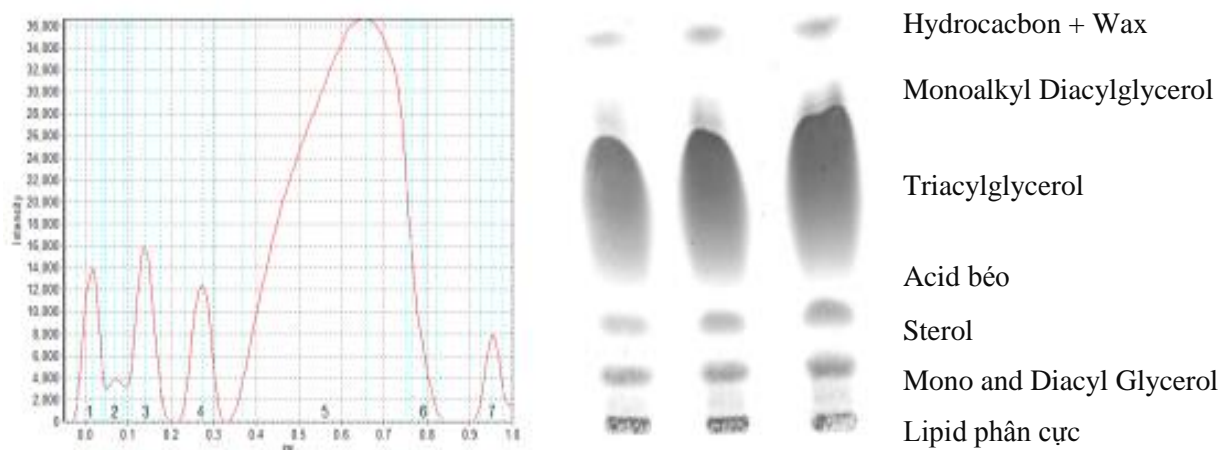
4.2. Các lớp chất lipid, hàm lượng của chúng và thành phần acid béo trong mẫu thân, trứng Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* và Cầu gai đen *Diadema savignyi*

4.2.1. Thành phần và hàm lượng các lớp chất lipid của mẫu thân, trứng Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

Thành phần lớp lipid của các mẫu nghiên cứu được liệt kê trong Bảng 4.2; Hình 4.1 và Hình 4.2. Hình 4.1 và 4.2 cho thấy lipid tổng của mẫu trứng và thân Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* bao gồm bảy lớp. Nhiều nghiên cứu trước đây đã báo cáo rằng lipid của một số loài Cầu gai gồm 6 lớp [132] [133], đặc biệt là loài *Diadema savignyi* được sưu tầm cùng khu vực với loài Cầu gai *Tripneustes gratilla* nghiên cứu. Sự xuất hiện của mono và diacyl glycerol được phát hiện. Chất béo trung tính là thành phần điển hình có trong các lớp lipid trong mẫu trứng và thân của *Tripneustes gratilla*, điều này cũng đã được báo cáo trong một số các công bố trước đây. Đây là lần đầu tiên các lớp lipid trong lipid tổng số của trứng và thân Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* được báo cáo.



Hình 4.1. Hình ảnh TLC hàm lượng từng lớp chất lipid của mẫu trứng Cầu gai *Tripneustes gratilla* chạy phần mềm Sorbfil



Hình 4.2. Hình ảnh TLC hàm lượng từng lớp chất lipid mẫu thân Cầu gai

***Tripneustes gratilla* chạy phần mềm Sorbfil**

Bảng 4.2. Kết quả thành phần và hàm lượng lớp chất lipid của mẫu trứng và thân Cầu gai *Tripneustes gratilla*

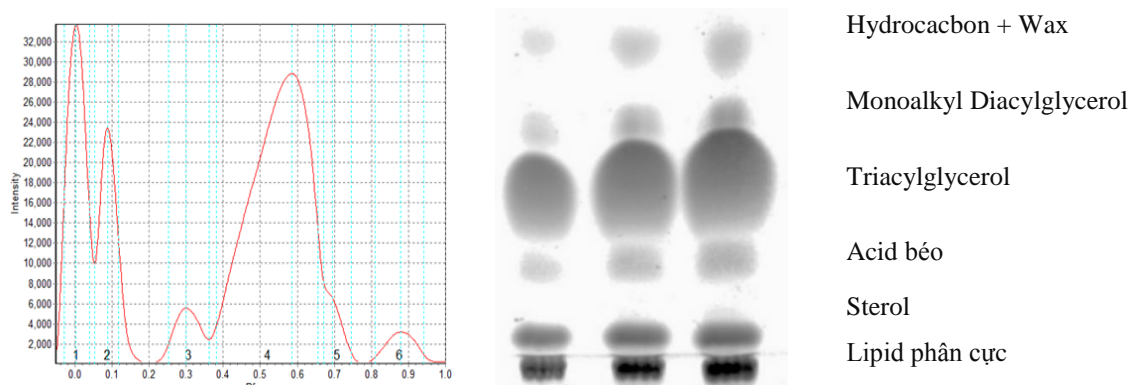
TT	Lớp chất lipid	Mẫu Cầu gai <i>Tripneustes gratilla</i>	
		Mẫu trứng (%)	Mẫu thân (%)
1	Lipid phân cực	4,41 ± 0,05	6,36 ± 0,04
2	Mono và Diacyl Glycerol	1,11 ± 0,01	1,43 ± 0,01
3	Sterol	5,69 ± 0,05	6,63 ± 0,04
4	Acid béo	4,76 ± 0,03	4,49 ± 0,03
5	Triacylglycerol	78,37 ± 0,64	76,10 ± 0,57
6	Monoalkyl Diacylglycerol	3,31 ± 0,05	3,24 ± 0,05
7	Hydrocarbon + Wax	2,35 ± 0,04	1,75 ± 0,02

Kết quả từ Bảng 4.2 cho thấy 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 %. Ngoài ra, sự khác biệt về hàm lượng triacylglycerol trong 2 mẫu nghiên cứu này là không đáng kể (khoảng 2,27 %). Khác với các báo cáo khoa học trước đây về lipid của Cầu gai, hàm lượng lipid phân cực của trứng và thân *Tripneustes gratilla* thấp hơn, lần lượt là 4,41% và 6,36% [134]. Sterol là một hợp chất được tìm thấy trong hầu hết các sinh vật biển vì tầm quan trọng sinh học của nó. Một trong những vai trò phổ biến của nó là trở thành một thành phần của màng, có thể chống lại các tác động bất lợi của môi trường [135]. Nghiên cứu này cho thấy rằng tỷ lệ phần trăm của sterol

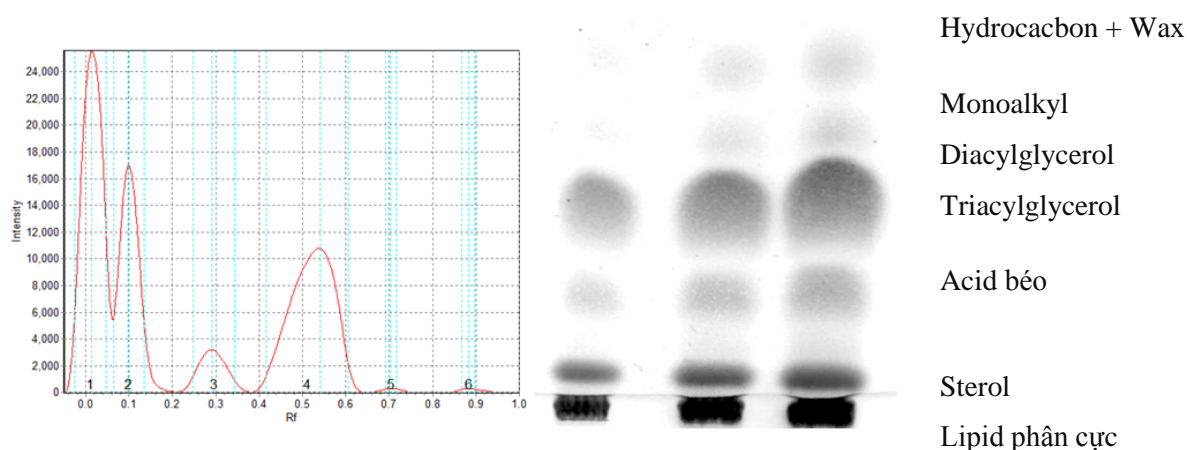
thấp như lớp lipid phân cực, với 5,69 % ở mẫu trứng và 6,63 % ở mẫu thân. Ba nhóm còn lại acid béo (FA), monoalkyl diacylglycerol (MDAG) và hydrocarbon + sáp (HW) có hàm lượng thấp, dưới 5 % cho cả hai mẫu. Đáng chú ý là sự khác biệt giữa các chất này trong thân và trứng của Cầu gai *Tripneustes gratilla* không đáng kể.

4.2.2. Thành phần và hàm lượng các lớp chất lipid của mẫu thân, trứng Cầu gai đen

Thành phần các lớp chất lipid trong mẫu trứng và thân Cầu gai đen *Diadema savignyi* đã được nghiên cứu. Đây là lần đầu tiên các lớp chất có trong lipid của trứng và thân Cầu gai *Diadema savignyi* được công bố. Kết quả cho thấy trong phần lipid không phân cực của cả trứng và thân Cầu gai đen lớp chất chính bao gồm TAG, FFA và ST, kết quả này cũng được ghi nhận từ nhiều công bố trước đó [128] [136]. Đây cũng là lần đầu tiên thành phần lớp chất lipid được công bố cho Cầu gai đen *Diadema savignyi*. Hơn thế nữa, triacylglycerol (TG) 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%), tuy nhiên sự chênh lệch về hàm lượng hai lớp chất này trong mẫu thân Cầu gai là không đáng kể (1,55%) và hàm lượng triacylglycerol trong mẫu trứng cao vượt trội hơn so với trong mẫu thân Cầu gai. Từ bảng 4.3 cho thấy 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%. Kết quả này cũng tương tự như công bố của một số tác giả trên thế giới khi nghiên cứu về thành phần lipid phân cực nói chung và phospholipid nói riêng [132] [134].



Hình 4.3. Hình ảnh TLC hàm lượng lớp chất lipid mẫu trứng Cầu gai *Diadema savignyi* chạy phần mêm Sorbfil



Hình 4.4. Hình ảnh TLC hàm lượng từng lớp chất lipid mẫu thân Cầu gai *Diadema savignyi* chạy phần mềm Sorbfil

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

TT	Lớp chất	Mẫu trứng (%)	Mẫu thân (%)
1	Lipid phân cực	20,47 ± 0,05	33,94 ± 0,60
2	Sterol	12,45 ± 0,01	19,57 ± 0,26
3	Acid béo	4,14 ± 0,05	9,28 ± 0,16
4	Triglyceride	55,27 ± 0,03	32,39 ± 0,30
5	Monoalkyl Diacylglycerol	4,43 ± 0,04	2,50 ± 0,08
6	Hydrocacbon + Wax	3,24 ± 0,05	2,32 ± 0,07

Sterol là hợp chất có mặt trong rất nhiều loài sinh vật biển do tầm quan trọng sinh học của chúng, như là thành phần của màng, là yếu tố chống lại các tác động bất lợi của môi trường [135] [134] [136] [137]. Đối với Cầu gai đen *Diadema savignyi*, sterol là lớp chất phong phú thứ ba trong phần lipid không phân cực, có hàm lượng 12,45% và 19,57% tương ứng với mẫu trứng và mẫu thân. Ba nhóm lớp chất còn lại: FFA, HW, MDAG đều có hàm lượng thấp, dưới 10% đối với cả hai mẫu thí nghiệm, đáng chú ý là hàm lượng FFA của mẫu thân lại cao hơn 2 lần so với trong mẫu trứng, điều này đặt ra câu hỏi về việc có thể những hệ enzyme lipase có trong ruột của Cầu gai đã tham gia vào quá trình thủy phân TG thành FFA. Điều này cũng đã được ghi

nhận trong công trình nghiên cứu của C. Liyana-Pathirana năm 2012 khi nghiên cứu loài Cầu gai xanh *Strongylocentrotus droebachiensis* [128].

So sánh giữa mẫu Cầu gai vàng và Cầu gai đen cho thấy, lipid phân cực của Cầu gai đen cao hơn vượt trội so với Cầu gai vàng, với mẫu trứng cao gấp 6,64 lần và 5,33 lần với mẫu thân khi hai loài Cầu gai này được thu nhận từ cùng một địa điểm và cùng một thời gian. Tương tự như lipid phân cực, thành phần sterol ở Cầu gai đen cũng cao hơn so với ở Cầu gai vàng, với cả mẫu thân và trứng cao gấp khoảng 3 lần. Thành phần acid béo có trong hai mẫu trứng không có sự khác biệt lớn, nhưng trong mẫu thân Cầu gai đen lại cao hơn mẫu thân Cầu gai vàng 2,06 lần. Không có sự khác biệt lớn giữa thành phần MDAG và HW trong cả 4 mẫu phân tích. Kết quả nổi bật nhất là thành phần TG trong mẫu thân và trứng Cầu gai vàng là cao vượt trội và tương đương nhau, nhưng lại cao hơn rất nhiều so với mẫu trứng và thân Cầu gai đen.

4.2.3. Thành phần và hàm lượng của các acid béo trong mẫu thân, trứng Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

Kết quả phân tích thành phần acid béo từ các mẫu thân và trứng Cầu gai vàng được thể hiện ở Bảng 4.4. Kết quả cho thấy là các acid béo trong lipid tổng của trứng và thân của Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* là phong phú. Trong nghiên cứu này, 26 và 25 acid béo đã được xác định trong trứng và mẫu thân với 12 đến 22 nguyên tử carbon tương ứng. So sánh với nghiên cứu về thành phần acid béo cũng của Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* thu thập tại Phú Yên của Nguyễn Xuân Duy (tìm ra 17 acid béo), thì báo cáo này đã tìm ra được sự phong phú hơn nhiều về số lượng acid béo có trong mẫu trứng Cầu gai [126]. Sự khác biệt giữa tỷ lệ phần trăm của acid béo bão hòa (SFA) trong trứng và mẫu thân từ *Tripneustes gratilla* là đáng kể, ở mức 41,74 % với trứng mẫu và 17,22 % với mẫu thân. 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. Ngược lại, tỷ lệ acid béo còn lại là thấp. Acid béo rất quan trọng vì chúng ảnh hưởng đến hương vị và cách bảo quản của trứng Cầu gai. Đối với cả mẫu trứng và mẫu thân của *Tripneustes gratilla* trong báo cáo này, tỷ lệ phần trăm acid béo có một liên kết đôi trong công thức cấu tạo (MUFA) là 26,53 % và 18,01 % và số lượng acid béo không bão hòa đa nối đôi (PUFA) này lần lượt là 31,08 % và 60,50 %.

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. Điều này cũng tương đồng với các nghiên cứu trước đây [138]. Phần lớn acid béo no còn lại

chiếm dưới 1%. Kết quả này tương tự như công bố về Cầu gai *Diadema savignyi*, Cầu gai *Strongylocentrotus droebachiensis* năm 2002 của C. et al. [128] và về *Paracentrotus lividus* của Mol S. Baygar et al. [139].

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		0,74	3,51
Omega-3		13,97	20,67	n3/n6		0,83	0,52

(SFA: Acid béo bão hòa, MUFA: Acid béo chưa no có một nối đôi, PUFA: Acid béo chưa no đa nối đôi)

Tỷ lệ của MUFA tổng số là khoảng 26,53 % và 18,01 % đối với trứng và thân, tương ứng. Trong nhóm này acid eicosenoic (20:1n-9) chiếm tỷ trọng lớn nhất tỷ lệ trong mẫu thân, ở mức 6,25 %, trong khi 16:1n-9 và 18:1n-9 là acid béo không bão hòa một nối đôi phổ biến nhất trong mẫu trứng, với tỷ lệ xấp xỉ 9%. Ngoài ra, các acid béo khác trong nhóm MUFA được tách chiết từ *Tripneustes gratilla* có tỷ lệ thấp, dưới 1% tổng lượng lipid. So với nhóm MUFA, hàm lượng acid béo không bão

hòa đa nối đôi (PUFA) là cao hơn nhiều, là 31,08 % với mẫu trứng và 60,50 % với mẫu thân. Một đặc điểm nổi bật đặc trưng đã được nhận ra trong thân của *Tripneustes gratilla*, tỷ lệ PUFA có tỉ lệ cao đáng chú ý, gần gấp đôi so với trứng. Acid arachidonic (20:4n-6) chiếm tỷ lệ cao nhất chiếm tỷ lệ 10,95% trong tổng số lipid của trứng và 30,96 % trong tổng số lipid của thân Cầu gai chiếm gần 50% thành phần PUFA. So với kết quả nghiên cứu về thành phần của PUFA được tìm thấy trong tuyến của *Strongylocentrotus droebachiensis*, những kết quả này khá tương tự, mặc dù Cầu gai xanh được thu thập vào 4 mùa khác nhau. Theo nghiên cứu này, 20:3n-6, 20:4n-6 và 20:5n-3 chiếm tỷ trọng đáng kể, đặc biệt 20:5n-3 chiếm 13,39 % trong dịch khoang cơ thể. Hơn nữa, các acid béo không bão hòa đa khác trong cả trứng và thân của *Tripneustes gratilla* có hàm lượng tương đối thấp, hầu hết dưới 3 % ngoại trừ 18:4n-3, 20:4n-6 và 20:3n-6.

Từ bảng 4.4 cho thấy, sự hiện diện của các nhóm acid béo omega-3, omega-6 và omega-9 với tỉ lệ cao vượt trội so với báo cáo cũng của Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* được thu thập ở Phú Yên trước đó [126]. Ở nhóm omega-3, lượng acid béo eicosapentaenoic (C20:5n-3 EPA) là 6,42 % trong trứng và 13,39 % trong mẫu thân và cao hơn so với các công bố trước đó. Ngoài ra, hoạt tính sinh học quý giá của EPA đã được công bố trên nhiều tạp chí trước đây. Điều này có thể kết luận rằng Cầu gai *Tripneustes gratilla* hứa hẹn sẽ trở thành nguồn cung cấp thực phẩm tốt cho sức khỏe con người.

Một điều đáng chú ý nữa là tỷ lệ PUFA/SFA và tỷ lệ n3/n6 được tìm thấy trong tổng lipid từ trứng và thân của *Tripneustes gratilla* là (0,74 và 3,51) và (0,83 và 0,52) đây là những tỉ lệ cao. Do đó, 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 [(PUFA/SFA \geq 0,4) và (n3 /n6 \geq 0,1)].

4.2.4. 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, trong nghiên cứu này chúng tôi ghi nhận sự có mặt của 29 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, kết quả được thể hiện ở bảng 4.5. 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 hàm lượng dưới 1%. Acid béo là thành phần rất quan trọng vì nó ảnh hưởng tới mùi vị và quá trình bảo quản trứng Cầu gai [36]. 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. Trong thành phần SFA, acid palmitic (16:0) chiếm tỉ lệ cao nhất và vượt trội hơn so với các acid béo khác, theo sau đó là acid myristic (14:0) và stearic (18:0), còn hầu hết các acid béo no còn lại đều có hàm lượng dưới 1%. Kết quả này tương tự như công bố về loài Cầu gai *Strongylocentrotus droebachiensis* năm 2002 của tác giả C. Liyana-Pathirana [128] và *Paracentrotus lividus* của tác giả Mol, S., Baygar năm 2008 [139] hay của loài *Stomopneustes variolaris* của tác giả Ayyagari Archana năm 2016 [36]. Trước đó vào những năm bảy mươi, những acid béo no tiêu biểu này cũng được tìm thấy trong một số loài Cầu gai như *Anthocardaris crassispinga*, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Strongylocentrotus franciscanus*, *Mesocentrotus franciscanus* và *Echinus esculentus* và acid palmitic (16:0) vẫn là thành phần lớn nhất trong nhóm SFA sau đó đến acid myristic (14:0) [138].

Đối với thành phần acid béo trong MUFA, acid eicosenoic (20:1n-9) chiếm tỉ lệ lớn nhất trong cả trứng và thân Cầu gai đen, hàm lượng 9,90% và 12,90% tương ứng. Tiếp theo là acid oleic (18:1n-9) và acid vaccenic (18:1n-7) với hàm lượng không có sự khác biệt nhiều giữa mẫu trứng và mẫu thân Cầu gai, dao động trong khoảng 3%. Kết quả này có sự khác biệt lớn với công bố của Guanqun Chen năm 2010, khi nghiên cứu về 3 loài Cầu gai *Anthocardaris crassispinga*, *Diadema setosum* và *Salmacis sphaeroides* thu thập tại Hong Kong, trong thành phần của MUFA, hàm lượng acid vaccenic (18:1n-7) lại cao nhất (7,6 - 13%) và acid eicosenoic (20:1n-9) nằm trong khoảng 0 - 3% [140]. Hầu hết những acid béo còn lại trong nhóm MUFA đều có hàm lượng rất thấp, dưới 1% của lipid tổng.

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

TT	Mẫu		TT	Mẫu			
	Acid béo	Mẫu trứng		Acid Béo	Mẫu trứng	Mẫu thân	
1	14:0	17,35 ± 0,77	17	18:0	5,74 ± 0,14	9,71 ± 0,04	
2	a-15:0	0,59 ± 0,00	18	19:0	0,41 ± 0,02	0,69 ± 0,02	
3	15:0	1,35 ± 0,04	19	19:1n-9	0,96 ± 0,01	1,77 ± 0,00	
4	16:1n-9	4,41 ± 0,13	20	a-19:0	-	0,18 ± 0,00	
5	16:2n-6	0,37 ± 0,01	21	20:0	0,69 ± 0,02	0,46 ± 0,01	
6	a-16:0	0,15 ± 0,00	22	20:1n-7	0,50 ± 0,02	0,63 ± 0,04	
7	16:0	31,40 ± 0,15	23	20:1n-9	9,90 ± 0,36	12,90 ± 0,25	
8	i-17:0	-	24	20:4n-6	8,58 ± 0,09	11,34 ± 0,41	
9	a-17:0	0,57 ± 0,00	25	20:5n-3	1,76 ± 0,05	1,75 ± 0,01	
10	17:0	1,20 ± 0,04	26	20:2n-6	2,07 ± 0,06	4,48 ± 0,10	
11	18:4n-3	0,24 ± 0,01	27	21:1n-9	0,64 ± 0,00	1,23 ± 0,03	
12	18:2n-6	1,29 ± 0,05	28	21:0	0,18 ± 0,00	0,26 ± 0,00	
13	18:1n-9	3,42 ± 0,06	29	22:4n-6	0,18 ± 0,00	0,20 ± 0,00	
14	18:1n-7	2,78 ± 0,07	30	22:4n-3	0,13 ± 0,01	0,30 ± 0,01	
15	18:3n-6	0,51 ± 0,02	31	24:1n-7	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	
16	i-19:0	-	32	24:1n-9	0,20 ± 0,01	0,35 ± 0,01	
			33	Khác	0,13 ± 0,00	0,51 ± 0,02	
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

SFA: Acid béo bão hoà tổng số, USFA: Acid béo chưa bão hoà tổng số, MUFA: Acid béo có một nối đôi, PUFA: Acid béo đa nối đôi; (-) : không xuất hiện

Đối với thành phần acid béo đa nối đôi (PUFA), acid béo arachidonic (20:4n-6) chiếm tỉ lệ cao nhất, 8,58% trong lipid của trứng, và 11,34% trong lipid của thân Cầu gai đen, chiếm tới hơn 50% trong thành phần PUFA. So với kết quả nghiên cứu về thành phần PUFA có trong tuyến sinh dục của loài Cầu gai xanh *Strongylocentrotus*

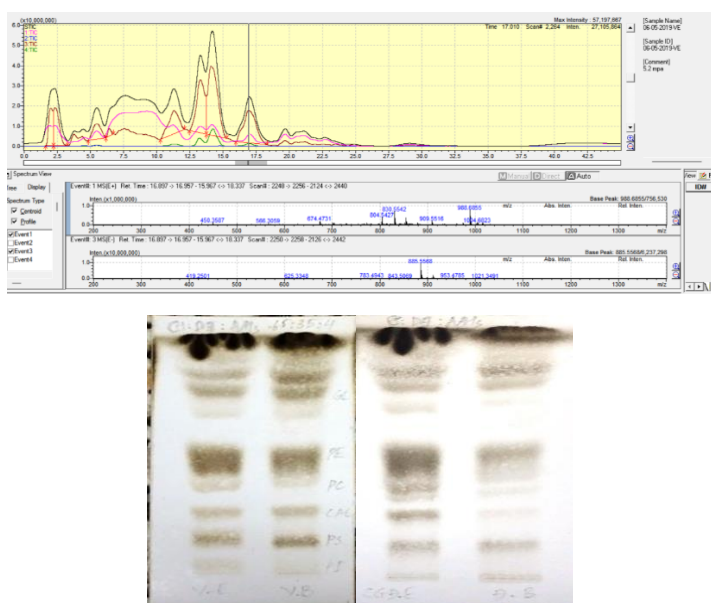
droebachiensis, thì kết quả là hoàn toàn tương tự, mặc dù Cầu gai xanh được thu ở 4 mùa khác nhau. Khác với acid béo 20:4n-6, các acid béo đa nối đôi khác trong cả trứng và thân Cầu gai đen đều có hàm lượng rất thấp, đa phần dưới 0,5% ngoại trừ 18:2n-6 (1,29%); 20:5n-3 (1,76%) và 20:2n-6 (2,07%).

Trong mẫu trứng và thân của Cầu gai đen đều thấy xuất hiện sự có mặt của 4 acid béo omega-3, với tổng hàm lượng 2,31 và 2,47%, đặc biệt là acid béo eicosapentaenoic (C20:5n-3 EPA) đều có tỉ lệ cao nhất, khoảng 1,75%, đây là một acid béo có hoạt tính sinh học rất quý, đã được công bố trong nhiều công trình trước đây [141].

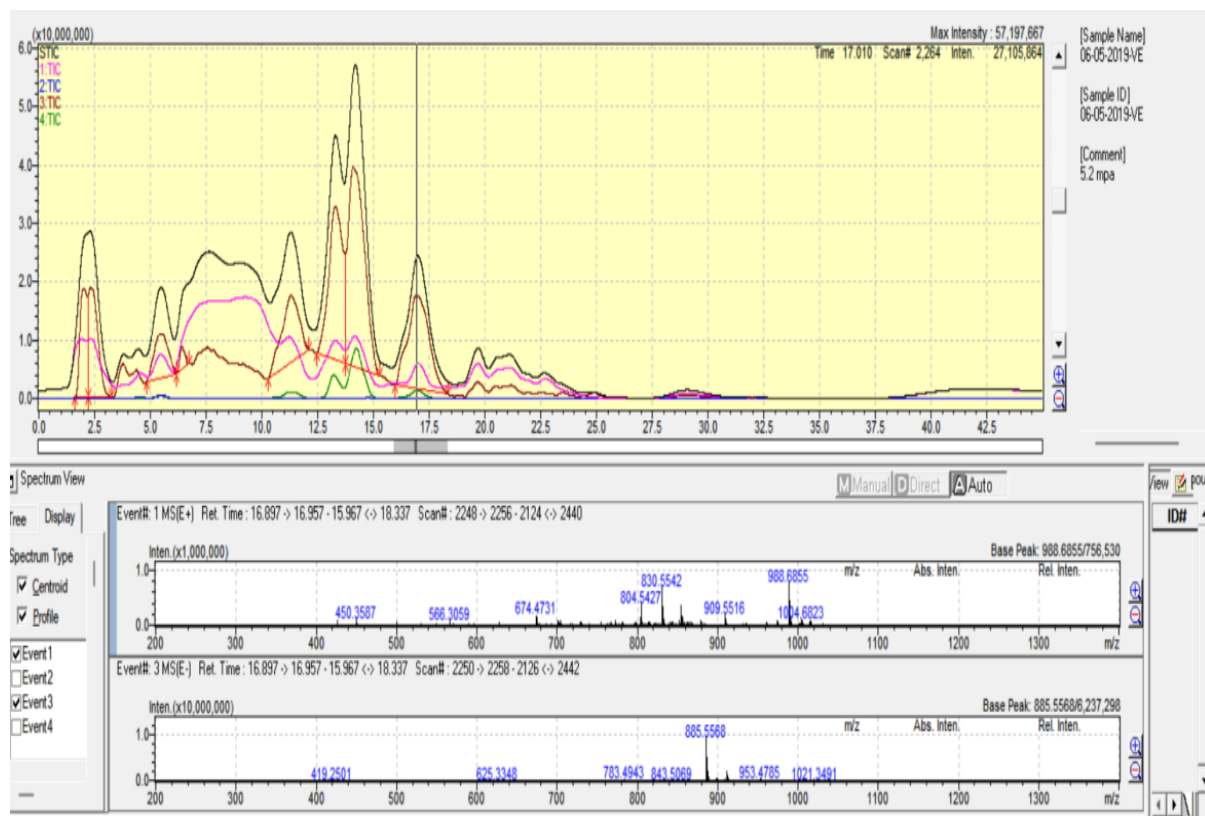
Bên cạnh đó tỉ lệ n3/n6 có trong lipid tổng của trứng và thân Cầu gai đen *Diadema savignyi* lần lượt là 0,17 và 0,14 đều ở mức chỉ số cao, do đó theo tổ chức y tế thế giới (WHO) thì trứng và dịch chiết lipid tồn từ thân của Cầu gai đen sử dụng trong nghiên cứu đều được xếp vào loại thực phẩm rất tốt cho sức khoẻ con người (n3/n6 \geq 0,1)].

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

Ở động vật biển không xương sống, lipid phân cực (PoL) thường chứa glycolipid (GL) và glycerophospholipid (GPL) và các lớp lipid phân cực chính là GPL [142]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các dạng phân tử của PL từ trứng và thân của Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla* và Cầu gai đen *Diadema savignyi* được xác định theo các phân mảnh HRMS của các PL tiêu chuẩn được mô tả trước đây [143].



Hình 4.5. Hình ảnh TLC phân tích các loại PoL của mẫu trứng và thân Cầu gai đen *Diadema savignyi* và Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

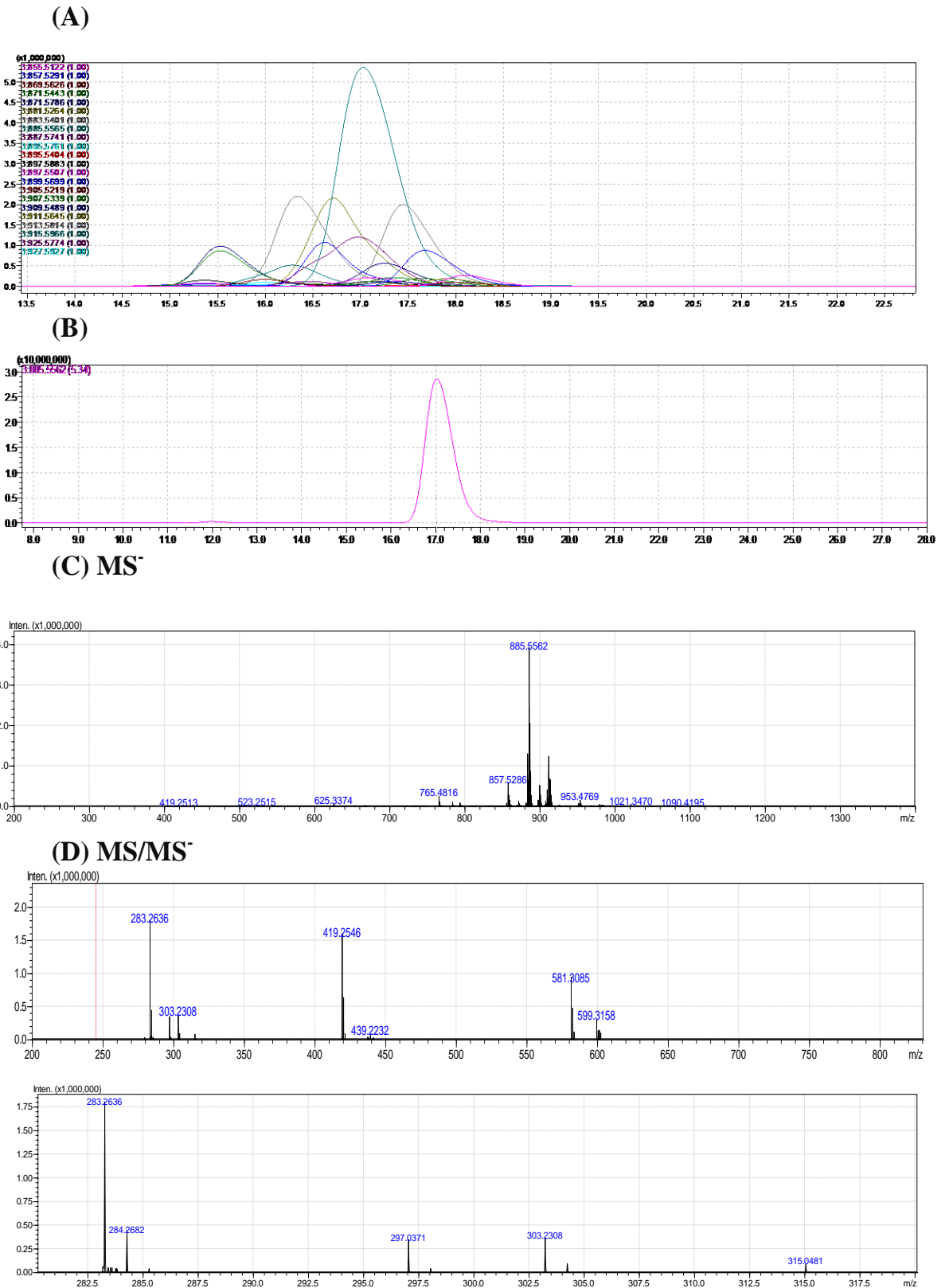


Hình 4.6. Sắc ký đồ HPLC-HR/MS của PL tổng từ mẫu trứng Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

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 (Hình 4.5 và Hình 4.6). Cấu trúc phân tử và hàm lượng của chúng được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị Shimadzu LCMS-IT-TOF với phần mềm xử lý Shimadzu LCMS (V.3.60.361, Shimadzu, Kyoto, Nhật Bản).

4.3.1. Dạng phân tử phosphatidylinositol (PI)

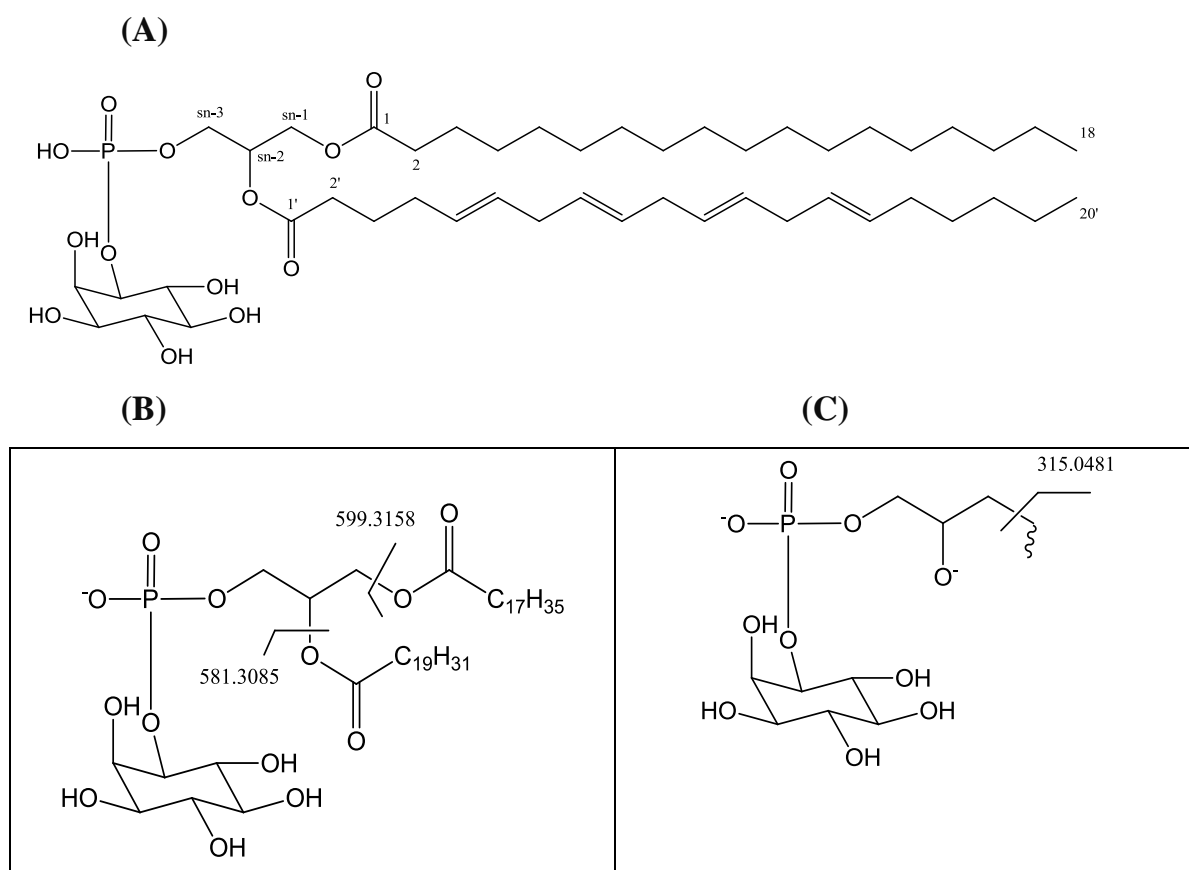
Kết quả nhận dạng PL cho thấy có 20 dạng phân tử đã được tìm thấy trong lớp phosphatidylinositol (PI) từ PoL của cả hai mẫu thân và trứng Cầu gai *Tripneustes gratilla* (Bảng 4.6) và 23 dạng phân tử PI của mẫu thân và 24 dạng phân tử PI của trứng Cầu gai đen *Diadema savignyi* (Bảng 4.7).



Hình 4.7. (A) HPLC–HR/MS phổ khối phân giải cao của tổng các dạng phân tử của lớp PI; (B) HPLC–HR/MS của một dạng phân tử PI với m/z 885,5662; (C) phân mảnh MS⁻; (D) phân ảnh MS²⁻ của PI 18:0/20:4

Cấu trúc của PI được đặc trưng bởi tín hiệu phổ khối MS^- và MS/MS^- của chúng. Các tín hiệu ion âm $[M-H]^-$ được quan sát thấy trong phổ khối phân giải cao HRMS của tất cả các thành phần của các dạng phân tử của lớp PI (Hình 4.7 (A) và Bảng 4.6).

Ví dụ, tín hiệu ion âm $[M-H]^-$ với m/z lý thuyết là 885,5562 cho dạng phân tử PI 18:0/20:4 đã được phát hiện và được gán với công thức phân tử $C_{47}H_{83}O_{13}P$, và giá trị m/z thực tế đo được là 885,5571 (sai khác 0,0009). (Hình 4.7 (B) và 4.7 (C)). Đây là tín hiệu mạnh nhất (peak cao nhất) trong phổ khối phân giải cao HPLC-HR/MS của tổng số các dạng phân tử thuộc PI, với thời gian lưu (Rt) là 17,939 phút (Hình 4.7 (B) và 4.7 (C)). Một tín hiệu tương ứng với một anion carboxylat của acid béo 20:4 đã được phát hiện trong tín hiệu phổ MS^{2-} của ion âm $[M-H]^-$ PI 38:4 20:4 (Hình 4.7 (D)), được phát hiện tại m/z 303,2308 (công thức phân tử tính toán được tương ứng $C_{20}H_{32}O_2$).



Hình 4.8. (A) Cấu trúc hóa học của dạng phân tử PI 18:0/20:4; (B) và (C) phân mảnh của PI 38:4 với tín hiệu phổ MS^{2-}

Những khẳng định mô tả trên được hỗ trợ thêm bởi một peak xuất hiện tại m/z 581,3085 với công thức phân tử được dự đoán là $C_{27}H_{50}O_{11}P^-$ (Hình 4.8 (B)). Đối với cấu trúc của PI, anion acid béo ($[RCOO]^-$) được cắt ra khỏi vị trí sn^{-1} do các liên kết alkenyl ở vị trí sn^{-2} (Hình 4.8). Do đó, peak xuất hiện tại m/z 283,2636 có thể có được là do sự mất đi của anion ($C_{18}H_{35}O_2^-$) của acid béo (C18:0) ở vị trí sn^{-1} trong dạng phân tử của PI 38:4, và sự nhận diện này cũng được hỗ trợ bằng một tín hiệu, tương ứng với $C_{29}H_{46}O_{11}P^-$ tại m/z 599,316 (Hình 4.7 (D) và 4.8 (B)). Ngoài ra, peak ion có m/z 315,0481 tương ứng với sự phân mảnh của một phần đơn vị cấu tạo của glycerolphosphatidylinositol (Hình 4.8 (C)), điều này có thể cho thấy sự mất đi hai acid béo (C18:0) và (C20:4) tại vị trí sn^{-1} và sn^{-2} trong dạng phân tử PI 38:4. Do đó, từ những nhận định trên, dạng phân tử của PI 38:4 được xác định là diacylglycerolphosphatidylinositol 18:0/20:4, và cấu trúc của nó được thể hiện như ở hình 4.8 (A).

Bảng 4.6. Các dạng phân tử của lớp PI có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

STT	Dạng phân tử PI	Khối lượng phân tử $[M-H]^-$	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong PI (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
1.	PI 16:0/20:5	855,5122	$C_{45}H_{77}O_{13}P$	18,308	0,77	0,07
2.	PI 16:0/20:4	857,5291	$C_{45}H_{79}O_{13}P$	17,893	3,36	1,44
3.	PI 18:0e/20:5	869,5626	$C_{47}H_{83}O_{12}P$	16,239	0,69	0,54
4.	PI 17:0/20:4	871,5443	$C_{46}H_{81}O_{13}P$	17,568	0,90	0,46
5.	PI 18:0e/20:4	871,5786	$C_{47}H_{85}O_{12}P$	15,748	4,82	4,71
6.	PI 18:1/20:5	881,5264	$C_{47}H_{79}O_{13}P$	18,156	0,57	0,17
7.	PI 18:0/20:5	883,5401	$C_{47}H_{81}O_{13}P$	17,661	9,36	6,96
8.	PI 18:0/20:4	885,5562	$C_{47}H_{83}O_{13}P$	17,212	38,65	48,19
9.	PI 18:0/20:3	887,5741	$C_{47}H_{85}O_{13}P$	16,938	2,17	2,19
10.	PI 20:1e/20:4	897,5883	$C_{49}H_{87}O_{12}P$	15,551	0,69	0,40

STT	Dạng phân tử PI	Khối lượng phân tử [M-H] ⁻	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong PI (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
11.	PI 19:0/20:5	897,5507	C ₄₈ H ₈₃ O ₁₃ P	17,327	1,23	1,08
12.	PI 19:0/20:4	899,5699	C₄₈H₈₅O₁₃P	16,873	5,92	6,43
13.	PI 40:8	905,5219	C ₄₉ H ₇₉ O ₁₃ P	18,195	0,44	0,55
14.	PI 20:3/20:4	907,5339	C ₄₉ H ₈₁ O ₁₃ P	17,870	0,72	0,50
15.	PI 20:1/20:5	909,5489	C ₄₉ H ₈₃ O ₁₃ P	17,444	2,91	2,21
16.	PI 20:0/20:5	911,5645	C₄₉H₈₅O₁₃P	16,959	13,37	12,64
17.	PI 20:0/20:4	913,5814	C₄₉H₈₇O₁₃P	16,573	11,49	9,89
18.	PI 20:0/20:3	915,5966	C ₄₉ H ₈₉ O ₁₃ P	16,273	0,69	0,46
19.	PI 21:1/20:4	925,5774	C ₅₀ H ₈₇ O ₁₃ P	16,684	0,71	0,87
20.	PI 21:0/20:4	927,5927	C ₅₀ H ₈₉ O ₁₃ P	16,243	0,42	0,24

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. Các dạng phân tử PI 16:0/20:4, PI 18:0e/20:4, PI 18:0/20:3 và PI 20:1/20:5 thuộc nhóm cao thứ ba với hàm lượng dao động trong khoảng 2,17 đến 4,82 %. Các dạng phân tử PI khác được tìm thấy với hàm lượng thấp dưới 1%.

Bảng 4.7. Các dạng phân tử của lớp PI có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai đen *Diadema savignyi*

STT	Dạng phân tử PI	Khối lượng phân tử [M-H] ⁻	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong PI (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
1	PI 16:0/20:5	855,5122	C ₄₅ H ₇₇ O ₁₃ P	18,593	0,069	-
2	PI 16:0/20:4	857,5291	C ₄₄ H ₇₉ O ₁₃ P	18,297	3,277	1,092
3	PI 18:0e/20:5	869,5626	C ₄₇ H ₈₃ O ₁₂ P	16,392	0,411	0,857
4	PI 17:0/20:4	871,5443	C ₄₆ H ₈₁ O ₁₃ P	17,968	1,593	0,851
5	PI 18:0e/20:4	871,5786	C₄₇H₈₅O₁₂P	16,139	5,298	5,381
6	PI 18:1/20:5	881,5264	C ₄₇ H ₇₉ O ₁₃ P	18,384	0,280	0,155
7	PI 18:0/20:5	883,5401	C ₄₇ H ₈₁ O ₁₃ P	18,084	5,480	3,658
8	PI 39:5e	883,5674	C ₄₈ H ₈₅ O ₁₂ P	16,063	0,048	0,598
9	PI 18:0/20:4	885,5565	C₄₇H₈₃O₁₃P	17,620	33,242	38,999
10	PI 19:0e/20:4	885,5862	C ₄₈ H ₈₇ O ₁₂ P	15,700	0,806	0,548
11	PI 18:0/20:3	887,5741	C ₄₇ H ₈₅ O ₁₃ P	17,284	0,820	0,825
12	PI 20:2e/20:4	895,5761	C ₄₉ H ₈₅ O ₁₂ P	15,906	0,259	1,914
13	PI 39:6	895,5404	C ₄₈ H ₈₁ O ₁₃ P	17,914	0,093	0,064
14	PI 20:1e/20:4	897,5883	C₄₉H₈₇O₁₂P	15,946	0,679	5,784
15	PI 19:0/20:5	897,5507	C ₄₈ H ₈₃ O ₁₃ P	17,688	2,127	2,149
16	PI 19:0/20:4	899,5699	C ₄₈ H ₈₅ O ₁₃ P	17,291	8,320	8,447
17	PI 40:8	905,5219	C ₄₉ H ₇₉ O ₁₃ P	18,494	0,343	0,548
18	PI 20:3/20:4	907,5339	C ₄₉ H ₈₁ O ₁₃ P	18,240	0,587	0,521
19	PI 20:1/20:5	909,5489	C ₄₉ H ₈₃ O ₁₃ P	17,832	3,165	2,292
20	PI 20:0/20:5	911,5645	C₄₉H₈₅O₁₃P	17,403	18,062	14,759
21	PI 20:0/20:4	913,5814	C₄₉H₈₇O₁₃P	16,980	12,459	8,691
22	PI 20:0/20:3	915,5966	C ₄₉ H ₈₉ O ₁₃ P	16,537	0,589	0,902
23	PI 21:1/20:4	925,5774	C ₅₀ H ₈₇ O ₁₃ P	17,067	0,949	1,446
24	PI 21:0/20:4	927,5927	C ₅₀ H ₈₉ O ₁₃ P	16,649	1,642	1,657

Kết quả bảng 4.7 cho thấy, tương tự như kết quả nghiên cứu với mẫu Cầu gai vàng, dạng phân tử PI 18:0/20:4 chiếm tỉ lệ cao nhất trong PI ở cả mẫu trứng và mẫu thân Cầu gai đen, với tỉ lệ 33,242 và 38,999 (%) tương ứng. Ngoài ra có 3 dạng phân tử PI chiếm tỉ lệ cao thứ 2 đối với hai mẫu nghiên cứu Cầu gai đen là PI 20:0/20:5; PI

20:0/20:4 và PI 19:0/20:4 chiếm 18,062; 12,459 và 8,320 % trong tương ứng trong mẫu trứng và 14,759; 8,691 và 8,447% tương ứng trong mẫu thân. So với mẫu thân, trong trứng Cầu gai đen xuất hiện thêm một dạng phân tử PI 16:0/20:5 tuy nhiên hàm lượng thấp, chỉ chiếm 0,069 %. Ngoài ra, hầu hết các dạng phân tử khác của lớp PI của hai mẫu thân và trứng Cầu gai đen đều có hàm lượng không cao, chỉ dưới 5%.

4.3.2. Dạng phân tử phosphatidylserine (PS)

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. Kết quả được thể hiện ở Bảng 4.8 và Bảng 4.9.

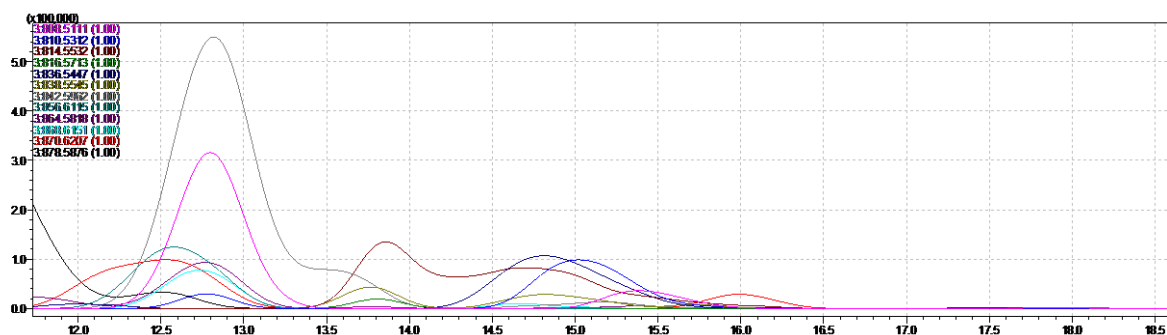
Bảng 4.8. Các dạng phân tử của lớp PS có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

STT	Dạng phân tử PS	Khối lượng phân tử [M-H] ⁻	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong PS (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
1.	PS 38:5	808,5111	C ₄₄ H ₇₆ NO ₁₀ P	15,524	1,246	0,502
2.	PS 18:0/20:4	810,5312	C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₀ P	15,067	5,261	3,880
3.	PS 20:1/18:1	814,5532	C ₄₄ H ₈₂ NO ₁₀ P	13,959	5,765	0,570
4.	PS 38:1	816,5713	C ₄₄ H ₈₄ NO ₁₀ P	14,018	-	0,155
5.	PS 19:1/20:4	822,5276	C ₄₅ H ₇₈ NO ₁₀ P	14,861	0,053	0,192
6.	PS 19:1/20:1	828,5736	C₄₅H₈₄NO₁₀P	13,912	30,071	0,337
7.	PS 40:7	832,5134	C ₄₆ H ₇₆ NO ₁₀ P	15,128	0,062	0,373
8.	PS 20:1/20:4	836,5447	C₄₆H₈₀NO₁₀P	14,747	9,571	5,325
9.	PS 40:4	838,5545	C ₄₆ H ₈₂ NO ₁₀ P	13,907	2,68	1,534
10.	PS 20:1/20:1	842,5962	C₄₆H₈₆NO₁₀P	12,900	42,47	44,41
11.	PS 20:1/21:1	856,6115	C₄₇H₈₈NO₁₀P	12,646	10,432	14,577
12.	PS 20:1/22:4	864,5818	C ₄₈ H ₈₄ NO ₁₀ P	12,874	7,705	6,031
13.	PS 20:1/22:2	868,6151	C ₄₈ H ₈₈ NO ₁₀ P	12,815	5,431	8,087
14.	PS 20:1/22:1	870,6207	C₄₈H₉₀NO₁₀P	12,338	7,214	11,323
15.	PS 21:1/22:4	878,5876	C ₄₉ H ₈₆ NO ₁₀ P	12,629	2,01	2,702

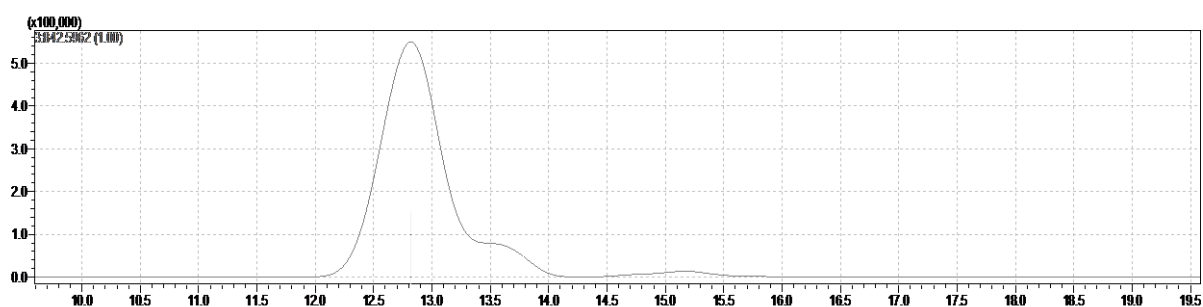
Bảng 4.9. Các dạng phân tử của lớp PS có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai đen *Diadema savignyi*

STT	Dạng phân tử PS	Khối lượng phân tử [M-H] ⁻	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong PS (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
16.	PS 38:5	808,5111	C ₄₄ H ₇₆ NO ₁₀ P	15,814	0,991	0,646
17.	PS 18:0/20:4	810,5312	C₄₄H₇₈NO₁₀P	15,315	21,781	9,052
18.	PS 20:1/18:1	814,5532	C ₄₄ H ₈₂ NO ₁₀ P	14,440	1,602	2,014
19.	PS 38:1	816,5713	C ₄₄ H ₈₄ NO ₁₀ P	14,311	0,956	2,203
20.	PS 19:1/20:4	822,5276	C ₄₅ H ₇₈ NO ₁₀ P	15,194	1,345	1,566
21.	PS 19:0/20:4	824,5459	C ₄₅ H ₈₀ NO ₁₀ P	15,063	3,339	1,607
22.	PS 19:1/20:1	828,5736	C ₄₅ H ₈₄ NO ₁₀ P	13,415	1,133	3,580
23.	PS 40:7	832,5134	C ₄₆ H ₇₆ NO ₁₀ P	15,414	2,108	1,952
24.	PS 20:1/20:4	836,5447	C₄₆H₈₀NO₁₀P	14,845	13,634	9,617
25.	PS 40:4	838,5545	C₄₆H₈₂NO₁₀P	14,521	4,842	2,152
26.	PS 20:1/20:1	842,5962	C₄₆H₈₆NO₁₀P	13,733	20,067	34,591
27.	PS 20:1/21:1	856,6115	C₄₇H₈₈NO₁₀P	12,974	11,164	18,626
28.	PS 20:1/22:4	864,5818	C₄₈H₈₄NO₁₀P	13,312	3,913	4,185
29.	PS 20:1/22:2	868,6151	C₄₈H₈₈NO₁₀P	12,978	6,382	2,295
30.	PS 20:1/22:1	870,6207	C₄₈H₉₀NO₁₀P	12,447	6,810	5,527
31.	PS 21:1/22:4	878,5876	C ₄₉ H ₈₆ NO ₁₀ P	12,918	2,778	3,809

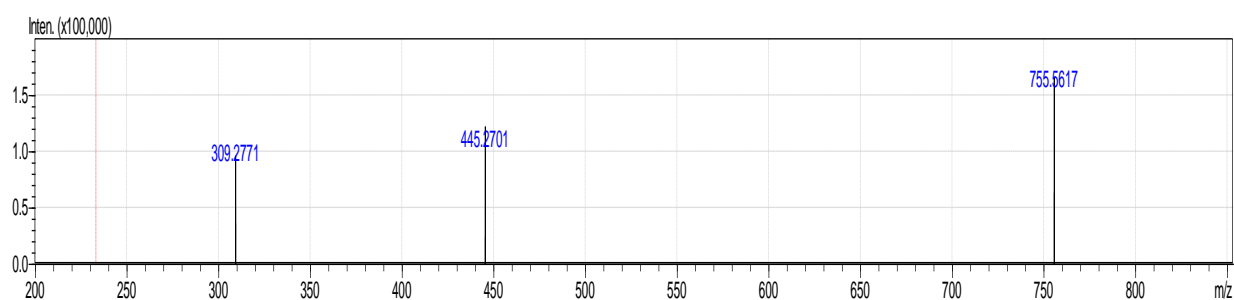
(A)



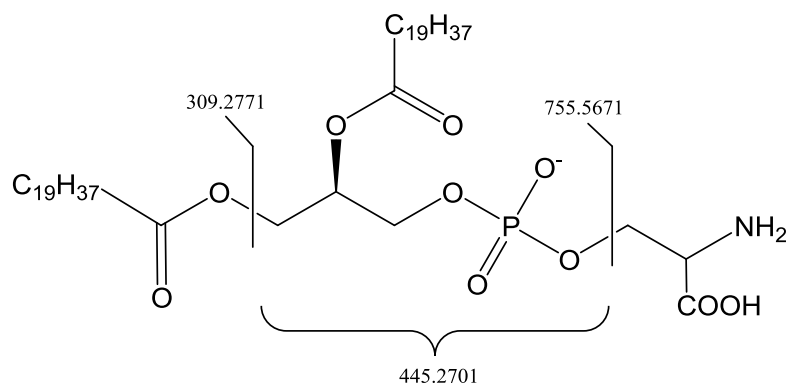
(B)



(C)



Hình 4.9. (A) HPLC–HR/MS phổ khối phân giải cao của tổng các dạng phân tử của lớp PS; (B) HPLC–HR/MS của một dạng phân tử PS với m/z 842,5962; (C) phân mảnh MS^{2-} của PS 20:1/20:1.



Hình 4.10. Phân mảnh của PS 40:2 (PS 20:1/20:1) với ion phổ khối MS^{2-}

Tín hiệu của các ion âm $[M-H]^-$ được tìm thấy trong tất cả các dạng phân tử của PS và không thấy sự hình thành của các ion dương. Trong mỗi thành phần, phổ MS^{2-} từ $[M-H]^-$ đều có tín hiệu ion đặc trưng $[M-H-C_3H_5NO_2]^-$ thể hiện sự mất đi của nhóm serine (Hình 4.10). Xét ion âm $[M-H]^-$ của PS 20:1/20:1 có m/z là 842,5962 ($[C_{46}H_{85}NO_{10}P]^-$, trên MS^{2-} , có các peak mất serine (756,6617), mất serine và axyl (445,2701), mất H_2O , serine và acyl (309,2771). Tuy nhiên, các mảnh vỡ, tương ứng với acid béo không được phát hiện (Hình 4.10). Do đó thành phần PS 20:1/20:1 được xác định là alkenyl-acyl glycerophosphoserine, kí hiệu 20:1/20:1.

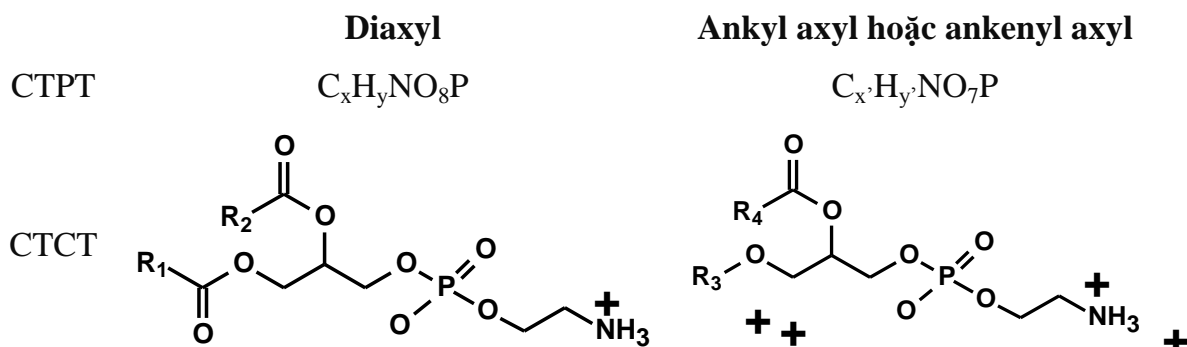
Trong số các dạng phân tử PS của mẫu Cầu gai vàng, PS 20:1/20:1 với ion âm $[M-H]^-$ có m/z 842,5962 (tương ứng công thức phân tử $C_{46}H_{86}NO_{10}P$) có hàm lượng cao nhất với 42,48% trong trứng và 44,41% trong thân (Hình 4.9). PS 20:1/21:1 (m/z $[M-H]^-$ 856,6115, công thức phân tử $C_{47}H_{88}NO_{10}P$) và PS 20:1/22:1 (m/z 870,6207, công thức phân tử $C_{48}H_{90}NO_{10}P$) là hai dạng phân tử PS có hàm lượng cao tiếp theo, tương ứng chiếm 10,432 và 7,214% trong trứng và 14,577 và 11,323% trong mẫu thân. Ngoài trừ PS 20:1/20:4 có hàm lượng trong trứng lên tới 9,571%, các dạng phân tử PS khác có hàm lượng dưới 9% trong lớp PS. Hai dạng phân tử là PS 38:5 và PS 20:1/18:1 có hàm lượng thấp (dưới 1%) với tỉ lệ chiếm 0,502 và 0,57% tương ứng trong mẫu thân. Tuy nhiên lại ghi nhận lượng đáng kể PS 20:1/18:1 trong mẫu trứng với hàm lượng 5,765%. PS 38:1 được phát hiện trong mẫu thân mà không xuất hiện trong mẫu trứng Cầu gai vàng.

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. Ngoài ra trong mẫu trứng Cầu gai đen, dạng PS 20:1/22:1 chiếm tỉ lệ cao hơn hẳn so với mẫu thân, tỉ lệ % trong lớp PS cao gấp 2,78 lần.

Trong cả hai mẫu trứng và thân của Cầu gai đen, ghi nhận thêm một dạng PS 19:0/20:4 so với mẫu trứng và thân Cầu gai vàng.

4.3.3. Dạng phân tử phosphatidylethanolamine (PE)

Các dạng phân tử phosphatidyl ethanolamin:



Hình 4. 11. Cấu tạo chung dạng phân tử PE

Đầu phân cực PE chứa gốc etanolamin (C_2H_5N). Tùy thuộc vào cấu tạo của đuôi không phân cực, PE được chia thành 3 loại: diacyl, alkyl acyl, alkenyl acyl hoặc plasmalogen. Để nhận dạng phân tử của PE căn cứ vào 6 dấu hiệu:

- (i) Thời gian lưu dự kiến: $(3 - 5) \pm n$ phút.
- (ii) Trên event 3 xuất hiện ion $[M-H]^- m/z$ là số chẵn.
- (iii) Trên event 1, xuất hiện ion dương $[M+H]^+$ với cường độ peak đáng kể và $[M+H+Et_3N]^+$ với cường độ peak bé nên có thể không xuất hiện nếu hàm lượng PE bé.
- (iv) Khối lượng phân tử tùy thuộc vào cấu tạo của đuôi không phân cực, thường nằm trong khoảng 650 - 850 u.
- (v) Công thức phân tử tương ứng có dạng NO_8P hoặc NO_7P .
- (vi) Trên MS^{2-} thường xuất hiện peak acid hoặc peak acid mất CO_2 .



[M-H]⁻:

Accurate Mass Calculator

Mass Calculator

Formula Calculator

750.5445 Mr 751.5518 Ion: - Charge: 1 Adduct: H 6 hits:

Mass Type: Mono-isotopic

Error Margin: 0.015 Da

DBE Range: Fixed 0.0 - 30.0

Electron Ions: Both configurations

HC Ratio: Limit 0.0 - 3.0

Apply Nitrogen Rule

500 Maximum Results

#	Mass	Diff	Formula	DBE	Diff (ppm)
1	751.5516	0.00019	C43 H78 N O7 P	6.0	0.25
2	751.5540	0.00218	C50 H73 N O4	15.0	2.91
3	751.5457	0.00606	C50 H74 N O2 P	15.0	8.06
4	751.5446	0.00720	C39 H77 N O12	2.0	9.58
5	751.5598	0.00806	C43 H77 N O9	6.0	10.72
6	751.5387	0.01307	C46 H73 N O7	11.0	17.39

Calc. Formulae

[Adducts...](#)
[Advanced Settings...](#)
[Elements...](#)

[M+H]⁺:

Accurate Mass Calculator

Mass Calculator

Formula Calculator

752.5618 Mr 751.5545 Ion: + Charge: 1 Adduct: H 7 hits:

Mass Type: Mono-isotopic

Error Margin: 0.015 Da

DBE Range: Fixed 0.0 - 30.0

Electron Ions: Both configurations

HC Ratio: Limit 0.0 - 3.0

Apply Nitrogen Rule

500 Maximum Results

#	Mass	Diff	Formula	DBE	Diff (ppm)
1	751.5540	0.00056	C50 H73 N O4	15.0	0.75
2	751.5516	0.00293	C43 H78 N O7 P	6.0	3.90
3	751.5598	0.00531	C43 H77 N O9	6.0	7.07
4	751.5457	0.00881	C50 H74 N O2 P	15.0	11.72
5	751.5446	0.00995	C39 H77 N O12	2.0	13.23
6	751.5668	0.01232	C47 H78 N O4 P	10.0	16.40
7	751.5692	0.01469	C54 H73 N O	19.0	19.55

Calc. Formulae

[Adducts...](#)
[Advanced Settings...](#)
[Elements...](#)

[M+H+ Et₃N]⁺:

Accurate Mass Calculator

Mass Calculator

Formula Calculator

853.6870 Mr 751.5593 Ion: + Charge: 1 Adduct: C6H16N 8 hits:

Mass Type: Mono-isotopic

Error Margin: 0.015 Da

DBE Range: Fixed 0.0 - 30.0

Electron Ions: Both configurations

HC Ratio: Limit 0.0 - 3.0

Apply Nitrogen Rule

500 Maximum Results

#	Mass	Diff	Formula	DBE	Diff (ppm)
1	751.5598	0.00056	C43 H77 N O9	6.0	0.74
2	751.5540	0.00531	C50 H73 N O4	15.0	7.07
3	751.5668	0.00757	C47 H78 N O4 P	10.0	10.07
4	751.5516	0.00768	C43 H78 N O7 P	6.0	10.22
5	751.5692	0.00994	C54 H73 N O	19.0	13.23
6	751.5727	0.01345	C40 H82 N O9 P	1.0	17.89
7	751.5457	0.01356	C50 H74 N O2 P	15.0	18.04
8	751.5446	0.01470	C39 H77 N O12	2.0	19.56

Calc. Formulae

[Adducts...](#)
[Advanced Settings...](#)
[Elements...](#)

Hình 4.12. Các event xuất hiện trên phân mềm khi giải phổ PE

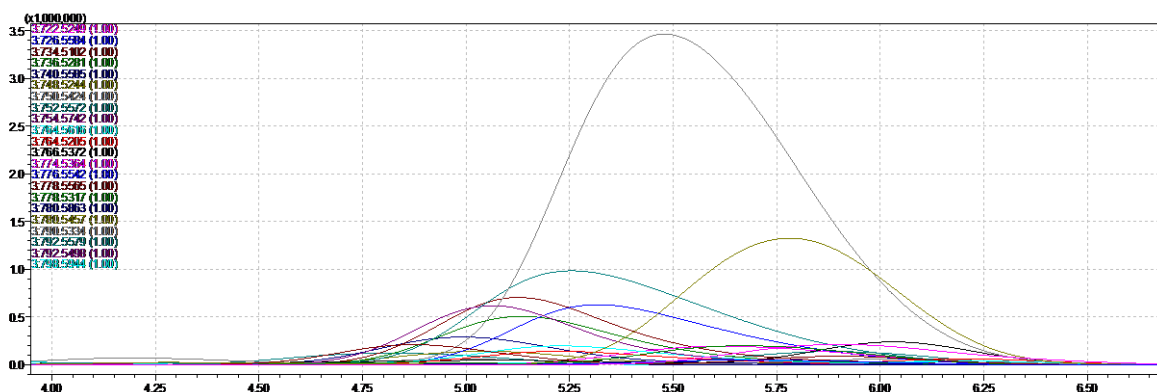
Bảng 4.10. Các dạng phân tử của lớp PE có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

Số TT	Dạng phân tử PE	Khối lượng phân tử [M-H] ⁻	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp PE (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
1.	PE 16:1e/20:4	722,5249	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	5,931	2,83	3,58
2.	PE 36:3e	726,5584	C ₄₁ H ₇₈ NO ₇ P	5,619	1,15	1,80
3.	PE 37:6e	734,5102	C ₄₂ H ₇₄ NO ₇ P	5,986	0,62	0,41
4.	PE 17:1e/20:4	736,5281	C ₄₂ H ₇₆ NO ₇ P	5,724	2,11	2,47
5.	PE 37:3e	740,5585	C ₄₂ H ₈₀ NO ₇ P	5,250	0,42	0,93
6.	PE 18:1e/20:5	748,5244	C₄₃H₇₆NO₇P	5,811	10,56	6,60
7.	PE 18:1e/20:4	750,5424	C₄₃H₇₈NO₇P	5,531	41,21	40,03
8.	PE 18:0e/20:4	752,5572	C₄₃H₈₀NO₇P	5,365	6,88	5,28
9.	PE18:1e/20:2	754,5742	C₄₃H₈₂NO₇P	5,141	7,98	13,68
10.	PE 19:1e/20:4	764,5616	C ₄₄ H ₈₀ NO ₇ P	5,304	1,85	1,63
11.	PE 18:1/20:4	764,5205	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P	6,382	1,41	2,95
12.	PE 18:0/20:4	766,5372	C ₄₃ H ₇₈ NO ₈ P	6,161	2,52	3,41
13.	PE 20:2e/20:5	774,5364	C ₄₅ H ₇₈ NO ₇ P	5,662	1,62	0,97
14.	PE 20:2e/20:4	776,5542	C₄₅H₈₀NO₇P	5,381	6,58	4,41
15.	PE 20:1e/20:4	778,5565	C₄₅H₈₂NO₇P	5,205	6,56	5,25
16.	PE 39:5	778,5317	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	6,057	0,31	0,14
17.	PE 20:2e/20:2	780,5863	C ₄₅ H ₈₄ NO ₇ P	5,075	2,25	2,34
18.	PE 39:4	780,5457	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	5,085	0,14	0,11
19.	PE 40:8e	790,5334	C ₄₅ H ₇₈ NO ₈ P	6,204	0,53	0,59
20.	PE 20:1/20:4	792,5579	C ₄₅ H ₈₀ NO ₈ P	4,945	1,07	1,12
21.	PE 20:1/20:4 isomer	792,5498	C ₄₅ H ₈₀ NO ₈ P	5,996	1,44	1,77
22.	PE 20:1/20:1	798,5944	C ₄₅ H ₈₆ NO ₈ P	5,237	0,27	0,54

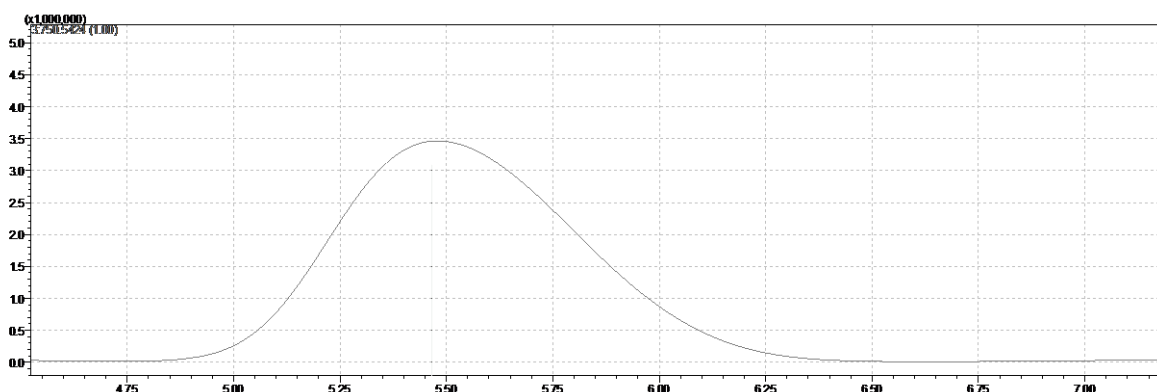
Bảng 4.11. Các dạng phân tử của lớp PE có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai đen *Diadema savignyi*

No.	Dạng phân tử PE	Khối lượng phân tử [M-H]	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp PE (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
1.	PE 16:1e/20:4	722,5249	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	5,789	1,945	2,414
2.	PE 36:3e	726,5584	C ₄₁ H ₇₈ NO ₇ P	5,469	0,414	1,316
3.	PE 37:6e	734,5102	C ₄₂ H ₇₄ NO ₇ P	6,054	0,262	0,682
4.	PE 17:1e/20:4	736,5281	C₄₂H₇₆NO₇P	5,610	4,509	4,782
5.	PE 16:0/20:4	738,5022	C ₄₁ H ₇₄ NO ₈ P	6,392	0,965	0,180
6.	PE 37:3e	740,5585	C ₄₂ H ₈₀ NO ₇ P	5,137	0,409	1,321
7.	PE 18:1e/20:5	748,5244	C ₄₃ H ₇₆ NO ₇ P	5,691	3,146	3,340
8.	PE 18:1e/20:4	750,5424	C₄₃H₇₈NO₇P	5,421	41,983	40,992
9.	PE 18:0e/20:4	752,5572	C₄₃H₈₀NO₇P	5,283	5,460	4,646
10.	PE18:1e/20:2	754,5742	C₄₃H₈₂NO₇P	5,058	5,332	14,731
11.	PE 19:1e/20:4	764,5616	C ₄₄ H ₈₀ NO ₇ P	5,210	3,921	1,117
12.	PE 18:1/20:4	764,5205	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P	6,262	2,108	4,815
13.	PE 18:0/20:4	766,5372	C₄₃H₇₈NO₈P	6,026	11,491	4,381
14.	PE 20:2e/20:5	774,5364	C ₄₅ H ₇₈ NO ₇ P	5,516	0,587	0,707
15.	PE 20:2e/20:4	776,5542	C ₄₅ H ₈₀ NO ₇ P	5,255	2,536	3,099
16.	PE 20:1e/20:4	778,5565	C₄₅H₈₂NO₇P	5,172	3,152	4,644
17.	PE 39:5	778,5317	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	5,989	1,365	0,782
18.	PE 20:2e/20:2	780,5863	C ₄₅ H ₈₄ NO ₇ P	4,972	1,134	1,755
19.	PE 39:4	780,5457	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	5,867	1,738	0,697
20.	PE 40:8e	790,5334	C ₄₅ H ₇₈ NO ₈ P	6,068	1,119	0,653
21.	PE 20:1/20:4	792,5579	C ₄₅ H ₈₀ NO ₈ P	4,917	1,222	0,878
22.	PE 20:1/20:4 isomer	792,5498	C ₄₅ H ₈₀ NO ₈ P	5,829	4,743	1,888
23.	PE 20:1/20:1	798,5944	C ₄₅ H ₈₆ NO ₈ P	5,140	0,440	0,164

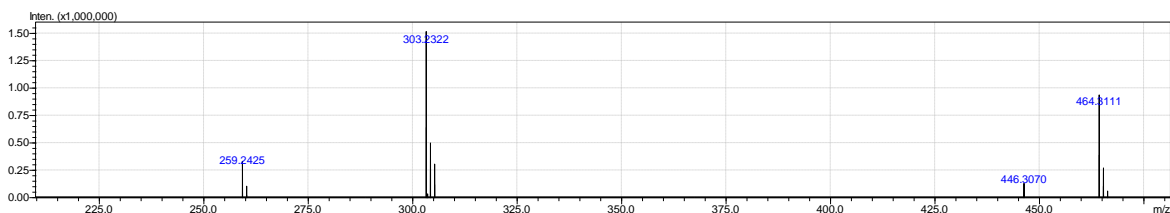
(A)



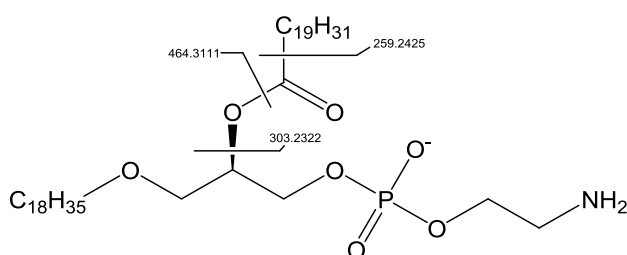
(B)



(C)



(D)



Hình 4.13. (A) HPLC–HR/MS phổ khối phân giải cao của tổng các dạng phân tử của lớp PE; (B) HPLC–HR/MS của một dạng phân tử PE với m/z 750,5424; (C) phân mảnh MS^{2-} của PE 18:1e/20:4; (D) Phân mảnh MS^{2-} của PE 38:5e (PE 18:1e/20:4)

Đối với phosphatidylethanolamine (PE), 22 dạng phân tử đã được tìm thấy trong mẫu Cầu gai vàng (Bảng 4.10 và Hình 4.13). Trong nghiên cứu này,

chữ “e” biểu thị đầu gắn với phân tử glycerol bằng liên kết ether. Trong 22 thành phần này có 3 thành phần hàm lượng cao (trên 10%) là PE 18:1e/20:5, PE 18:1e/20:4 và PE18:1e/20:2 chiếm tổng 59,75% trong trứng và 60,31% trong thân của tổng số PE. Các dạng phân tử PE còn lại đều có hàm lượng thấp dưới 10%.

Trong số các tín hiệu thu được của lớp chất PE, tín hiệu ion âm $[M-H]^-$ có cường độ mạnh nhất tại m/z 750,5424 cả ở mẫu trứng và thân Cầu gai vàng (41,21 và 40,03%); tín hiệu tương ứng với dạng phân tử PE chiếm hàm lượng cao nhất trong phân lớp này. Công thức phân tử tính toán được là $C_{43}H_{78}NO_7P$, với 7 nguyên tử O trong phân tử đây là một acylakyl PE. Trên phổ ion âm MS^{2-} của ion $[M-H]^-$ 750,5424 có xuất hiện các tín hiệu tại m/z 303,2322 tương ứng với anion của acid béo $C_{20}H_{32}O_2$ ($C_{19}H_{31}COOH$, 20:4n); tín hiệu tại m/z 259,2425 tương ứng với anion $C_{19}H_{32}$; tín hiệu tại m/z 464,3111 tương ứng với ion phân tử mất đi một mảnh trung hòa $C_{20}H_{30}O$ ($C_{19}H_{31}COOH - H_2O$); tín hiệu tại m/z 446,3070 tương ứng với ion phân tử mất đi một mảnh trung hòa là acid béo $C_{20}H_{32}O_2$ (Hình 4.13.C và 4.13.D).

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. Tương tự như với Cầu gai vàng, dạng phân tử PE 18:1e/20:4 chiếm tỉ lệ cao vượt trội ở cả mẫu trứng và mẫu thân (trên 40% trong tổng số PE). PE 18:0/20:4 là dạng PE phổ biến thứ 2 trong mẫu trứng Cầu gai đen với hàm lượng 11,491%. Ở mẫu thân Cầu gai đen thì dạng phân tử PE18:1e/20:2 lại là dạng PE phong phú thứ 2 với hàm lượng 14,731% trong tổng số các PE tìm thấy trong mẫu thân. Ngoài ra các thành phần PE khác tìm thấy trong cả mẫu trứng và mẫu thân Cầu gai vàng đều chiếm tỉ lệ không cao, hầu hết đều dưới 5%.

Bên cạnh đó, kết quả cũng cho thấy không có sự khác biệt trong các dạng phân tử PE được nhận biết trong cả mẫu trứng và mẫu thân của cả cầu gai vàng và Cầu gai đen.

4.3.4. Dạng phân tử acid phosphatidic (PA)

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, kết quả được thể hiện ở Bảng 4.12 và Bảng 4.13.

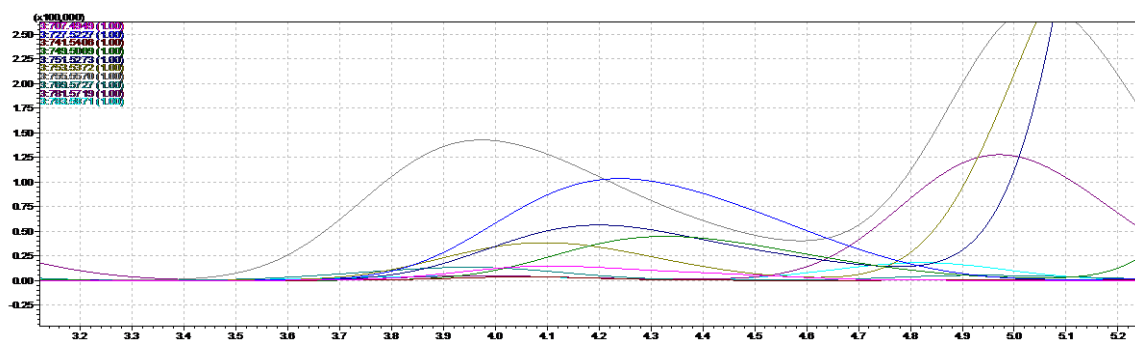
Bảng 4.12. Các dạng phân tử của lớp PA có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

STT	Dạng phân tử PA	Khối lượng phân tử [M-H] ⁻	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp PA (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
1.	PA 18:1e/20:4	707,4949	C ₄₁ H ₇₃ O ₇ P	4,131	3,09	2,64
2.	PA 20:1/18:1	727,5227	C ₄₁ H ₇₇ O ₈ P	4,162	19,18	1,72
3.	PA 38:1	729,5479	C ₄₁ H ₇₉ O ₈ P	2,064	1,07	1,70
4.	PA 39:2	741,5406	C ₄₂ H ₇₉ O ₈ P	4,074	2,17	3,43
5.	PA 40:5	749,5069	C ₄₃ H ₇₅ O ₈ P	4,329	7,95	6,29
6.	PA 40:4	751,5273	C ₄₃ H ₇₇ O ₈ P	4,200	8,76	3,45
7.	PA 40:3	753,5372	C ₄₃ H ₇₉ O ₈ P	4,105	6,07	4,84
8.	PA 20:1/20:1	755,5570	C ₄₃ H ₈₁ O ₈ P	3,904	52,42	52,60
9.	PA 20:1/21:1	769,5727	C ₄₄ H ₈₃ O ₈ P	3,953	6,69	10,75
10.	PA 20:1/22:2	781,5719	C ₄₅ H ₈₁ O ₈ P	3,963	3,96	7,06
11.	PA 42:2	783,5871	C ₄₅ H ₈₅ O ₈ P	3,915	2,83	5,52

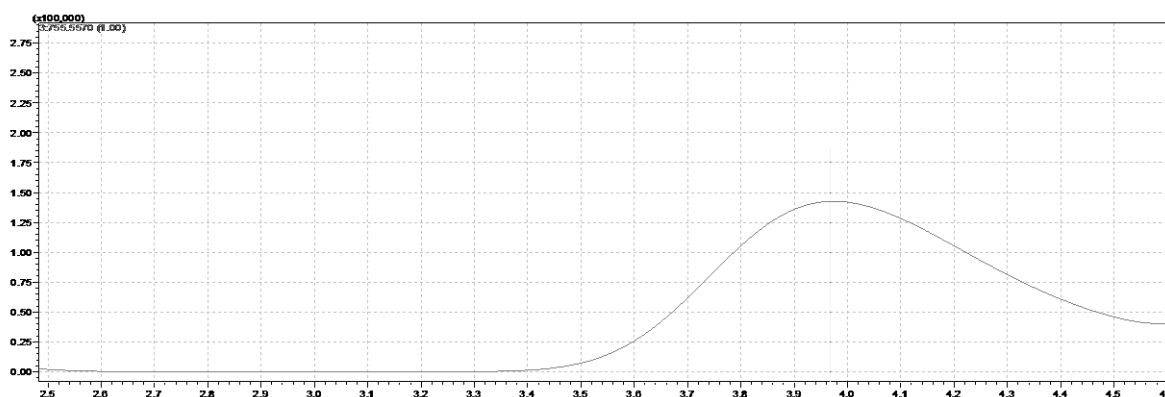
Bảng 4.13. Các dạng phân tử của lớp PA có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai đen *Diadema savignyi*

STT	Dạng phân tử PE	Khối lượng phân tử [M-H] ⁻	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp PE (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
1.	PA 18:1e/20:4	707,4949	C ₄₁ H ₇₃ O ₇ P	4,242	4,310	12,371
2.	PA 20:1/18:1	727,5227	C ₄₁ H ₇₇ O ₈ P	4,433	0,834	0,865
3.	PA 38:1	729,5479	C ₄₁ H ₇₉ O ₈ P	4,489	1,577	3,908
4.	PA 39:2	741,5406	C ₄₂ H ₇₉ O ₈ P	4,185	1,960	4,445
5.	PA 40:5	749,5069	C ₄₃ H ₇₅ O ₈ P	4,557	12,784	3,886
6.	PA 40:4	751,5273	C ₄₃ H ₇₇ O ₈ P	4,493	6,760	2,865
7.	PA 40:3	753,5372	C ₄₃ H ₇₉ O ₈ P	4,247	4,037	3,229
8.	PA 20:1/20:1	755,5570	C ₄₃ H ₈₁ O ₈ P	4,099	48,077	53,962
9.	PA 20:1/21:1	769,5727	C ₄₄ H ₈₃ O ₈ P	4,053	19,319	12,902
10.	PA 20:1/22:2	781,5719	C ₄₅ H ₈₁ O ₈ P	4,068	3,085	2,306
11.	PA 42:2	783,5871	C ₄₅ H ₈₅ O ₈ P	4,006	1,842	3,524

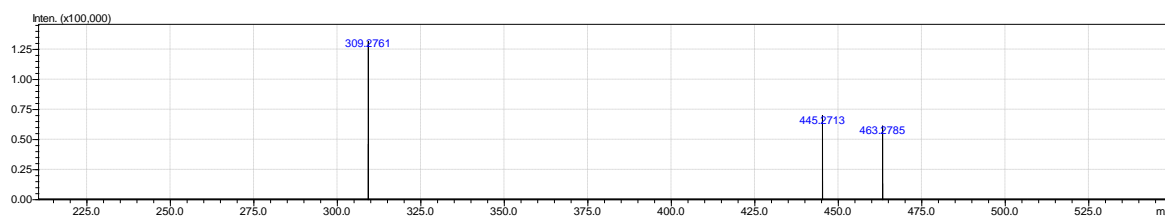
(A)



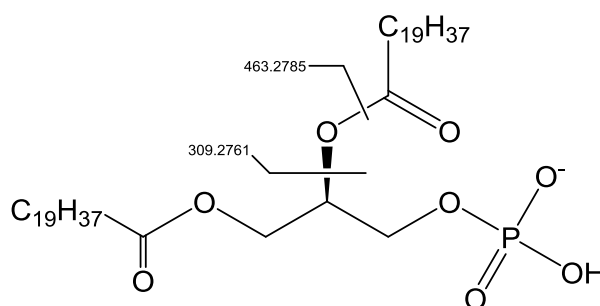
(B)



(C)



(D)



Hình 4.14. (A) HPLC–HR/MS phổ khối phân giải cao của tổng các dạng phân tử của lớp PA; (B) HPLC–HR/MS của một dạng phân tử PA với m/z 750,5424; (C) phân mảnh MS^{2-} của PA 20:1/20:1; (D) Phân mảnh MS^{2-} của PA 40:2 (PA 20:1/20:1)

Trong số các tín hiệu thu được, tín hiệu ion âm $[M-H]^-$ có cường độ mạnh nhất tại m/z 755,5570 cả ở mẫu trứng và thân Cầu gai đen và vàng; tín hiệu tương ứng với dạng phân tử PA chiếm hàm lượng cao nhất trong phân lớp này. Công thức phân tử tính toán được là $C_{43}H_{81}O_8P$, với 8 nguyên tử O trong phân tử, đây là một diacyl PA. Trên phổ ion âm MS^{2-} của ion $[M-H]^-$ 755,5570 có xuất hiện các tín hiệu tại m/z 309,2761 tương ứng với anion của acid béo $C_{20}H_{38}O_2$ (20:1n); tín hiệu tại m/z 463,2785 tương ứng với ion phân tử mất đi một mảnh trung hòa $C_{20}H_{36}O$ ($C_{19}H_{37}COOH - H_2O$); tín hiệu tại m/z 445,2713 tương ứng với ion phân tử mất đi một mảnh trung hòa là acid béo $C_{20}H_{38}O_2$ (Hình 4.14).

Sự khác biệt lớn nhất trong thành phần lớp chất PA giữa 2 mẫu thân và trứng Cầu gai là ở hàm lượng của dạng phân tử PA 20:1/18:1, ion âm $[M-H]^-$ cho tín hiệu tại m/z 727,5227, hàm lượng dạng phân tử PA 20:1/18:1 trong mẫu trứng Cầu gai *Tripneustes gratilla* là 19,18% trong khi số liệu này ở mẫu thân ghi nhận là 1,72%; tuy nhiên trong mẫu Cầu gai đen thì dạng phân tử PA này ở cả trứng và thân hoàn toàn tương đồng, đều khoảng 0,8%. Với mẫu thân Cầu gai vàng, có ghi nhận dạng PA 20:1/21:1 chiếm tỉ lệ cao thứ hai trong lớp PA với 10,75% và cao hơn so với trong mẫu trứng (6,69%). Ngược lại, với Cầu gai đen thì dạng PA này ở mẫu trứng lại cao hơn so với mẫu thân, chiếm 19,319 và 12,902% tương ứng.

Có một sự chênh lệch lớn về hàm lượng của PA 18:1e/20:4 trong mẫu thân và mẫu trứng Cầu gai đen; hàm lượng PA 18:1e/20:4 trong mẫu thân gấp 2,87 trong mẫu trứng. Dạng phân tử PA 40:5 là thành phần cao thứ 2 trong mẫu trứng Cầu gai đen (12,784%) và cao hơn vượt trội so với mẫu thân, chỉ chiếm 3,886%.

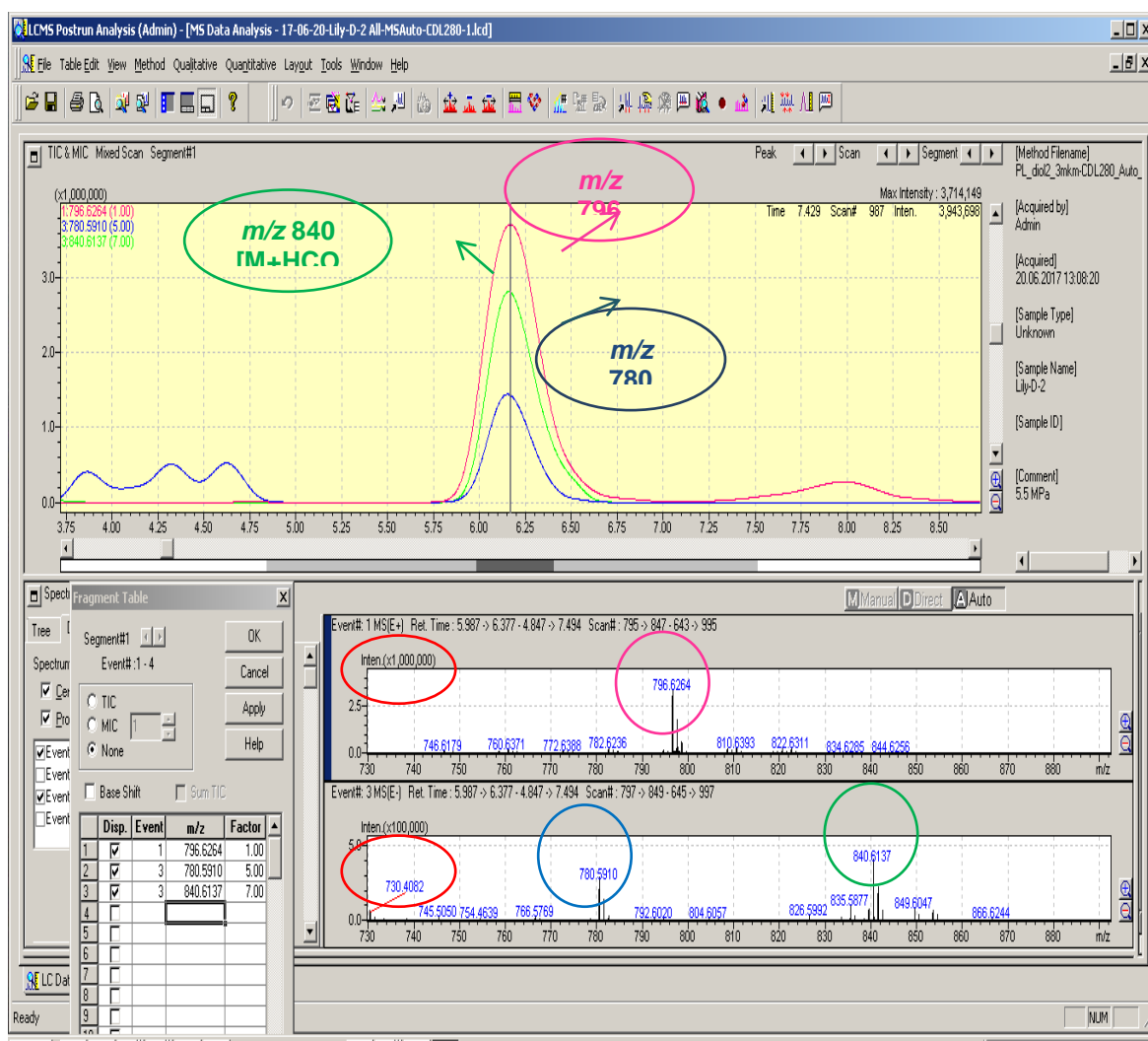
4.3.5. Dạng phân tử phosphatidylcholine (PC)

Các dạng phân tử phosphatidyl choline:

	Diacyl	Ankyl axyl hoặc Ankenyl axyl
CTPT	$C_xH_yNO_8P$	$C_xH_yNO_7P$
CTCT		

Đầu phân cực PC chứa gốc choline ($C_5H_{10}N$). Tùy thuộc vào cấu tạo của đuôi không phân cực, PC được chia thành 3 loại: diacyl, alkyl acyl, alkenyl acyl hoặc plasmalogen. Để nhận dạng phân tử của PC căn cứ vào 6 dấu hiệu:

- (i) Thời gian lưu dự kiến: $(5 - 9) \pm n$ phút.
- (ii) Trên event 3 không xuất hiện ion $[M-H]^-$, thay vào đó là các ion $[M+HCOO]^-$ và $[M-CH_3]^-$ với m/z là số chẵn.
- (iii) Trên event 1, xuất hiện ion dương $[M+H]^+$ với cường độ peak lớn nhất với m/z là số chẵn.
- (iv) Khối lượng phân tử tùy thuộc vào cấu tạo của đuôi không phân cực, thường nằm trong khoảng 700 - 900 u.
- (v) Công thức phân tử tương ứng có dạng NO_8P hoặc NO_7P .
- (vi) Trên MS^2 của ion $[M+HCOO]^-$ thường xuất hiện peak $[M-CH_3]^-$ cách nhau 60 u.
- Như vậy CTPT của PE và PC giống nhau, khoảng thời gian lưu dự kiến gần nhau nên dễ bị nhầm giữa hai dạng. Cần xem xét kỹ dấu hiệu số (ii), (iii) và (iv) để không bị nhầm lẫn.



[M+H]⁺:

Accurate Mass Calculator

Mass Calculator

Formula Calculator

796.6264 Mr 795.6191 Ion: + Charge: 1 Adduct: H 7 hits:

Mass Type: Mono-isotopic

Error Margin: 0.015 Da

DBE Range: Fixed 0.0 - 30.0

Electron Ions: Both configurations

HC Ratio: Limit 0.0 - 3.0

Apply Nitrogen Rule

500 Maximum Results

#	Mass	Diff	Formula	DBE	Diff (ppm)
1	795.6166	0.00256	C53 H81 N O4	14.0	3.22
2	795.6224	0.00331	C46 H85 N O9	5.0	4.16
3	795.6142	0.00493	C46 H86 N O7 P	5.0	6.20
4	795.6294	0.01032	C50 H86 N O4 P	9.0	12.97
5	795.6083	0.01081	C53 H82 N O2 P	14.0	13.58
6	795.6072	0.01195	C42 H85 N O12	1.0	15.01
7	795.6318	0.01269	C57 H81 N O	18.0	15.95

Calc. Formulae

Adducts...
Advanced Settings...
Elements...

[M+HCOO]⁻:

Accurate Mass Calculator

Mass Calculator

Formula Calculator

840.6137 Mr 795.6155 Ion: - Charge: 1 Adduct: HCOO 7 hits:

Mass Type: Mono-isotopic

Error Margin: 0.015 Da

DBE Range: Fixed 0.0 - 30.0

Electron Ions: Both configurations

HC Ratio: Limit 0.0 - 3.0

Apply Nitrogen Rule

500 Maximum Results

#	Mass	Diff	Formula	DBE	Diff (ppm)
1	795.6166	0.00106	C53 H81 N O4	14.0	1.34
2	795.6142	0.00131	C46 H86 N O7 P	5.0	1.64
3	795.6224	0.00694	C46 H85 N O9	5.0	8.72
4	795.6083	0.00718	C53 H82 N O2 P	14.0	9.02
5	795.6072	0.00832	C42 H85 N O12	1.0	10.46
6	795.6294	0.01395	C50 H86 N O4 P	9.0	17.53
7	795.6013	0.01419	C49 H81 N O7	10.0	17.84

Calc. Formulae

Adducts...
Advanced Settings...
Elements...

[M-CH₃]⁺:

Accurate Mass Calculator

Mass Calculator

Formula Calculator

780.5910 Mr 781.5983 Ion: - Charge: 1 Adduct: H 7 hits:

Mass Type: Mono-isotopic

Error Margin: 0.015 Da

DBE Range: Fixed 0.0 - 30.0

Electron Ions: Both configurations

HC Ratio: Limit 0.0 - 3.0

Apply Nitrogen Rule

500 Maximum Results

#	Mass	Diff	Formula	DBE	Diff (ppm)
1	781.5985	0.00026	C45 H84 N O7 P	5.0	0.34
2	781.6009	0.00263	C52 H79 N O4	14.0	3.37
3	781.5927	0.00561	C52 H80 N O2 P	14.0	7.18
4	781.5915	0.00675	C41 H83 N O12	1.0	8.63
5	781.6068	0.00851	C45 H83 N O9	5.0	10.88
6	781.5857	0.01262	C48 H79 N O7	10.0	16.15
7	781.5833	0.01499	C41 H84 N O10 P	1.0	19.18

Calc. Formulae

Adducts...
Advanced Settings...
Elements...

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 (Bảng 4.14 và Bảng 4.15 tương ứng). Trong đó tín hiệu ion phân tử dương $[M+H]^+$ tại m/z 782,5703 có cường độ mạnh nhất. Những tín hiệu đồng thời quan sát được trên phổ ion âm của các ion $[M+CH_3COO]^-$ và $[M-CH_3]^-$ tại m/z 826,5642 và 766,5371 (Hình 4.15). Công thức phân tử tính toán được là $C_{44}H_{80}NO_8P$, với 8 nguyên tử O trong phân tử và đây là một diacyl PC.

Bảng 4.14. Các dạng phân tử của lớp PC có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai vàng *Tripneustes gratilla*

TT	Dạng phân tử PC	Khối lượng phân tử $[M+H]^+$	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp PC (%)	
					Trứng	Thân
1.	PC 30:0e	692,5549	$C_{38}H_{78}NO_7P$	8,461	0,61	0,85
2.	PC 14:0/16:1	704,5201	$C_{38}H_{74}NO_8P$	10,767	1,05	0,69
3.	PC 31:0e	706,5763	$C_{39}H_{80}NO_7P$	4,094	0,21	0,27
4.	PC 14:0/16:0	706,5381	$C_{38}H_{76}NO_8P$	10,214	1,33	1,95
5.	PC 16:0e/16:1	718,5753	$C_{40}H_{80}NO_7P$	8,261	0,67	1,38
6.	PC 31:1	718,5373	$C_{39}H_{76}NO_8P/4$	10,245	0,12	0,15
7.	PC 32:0e	720,5907	$C_{40}H_{82}NO_7P$	7,923	0,69	1,27
8.	PC 31:0	720,5506	$C_{39}H_{78}NO_8P$	9,700	0,20	0,28
9.	PC 32:2	730,5374	$C_{40}H_{76}NO_8P$	10,409	0,78	0,68
10.	PC 33:1e	732,5879	$C_{41}H_{82}NO_7P/3$	7,898	0,22	0,41
11.	PC 16:0/16:1	732,5615	$C_{40}H_{78}NO_8P$	9,851	3,08	3,16
12.	PC 33:0e	734,6039	$C_{41}H_{84}NO_7P/2$	7,650	0,35	0,21
13.	PC 16:0/16:0	734,5714	$C_{40}H_{80}NO_8P$	9,651	1,46	2,25
14.	PC 34:4e	740,563	$C_{42}H_{78}NO_7P$	8,625	0,17	0,28
15.	PC 34:3e	742,5725	$C_{42}H_{80}NO_7P$	8,365	0,18	0,26
16.	PC 34:2e	744,5921	$C_{42}H_{82}NO_7P$	8,022	0,23	0,31
17.	PC 33:2	744,5538	$C_{41}H_{78}NO_8P$	10,034	0,08	0,15
18.	PC 16:0e/18:1	746,6071	$C_{42}H_{84}NO_7P$	7,637	0,87	1,20

TT	Dạng phân tử PC	Khối lượng phân tử $[M+H]^+$	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp PC (%)	
					Trứng	Thân
19.	PC 17:0/16:1	746,5754	C ₄₁ H ₈₀ NO ₈ P	9,389	0,26	0,46
20.	PC 34:0e	748,6226	C ₄₂ H ₈₆ NO ₇ P	7,420	0,41	0,41
21.	PC 33:0	748,5921	C ₄₁ H ₈₂ NO ₈ P/3	9,003	0,27	0,18
22.	PC 35:4e	754,5794	C ₄₃ H ₈₀ NO ₇ P	8,230	0,08	0,11
23.	PC 34:4	754,5339	C ₄₂ H ₇₆ NO ₈ P	10,397	1,62	1,33
24.	PC 34:3	756,5537	C ₄₂ H ₇₈ NO ₈ P	10,019	1,66	1,37
25.	PC 16:1/18:1	758,5755	C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ P	9,515	1,55	1,33
26.	PC 16:0/18:1	760,5882	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	9,020	3,59	3,37
27.	PC 34:0	762,6052	C ₄₂ H ₈₄ NO ₈ P	8,757	0,86	0,55
28.	PC 16:0e/20:5	766,5762	C ₄₄ H ₈₀ NO ₇ P	8,282	2,06	2,17
29.	PC 16:0e/20:4	768,5954	C ₄₄ H ₈₂ NO ₇ P	7,904	3,60	4,36
30.	PC 16:0e/20:3	770,6110	C ₄₄ H ₈₄ NO ₇ P	7,759	0,77	1,05
31.	PC 36:2e	772,6268	C ₄₄ H ₈₀ NO ₇ P	7,416	0,50	0,63
32.	PC 35:2	772,5811	C ₄₃ H ₈₂ NO ₈ P	9,076	0,20	0,28
33.	PC 36:1e	774,6345	C ₄₄ H ₈₈ NO ₇ P	7,076	0,49	0,52
34.	PC 35:1	774,5959	C ₄₃ H ₈₄ NO ₈ P	8,695	0,19	0,33
35.	PC 36:6	778,5337	C ₄₄ H ₇₆ NO ₈ P	10,421	0,66	0,50
36.	PC 37:5e	780,5907	C ₄₅ H ₈₂ NO ₇ P	7,992	0,62	0,53
37.	PC 16:0/20:5	780,5498	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	9,905	3,46	2,77
38.	PC 17:0e/20:4	782,6112	C ₄₅ H ₈₄ NO ₇ P	7,605	0,98	1,01
39.	PC 16:0/20:4	782,5703	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	9,409	4,76	4,21
40.	PC 16:0/20:3	784,5843	C ₄₄ H ₈₂ NO ₈ P	9,175	2,63	2,66
41.	PC 16:0/20:2	786,6031	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	8,702	3,60	3,42
42.	PC 16:0/20:1	788,6177	C ₄₄ H ₈₆ NO ₈ P	8,446	1,12	1,66
43.	PC 38:6e	792,5874	C ₄₆ H ₈₂ NO ₇ P	8,067	0,70	0,62
44.	PC 18:0e/20:5	794,6091	C ₄₆ H ₈₄ NO ₇ P	7,697	4,26	3,85
45.	PC 18:0e/20:4	796,6243	C ₄₆ H ₈₆ NO ₇ P	7,320	7,77	7,18
46.	PC 18:0e/20:3	798,6404	C ₄₆ H ₈₈ NO ₇ P	7,009	2,01	2,55

TT	Dạng phân tử PC	Khối lượng phân tử [M+H] ⁺	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp PC (%)	
					Trứng	Thân
47.	PC 37:3	798,6045	C ₄₅ H ₈₄ NO ₈ P/6	8,783	0,17	0,16
48.	PC 18:0e/20:2	800,6484	C ₄₆ H ₉₀ NO ₇ P	6,837	1,32	1,37
49.	PC 37:2	800,6126	C ₄₅ H ₈₆ NO ₈ P/5	8,352	0,21	0,24
50.	PC 38:7	804,5497	C ₄₆ H ₇₈ NO ₈ P	10,103	0,87	0,62
51.	PC 38:6	806,5599	C ₄₆ H ₈₀ NO ₈ P	9,579	2,48	1,82
52.	PC 39:5e	808,6155	C ₄₇ H ₈₆ NO ₇ P	7,474	0,21	0,21
53.	PC 18:1/20:4	808,5769	C ₄₆ H ₈₂ NO ₈ P	9,086	4,00	3,05
54.	PC 39:4e	810,6348	C ₄₇ H ₈₈ NO ₇ P	7,047	0,34	0,31
55.	PC 18:0/20:4	810,6025	C ₄₆ H ₈₄ NO ₈ P	8,690	3,88	3,60
56.	PC 38:3	812,6167	C ₄₆ H ₈₆ NO ₈ P	8,377	1,69	1,55
57.	PC 18:1/20:1	814,6241	C ₄₆ H ₈₈ NO ₈ P	8,101	1,54	0,86
58.	PC 40:6e	820,6119	C ₄₈ H ₈₆ NO ₇ P	7,522	1,35	1,18
59.	PC 39:6	820,5864	C ₄₇ H ₈₂ NO ₈ P	9,069	0,19	0,17
60.	PC 20:1e/20:4	822,6367	C ₄₈ H ₈₈ NO ₇ P	7,138	3,11	3,03
61.	PC 39:5	822,5991	C ₄₇ H ₈₄ NO ₈ P	8,680	0,39	0,38
62.	PC 40:4e	824,6498	C ₄₈ H ₉₀ NO ₇ P	6,862	1,98	1,82
63.	PC 39:4	824,6192	C ₄₇ H ₈₆ NO ₈ P	8,355	0,21	0,21
64.	PC 40:9	828,5505	C ₄₈ H ₇₈ NO ₈ P	10,116	0,84	0,91
65.	PC 40:8	830,5639	C ₄₈ H ₈₀ NO ₈ P	9,650	1,28	1,37
66.	PC 40:7	832,5771	C ₄₈ H ₈₂ NO ₈ P	9,214	1,66	1,69
67.	PC 20:1/20:5	834,5997	C ₄₈ H ₈₄ NO ₈ P	8,722	3,38	3,15
68.	PC 41:5e	836,6457	C ₄₉ H ₉₀ NO ₇ P	6,924	0,30	0,42
69.	PC 20:1/20:4	836,6159	C ₄₈ H ₈₆ NO ₈ P	8,320	3,74	3,23
70.	PC 20:2/20:2	838,6321	C ₄₈ H ₈₈ NO ₈ P	8,023	1,95	1,82
71.	PC 40:3	840,6399	C ₄₈ H ₉₀ NO ₈ P	7,753	0,78	0,83
72.	PC 40:5e	850,6595	C ₅₀ H ₉₂ NO ₇ P/7	6,748	0,45	0,61
73.	PC 41:5	850,6241	C ₄₉ H ₈₈ NO ₈ P	8,121	0,19	0,22

Bảng 4.15. Các dạng phân tử của lớp PC có trong phospholipid của mẫu thân và trứng Cầu gai đen *Diadema savignyi*

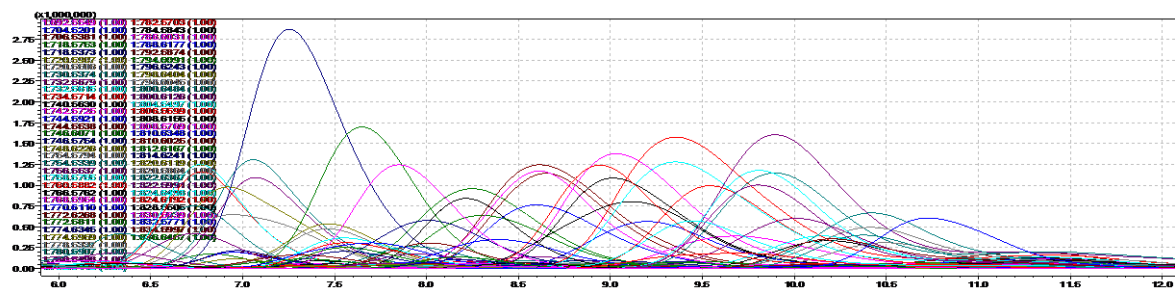
TT	Dạng phân tử PC	Khối lượng phân tử [M+H] ⁺	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp PC (%)	
					Trứng	Thân
1.	PC 30:0e	692,5549	C ₃₈ H ₇₈ NO ₇ P	8,950	0,61	0,85
2.	PC 14:0/16:1	704,5201	C ₃₈ H ₇₄ NO ₈ P	11,254	1,05	0,69
3.	PC 31:0e	706,5763	C ₃₉ H ₈₀ NO ₇ P	8,620	0,21	0,27
4.	PC 14:0/16:0	706,5381	C ₃₈ H ₇₆ NO ₈ P	10,742	1,33	1,95
5.	PC 16:0e/16:1	718,5753	C ₄₀ H ₈₀ NO ₇ P	8,635	0,67	1,38
6.	PC 31:1	718,5373	C ₃₉ H ₇₆ NO ₈ P/4	10,516	0,12	0,15
7.	PC 32:0e	720,5907	C ₄₀ H ₈₂ NO ₇ P	8,279	0,69	1,27
8.	PC 31:0	720,5506	C ₃₉ H ₇₈ NO ₈ P	10,321	0,20	0,28
9.	PC 32:3	728,5211	C ₄₀ H ₇₄ NO ₈ P	10,715	0,359	0,464
10.	PC 32:2	730,5374	C ₄₀ H ₇₆ NO ₈ P	10,609	0,78	0,68
11.	PC 33:1e	732,5879	C ₄₁ H ₈₂ NO ₇ P/3	8,344	0,22	0,41
12.	PC 16:0/16:1	732,5615	C ₄₀ H ₇₈ NO ₈ P	10,371	3,08	3,16
13.	PC 33:0e	734,6039	C ₄₁ H ₈₄ NO ₇ P/2	7,991	0,35	0,21
14.	PC 16:0/16:0	734,5714	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	9,897	1,46	2,25
15.	PC 34:4e	740,563	C ₄₂ H ₇₈ NO ₇ P	8,929	0,17	0,28
16.	PC 34:3e	742,5725	C ₄₂ H ₈₀ NO ₇ P	8,379	0,18	0,26
17.	PC 34:2e	744,5921	C ₄₂ H ₈₂ NO ₇ P	10,136	0,23	0,31
18.	PC 33:2	744,5538	C ₄₁ H ₇₈ NO ₈ P	8,029	0,08	0,15
19.	PC 16:0e/18:1	746,6071	C ₄₂ H ₈₄ NO ₇ P	9,955	0,87	1,20
20.	PC 17:0/16:1	746,5754	C ₄₁ H ₈₀ NO ₈ P	7,707	0,26	0,46
21.	PC 34:0e	748,6226	C ₄₂ H ₈₆ NO ₇ P	9,491	0,41	0,41
22.	PC 33:0	748,5921	C ₄₁ H ₈₂ NO ₈ P/3	8,605	0,27	0,18
23.	PC 35:4e	754,5794	C ₄₃ H ₈₀ NO ₇ P	10,709	0,08	0,11
24.	PC 34:4	754,5339	C ₄₂ H ₇₆ NO ₈ P	10,360	1,62	1,33
25.	PC 34:3	756,5537	C ₄₂ H ₇₈ NO ₈ P	10,042	1,66	1,37
26.	PC 16:1/18:1	758,5755	C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ P	9,519	1,55	1,33
27.	PC 16:0/18:1	760,5882	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	9,180	3,59	3,37
28.	PC 34:0	762,6052	C ₄₂ H ₈₄ NO ₈ P	8,654	0,86	0,55
29.	PC 16:0e/20:5	766,5762	C ₄₄ H ₈₀ NO ₇ P	8,257	2,06	2,17

TT	Dạng phân tử PC	Khối lượng phân tử [M+H] ⁺	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp PC (%)	
					Trứng	Thân
30.	PC 16:0e/20:4	768,5954	C ₄₄ H ₈₂ NO ₇ P	8,213	3,60	4,36
31.	PC 16:0e/20:3	770,6110	C ₄₄ H ₈₄ NO ₇ P	7,762	0,77	1,05
32.	PC 36:2e	772,6268	C ₄₄ H ₈₀ NO ₇ P	9,504	0,50	0,63
33.	PC 35:2	772,5811	C ₄₃ H ₈₂ NO ₈ P	7,406	0,20	0,28
34.	PC 36:1e	774,6345	C ₄₄ H ₈₈ NO ₇ P	9,139	0,49	0,52
35.	PC 35:1	774,5959	C ₄₃ H ₈₄ NO ₈ P	10,825	0,19	0,33
36.	PC 36:6	778,5337	C ₄₄ H ₇₆ NO ₈ P	8,371	0,66	0,50
37.	PC 37:5e	780,5907	C ₄₅ H ₈₂ NO ₇ P	10,364	0,62	0,53
38.	PC 16:0/20:5	780,5498	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	7,969	3,46	2,77
39.	PC 17:0e/20:4	782,6112	C ₄₅ H ₈₄ NO ₇ P	9,811	0,98	1,01
40.	PC 16:0/20:4	782,5703	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	9,699	4,76	4,21
41.	PC 16:0/20:3	784,5843	C ₄₄ H ₈₂ NO ₈ P	9,210	2,63	2,66
42.	PC 16:0/20:2	786,6031	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	8,787	3,60	3,42
43.	PC 16:0/20:1	788,6177	C ₄₄ H ₈₆ NO ₈ P	8,429	1,12	1,66
44.	PC 38:6e	792,5874	C ₄₆ H ₈₂ NO ₇ P	8,041	0,70	0,62
45.	PC 18:0e/20:5	794,6091	C ₄₆ H ₈₄ NO ₇ P	9,973	4,26	3,85
46.	PC 37:5	794,5653	C ₄₅ H ₈₀ NO ₈ P	7,640	3,335	0,412
47.	PC 18:0e/20:4	796,6243	C ₄₆ H ₈₆ NO ₇ P	9,385	7,77	7,18
48.	PC 37:4	796,5884	C ₄₅ H ₈₂ NO ₈ P	7,485	0,531	1,073
49.	PC 18:0e/20:3	798,6404	C ₄₆ H ₈₈ NO ₇ P	9,339	2,01	2,55
50.	PC 37:3	798,6045	C ₄₅ H ₈₄ NO ₈ P/6	7,131	0,17	0,16
51.	PC 18:0e/20:2	800,6484	C ₄₆ H ₉₀ NO ₇ P	8,746	1,32	1,37
52.	PC 37:2	800,6126	C ₄₅ H ₈₆ NO ₈ P/5	10,505	0,21	0,24
53.	PC 38:7	804,5497	C ₄₆ H ₇₈ NO ₈ P	10,068	0,87	0,62
54.	PC 38:6	806,5599	C ₄₆ H ₈₀ NO ₈ P	7,803	2,48	1,82
55.	PC 39:5e	808,6155	C ₄₇ H ₈₆ NO ₇ P	9,498	0,21	0,21
56.	PC 18:1/20:4	808,5769	C ₄₆ H ₈₂ NO ₈ P	7,357	4,00	3,05
57.	PC 39:4e	810,6348	C ₄₇ H ₈₈ NO ₇ P	9,037	0,34	0,31
58.	PC 18:0/20:4	810,6025	C ₄₆ H ₈₄ NO ₈ P	8,947	3,88	3,60
59.	PC 38:3	812,6167	C ₄₆ H ₈₆ NO ₈ P	8,511	1,69	1,55
60.	PC 18:1/20:1	814,6241	C ₄₆ H ₈₈ NO ₈ P	7,845	1,54	0,86

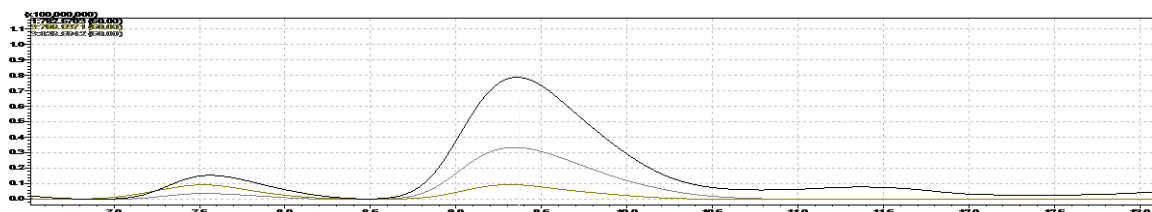
TT	Dạng phân tử PC	Khối lượng phân tử $[M+H]^+$	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp PC (%)	
					Trứng	Thân
61.	PC 40:6e	820,6119	$C_{48}H_{86}NO_7P$	9,471	1,35	1,18
62.	PC 39:6	820,5864	$C_{47}H_{82}NO_8P$	7,426	0,19	0,17
63.	PC 20:1e/20:4	822,6367	$C_{48}H_{88}NO_7P$	9,005	3,11	3,03
64.	PC 39:5	822,5991	$C_{47}H_{84}NO_8P$	7,204	0,39	0,38
65.	PC 40:4e	824,6498	$C_{48}H_{90}NO_7P$	8,697	1,98	1,82
66.	PC 39:4	824,6192	$C_{47}H_{86}NO_8P$	10,504	0,21	0,21
67.	PC 40:9	828,5505	$C_{48}H_{78}NO_8P$	10,023	0,84	0,91
68.	PC 40:8	830,5639	$C_{48}H_{80}NO_8P$	9,663	1,28	1,37
69.	PC 40:7	832,5771	$C_{48}H_{82}NO_8P$	9,156	1,66	1,69
70.	PC 20:1/20:5	834,5997	$C_{48}H_{84}NO_8P$	7,205	3,38	3,15
71.	PC 41:5e	836,6457	$C_{49}H_{90}NO_7P$	8,680	0,30	0,42
72.	PC 20:1/20:4	836,6159	$C_{48}H_{86}NO_8P$	7,047	3,74	3,23
73.	PC 20:2/20:2	838,6321	$C_{48}H_{88}NO_8P$	8,486	1,95	1,82
74.	PC 41:4e	838,6633	$C_{49}H_{92}NO_7P$	8,188	2,638	0,204
75.	PC 40:3	840,6399	$C_{48}H_{90}NO_8P$	7,067	0,78	0,83
76.	PC 40:5e	850,6595	$C_{50}H_{92}NO_7P/7$	8,456	0,45	0,61
77.	PC 41:5	850,6241	$C_{49}H_{88}NO_8P$	8,121	0,19	0,22

Trên phổ ion âm MS^{2-} của ion $[M+CH_3COO]^-$ 826,5642 có xuất hiện tín hiệu tại m/z 766,5360 tương ứng với anion $[M+CH_3COO-C_3H_6O_2]^-$ (Hình 4.15.C). Trên phổ MS^{2-} của ion mạnh 766,5371 cho các ion mảnh như sau: ion có tín hiệu tại m/z 255,2389 tương ứng với anion của acid béo $C_{16}H_{32}O_2$ (16:0); ion có tín hiệu tại m/z 303,2370 tương ứng với anion của acid béo $C_{20}H_{32}O_2$ (20:4n); ion có tín hiệu tại 480,3035 tương ứng với ion phân tử mất đi một mảnh trung hòa $C_{20}H_{30}O$ ($C_{19}H_{31}COOH - H_2O$) (Hình 4.15.D). Ngoài ra, cấu trúc hóa học của PC 16:0/20:4 phù hợp với các thông tin thu được, dạng phân tử PC xác định được là PC 16:0/20:4.

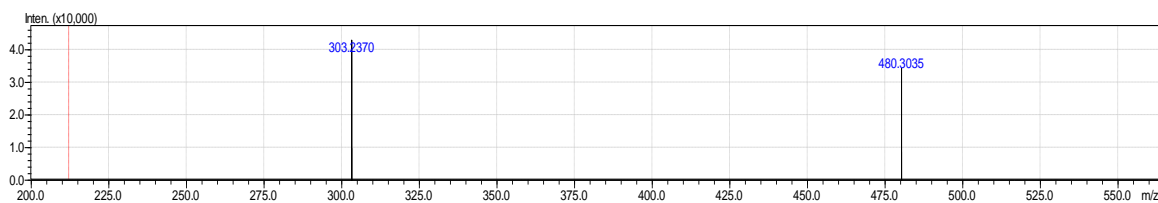
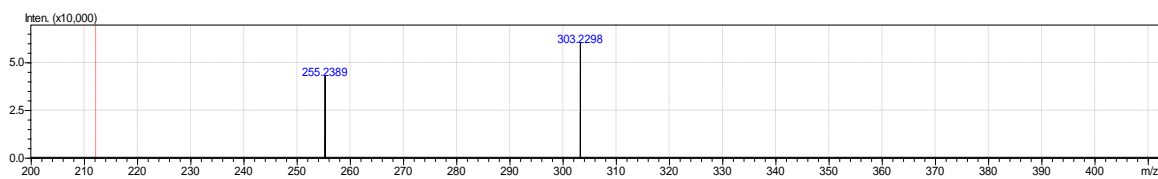
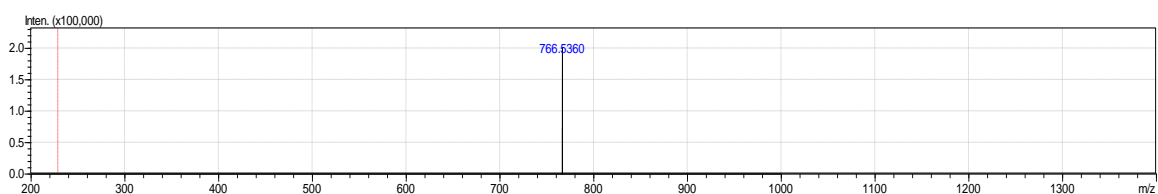
(A)



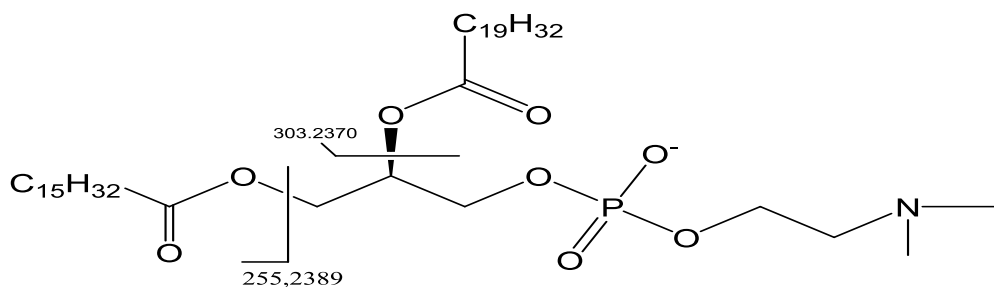
(B)



(C)



(D)



Hình 4.15. (A) HPLC–HR/MS phổ khối phân giải cao của tổng các dạng phân tử của lớp PC; (B) HPLC–HR/MS của một dạng phân tử PC với m/z 782,5703; (C) phân mảnh MS^{2-} của PC 16:0/20:4; (D) Phân mảnh MS^{2-} của PC 36:4 (PC 16:0/20:4)

4.3.6. Dạng phân tử lyso phosphatidylcholine (LPC)

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. Kết quả được thể hiện ở Bảng 4.16 và Bảng 4.16 tương ứng.

Bảng 4.16. Các dạng phân tử LPC trong mẫu trứng và thân Cầu gai vàng

TT	Dạng phân tử LPC	Khối lượng phân tử [M-H]	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp LPC (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
1.	LPC 16:0e	482,3601	C ₂₄ H ₅₂ NO ₆ P	20,993	5,402	7,764
2.	LPC 17:0e	496,376	C ₂₅ H ₅₄ NO ₆ P	20,477	1,836	2,654
3.	LPC 16:0	496,3389	C ₂₄ H ₅₀ N O ₇ P	22,802	14,157	10,330
4.	LPC 18:1e	508,3753	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	19,063	1,716	1,480
5.	LPC 18:1e isomer	508,3739	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	20,711	0,789	1,043
6.	LPC 18:0e	510,3911	C ₂₆ H ₅₆ NO ₆ P	19,874	17,392	21,347
7.	LPC 18:0e isomer	510,3911	C ₂₆ H ₅₆ NO ₆ P	21,839	0,353	0,327
8.	LPC 18:2	520,3392	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	23,812	1,562	0,859
9.	LPC 18:1	522,3547	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	22,051	10,172	6,827
10.	LPC 18:0	524,3721	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	21,254	4,424	3,991
11.	LPC 20:1e	536,4066	C ₂₈ H ₅₈ NO ₆ P	19,523	5,121	7,153
12.	LPC 19:1	536,3721	C ₂₇ H ₅₄ NO ₇ P	21,077	1,078	0,932
13.	LPC 19:0	538,3849	C ₂₇ H ₅₆ NO ₇ P	20,799	0,381	0,357
14.	LPC 20:0e	538,4207	C ₂₈ H ₆₀ NO ₆ P	19,151	0,325	0,508
15.	LPC 20:4	544,3395	C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P	23,820	4,361	5,011
16.	LPC 20:3	546,3562	C ₂₈ H ₅₂ NO ₇ P	22,642	3,073	2,304
17.	LPC 20:2	548,3693	C ₂₈ H ₅₄ NO ₇ P	21,454	6,567	5,875
18.	LPC 20:1	550,3858	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	20,688	16,611	16,200
19.	LPC 20:0	552,4009	C ₂₈ H ₅₈ NO ₇ P	20,320	2,716	2,623
20.	LPC 21:1	564,4007	C ₂₉ H ₅₈ NO ₇ P	20,515	1,057	1,401
21.	LPC 22:1	578,4175	C ₃₀ H ₆₀ NO ₇ P	20,040	1,028	1,125

Bảng 4.17. Các dạng phân tử LPC trong mẫu thân và trứng Cầu gai đen

TT	Dạng phân tử LPC	Khối lượng phân tử [M-H] ⁻	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp LPC (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
1.	LPC 16:0e	482,3601	C ₂₄ H ₅₂ NO ₆ P	22,265	3,343	6,209
2.	LPC 17:0e	496,376	C ₂₅ H ₅₄ NO ₆ P	21,515	1,897	2,908
3.	LPC 16:0	496,3389	C ₂₄ H ₅₀ N O ₇ P	25,212	10,815	9,586
4.	LPC 18:1e	508,3753	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	19,424	1,443	1,229
5.	LPC 18:1e isomer	508,3739	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	21,628	0,237	0,280
6.	LPC 18:0e	510,3911	C ₂₆ H ₅₆ NO ₆ P	20,850	13,863	14,659
7.	LPC 18:0e isomer	510,3911	C ₂₆ H ₅₆ NO ₆ P	22,699	0,713	
8.	LPC 18:1	522,3547	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	24,289	1,735	5,799
9.	LPC 18:0	524,3721	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	22,452	9,110	4,969
10.	LPC 20:1e	536,4066	C ₂₈ H ₅₈ NO ₆ P	20,480	2,377	2,664
11.	LPC 19:1	536,3721	C ₂₇ H ₅₄ NO ₇ P	22,314	3,329	2,461
12.	LPC 19:0	538,3849	C ₂₇ H ₅₆ NO ₇ P	21,994	0,692	0,283
13.	LPC 20:0e	538,4207	C ₂₈ H ₆₀ NO ₆ P	18,665	0,257	0,299
14.	LPC 20:4	544,3395	C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P	23,806	8,485	6,238
15.	LPC 20:4 isomer	544,3395	C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P	26,405	26,596	21,781
16.	LPC 20:3	546,3562	C ₂₈ H ₅₂ NO ₇ P	22,862	1,179	1,723
17.	LPC 20:2	548,3693	C ₂₈ H ₅₄ NO ₇ P	22,543	5,642	6,962
18.	LPC 20:1	550,3858	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	21,888	10,513	11,379
19.	LPC 20:0	552,4009	C ₂₈ H ₅₈ NO ₇ P	21,255	0,172	0,957
20.	LPC 21:1	564,4007	C ₂₉ H ₅₈ NO ₇ P	21,501	0,039	0,385

Kết quả nhận dạng cho thấy LPC 18: 0e là thành phần chiếm tỉ lệ cao nhất trong cả mẫu thân và trứng Cầu gai vàng với tỉ lệ 17,392 và 21,347% trong trứng và thân, tiếp theo dạng phân tử phổ biến thứ hai trong lớp LPC của mẫu Cầu gai vàng là LPC 20:1, chiếm 16,611 và 16,20% (tương ứng trong trứng và thân). Ngoài ra còn một số thành phần LPC khác có tỉ lệ thấp hơn xếp ở nhóm cao thứ 3 bao gồm: LPC 16:0; LPC 18:1; LPC 20:2 và LPC 16:0e. Còn lại hầu hết các LPC khác trong mẫu thân và trứng Cầu gai vàng đều có hàm lượng thấp, chiếm dưới 5%.

Với mẫu Cầu gai đen, thì LPC 20:4 isomer là dạng LPC chiếm tỉ lệ cao nhất với 26,596% trong trứng và 21,781 trong thân. Một số LPC khác trong mẫu trứng và thân Cầu gai đen có tỉ lệ thấp hơn và xếp ở nhóm cao thứ 2 bao gồm: LPC 16:0; LPC 18:0e; LPC 18:0; LPC 20:4 và LPC 20:1 và đặc biệt tỉ lệ của các LPC này trong mẫu

thân và trứng Cầu gai vàng đều tương đồng nhau, không có sự chênh lệch quá lớn. Những LPC khác có trong thân và trứng Cầu gai đen đều chiếm tỉ lệ nhỏ, hầu hết thấp hơn 3%.

4.3.7. *Dạng phân tử lysophosphatidylethanolamine (LPE)*

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. Cấu trúc của chúng bao gồm một xương sống glycerol liên kết với một acid béo và một phân tử phosphoethanolamine. Acid béo có thể có chiều dài thay đổi, được hydroxyl hóa và chứa liên kết đôi.

Lyso-phosphatidyl-ethanolamines tham gia vào các quá trình của tế bào hạn như sự biệt hóa và di chuyển của một số tế bào thần kinh, mà còn của các tế bào ung thư khác nhau. Ở thực vật, LPE hoạt động như chất ức chế enzyme chủ chốt trong quá trình thoái hóa lipid màng, do đó làm chậm quá trình lão hóa của lá, hoa và quả. Chúng được sử dụng để kích thích quá trình chín và kéo dài thời hạn sử dụng của trái cây, đồng thời tăng tuổi thọ của hoa đã cắt. Hơn nữa, lipid LPE đóng vai trò là tiền chất của phosphatidyl-ethanolamine.

Các dạng phân tử LPE trong mẫu thân và trứng Cầu gai vàng, Cầu gai đen được báo cáo trong Bảng 4.18 và Bảng 4.19. Kết quả cho thấy có 10 dạng phân tử LPE được phát hiện trong cả hai loài Cầu gai.

Bảng 4.18. Các dạng phân tử LPE trong mẫu thân và trứng Cầu gai vàng

TT	Dạng phân tử LPE	Khối lượng phân tử [M-H] ⁻	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp LPE (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
1.	LPE 16:1e	436,2762	C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P	16,519	0,629	1,139
2.	LPE 17:1e	450,2921	C ₂₂ H ₄₆ NO ₆ P	15,939	2,329	4,775
3.	LPE 18:1e	464,3072	C ₂₃ H ₄₈ NO ₆ P	15,390	73,520	56,282
4.	LPE 19:1e	478,3274	C ₂₄ H ₅₀ NO ₆ P	15,005	0,399	1,723
5.	LPE 18:1	478,294	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	18,419	2,927	0,784
6.	LPE 18:0	480,3073	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	17,780	1,611	0,991
7.	LPE 20:2e	490,3214	C ₂₅ H ₅₀ NO ₆ P	15,133	10,832	3,232
8.	LPE 20:4	500,2773	C ₂₅ H ₄₄ NO ₇ P	19,119	7,287	21,236
9.	LPE 20:2	504,3083	C ₂₅ H ₄₈ NO ₇ P	17,870	5,070	7,453
10	LPE 20:1	506,3201	C ₂₅ H ₅₀ NO ₇ P	17,108	1,474	2,386

Bảng 4.19. Các dạng phân tử LPE trong mẫu thân và trứng Cầu gai đen

TT	Dạng phân tử LPE	Khối lượng phân tử [M-H] ⁺	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp LPE (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
1.	LPE 16:1e	436,2762	C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P	16,521	1,657	1,139
2.	LPE 17:1e	450,2921	C ₂₂ H ₄₆ NO ₆ P	15,914	5,406	4,775
3.	LPE 18:1e	464,3072	C ₂₃ H ₄₈ NO ₆ P	15,405	64,629	56,282
4.	LPE 19:1e	478,3274	C ₂₄ H ₅₀ NO ₆ P	15,004	1,810	1,723
5.	LPE 18:1	478,294	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	17,837	0,630	0,784
6.	LPE 18:0	480,3073	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	17,762	2,803	0,991
7.	LPE 20:2e	490,3214	C ₂₅ H ₅₀ NO ₆ P	15,097	3,553	3,232
8.	LPE 20:4	500,2773	C ₂₅ H ₄₄ NO ₇ P	19,110	13,377	21,236
9.	LPE 20:2	504,3083	C ₂₅ H ₄₈ NO ₇ P	17,882	1,679	7,453
10.	LPE 20:1	506,3201	C ₂₅ H ₅₀ NO ₇ P	17,116	4,456	2,386

Kết quả Bảng 4.18 và Bảng 4.19 cho thấy LPE 18:1e là dạng LPE chiếm ưu thế cao vượt trội trong mẫu trứng và thân Cầu gai đen và vàng, tỉ lệ đều chiếm trên 50%, đặc biệt trong trứng Cầu gai vàng chiếm 73,52% và trứng Cầu gai đen chiếm tới 64,629% trong lớp LPE. Tiếp theo là LPE 20:4 là dạng phân tử cao thứ 2 trong cả hai mẫu Cầu gai đen và Cầu gai vàng. Có sự khác biệt lớn về hàm lượng LPE 20:4 giữa mẫu thân và mẫu trứng của cả hai loại Cầu gai vàng, hàm lượng trong mẫu thân cao khoảng 3 lần so với mẫu trứng đối với Cầu gai vàng và khoảng 2 lần đối với Cầu gai đen. Hầu hết các LPE còn lại đều có hàm lượng dưới 5%.

4.3.8. Dạng phân tử sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG)

Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) là một sulfolipid được tìm thấy phổ biến trong các sinh vật hoạt động quang hợp. Nó đã thu hút nhiều sự chú ý trong những năm gần đây do các hoạt động sinh học của nó. SQDG tồn tại trong các loại sinh vật có quá trình quang hợp nhưng cũng tìm thấy trong một số sinh vật không xuất hiện quá trình quang hợp. SQDG từ tảo cát biển có thể kích hoạt tế bào DG (Tế bào đuôi gai) của hệ miễn dịch, tăng cường hệ miễn dịch. β -SQDG18 làm giảm kích

thước khối u và kéo dài thời gian sống sót của động vật trong một mô hình thử nghiệm tiêm vắc-xin chống lại khối u ác tính ở chuột [144].

Có 30 dạng phân tử SQDG đã được tìm thấy trong mẫu thân và trứng Cầu gai vàng và 23 dạng được tìm thấy trong trứng và thân Cầu gai đen, kết quả thể hiện ở Bảng 4.20 và Bảng 4.21.

Bảng 4.20. Các dạng phân tử SQDG trong mẫu thân và trứng Cầu gai vàng

TT	Dạng phân tử SQDG	Khối lượng phân tử [M-H]	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp SQDG (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
1.	SQDG 14:0/14:0	737,4496	C ₃₇ H ₇₀ O ₁₂ S	15,098	0,743	0,248
2.	SQDG 14:0/15:0	751,4643	C ₃₈ H ₇₂ O ₁₂ S	14,769	0,364	0,195
3.	SQDG 14:1/16:0	763,4623	C ₃₉ H ₇₂ O ₁₂ S	14,857	0,473	0,179
4.	SQDG 14:0/16:0	765,4712	C ₃₉ H ₇₄ O ₁₂ S	14,247	31,559	30,118
5.	SQDG 15:0/16:0	779,4931	C ₄₀ H ₇₆ O ₁₂ S	13,838	2,283	2,015
6.	SQDG 16:0/16:1	791,4901	C ₄₁ H ₇₆ O ₁₂ S	13,913	2,465	2,056
7.	SQDG 16:0/16:0	793,5043	C ₄₁ H ₇₈ O ₁₂ S	13,344	29,536	38,661
8.	SQDG 16:0/17:0	807,5323	C ₄₂ H ₈₀ O ₁₂ S	12,892	1,099	1,274
9.	SQDG 16:0/18:1	819,5347	C ₄₃ H ₈₀ O ₁₂ S	12,915	1,912	3,092
10.	SQDG 16:0/18:0	821,552	C ₄₃ H ₈₂ O ₁₂ S	12,564	1,188	1,026
11.	SQDG 16:0/20:2	845,5552	C ₄₅ H ₈₂ O ₁₂ S	12,692	0,604	0,334
12.	SQDG 16:0/20:1	847,5711	C ₄₅ H ₈₄ O ₁₂ S	12,238	2,502	1,271
13.	SQDG 14:0/23:1	861,5811	C ₄₆ H ₈₆ O ₁₂ S	11,848	0,730	0,598
14.	SQDG 16:0/21:0	863,5972	C ₄₆ H ₈₆ O ₁₂ S	11,100	0,180	0,074
15.	SQDG 16:0/22:4	869,5519	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₂ S	12,804	0,417	0,188
16.	SQDG 16:0/22:3	871,5641	C ₄₇ H ₈₄ O ₁₂ S	12,458	0,737	0,328
17.	SQDG 16:0/22:2	873,5832	C ₄₇ H ₈₆ O ₁₂ S	11,927	1,335	0,614
18.	SQDG 16:0/22:1	875,5988	C ₄₇ H ₈₈ O ₁₂ S	11,338	13,584	10,479
19.	SQDG 16:0/22:0	877,6179	C ₄₇ H ₉₀ O ₁₂ S	10,933	0,399	0,273
20.	SQDG 16:0/23:4	883,5646	C ₄₈ H ₈₄ O ₁₂ S	11,997	0,178	0,044
21.	SQDG 16:0/23:2	887,5957	C ₄₈ H ₈₈ O ₁₂ S	11,577	0,095	0,044
22.	SQDG 16:0/23:1	889,6142	C ₄₈ H ₉₀ O ₁₂ S	10,991	2,310	2,647
23.	SQDG 16:0/23:0	891,6253	C ₄₈ H ₉₂ O ₁₂ S	10,629	0,117	0,070
24.	SQDG 16:0/24:5	895,5635	C ₄₉ H ₈₄ O ₁₂ S	12,555	0,366	0,130
25.	SQDG 16:0/24:4	897,5773	C ₄₉ H ₈₆ O ₁₂ S	12,063	0,380	0,139
26.	SQDG 16:0/24:2	901,6077	C ₄₉ H ₉₀ O ₁₂ S	11,337	0,669	0,372
27.	SQDG 16:0/24:1	903,6263	C ₄₉ H ₉₂ O ₁₂ S	10,672	3,557	3,452
28.	SQDG 16:0/24:0	905,6381	C ₄₉ H ₉₄ O ₁₂ S	10,273	0,079	0,030
29.	SQDG 18:1/24:1	929,6293	C ₅₁ H ₉₄ O ₁₂ S	10,349	0,094	0,033
30.	SQDG 42:1	931,6434	C ₅₁ H ₉₆ O ₁₂ S	10,092	0,044	0,017

Bảng 4.21. Các dạng phân tử SQDG trong mẫu thân và trứng Cầu gai đen

TT	Dạng phân tử SQDG	Khối lượng phân tử [M-H] ⁻	Công thức phân tử (MF)	Thời gian lưu (Rt, phút)	Tỉ lệ trong lớp SQDG (%)	
					Mẫu trứng	Mẫu thân
1.	SQDG 14:0/14:0	737,4496	C ₃₇ H ₇₀ O ₁₂ S	15,602	0,090	0,089
2.	SQDG 14:0/15:0	751,4643	C ₃₈ H ₇₂ O ₁₂ S	11,933	0,385	0,088
3.	SQDG 14:1/16:0	763,4623	C ₃₉ H ₇₂ O ₁₂ S	15,163	0,073	0,085
4.	SQDG 14:0/16:0	765,4712	C ₃₉ H ₇₄ O ₁₂ S	14,777	10,450	8,775
5.	SQDG 15:0/16:0	779,4931	C ₄₀ H ₇₆ O ₁₂ S	14,452	2,126	1,935
6.	SQDG 16:0/16:1	791,4901	C ₄₁ H ₇₆ O ₁₂ S	14,511	1,980	1,367
7.	SQDG 16:0/16:0	793,5043	C ₄₁ H ₇₈ O ₁₂ S	13,873	72,195	67,715
8.	SQDG 16:0/17:0	807,5323	C ₄₂ H ₈₀ O ₁₂ S	13,425	4,752	4,032
9.	SQDG 16:0/18:1	819,5347	C ₄₃ H ₈₀ O ₁₂ S	13,478	1,691	0,932
10.	SQDG 16:0/18:0	821,552	C ₄₃ H ₈₂ O ₁₂ S	13,094	2,871	1,927
11.	SQDG 16:0/20:2	845,5552	C ₄₅ H ₈₂ O ₁₂ S	13,081	0,491	0,258
12.	SQDG 16:0/20:1	847,5711	C ₄₅ H ₈₄ O ₁₂ S	12,647	0,443	0,621
13.	SQDG 14:0/23:1	861,5811	C ₄₆ H ₈₆ O ₁₂ S	12,222	0,140	0,599
14.	SQDG 16:0/21:0	863,5972	C ₄₆ H ₈₆ O ₁₂ S	11,923	0,042	0,106
15.	SQDG 16:0/22:2	873,5832	C ₄₇ H ₈₆ O ₁₂ S	12,218	0,173	0,431
16.	SQDG 16:0/22:1	875,5988	C ₄₇ H ₈₈ O ₁₂ S	11,905	1,079	4,579
17.	SQDG 16:0/22:0	877,6179	C ₄₇ H ₉₀ O ₁₂ S	11,364	0,224	0,386
18.	SQDG 16:0/23:1	889,6142	C ₄₈ H ₉₀ O ₁₂ S	11,549	0,373	0,130
19.	SQDG 16:0/23:0	891,6253	C ₄₈ H ₉₂ O ₁₂ S	10,811	0,190	2,112
20.	SQDG 16:0/24:2	901,6077	C ₄₉ H ₉₀ O ₁₂ S	11,514	0,040	0,219
21.	SQDG 16:0/24:1	903,6263	C ₄₉ H ₉₂ O ₁₂ S	11,194	0,507	0,090
22.	SQDG 16:0/24:0	905,6381	C ₄₉ H ₉₄ O ₁₂ S	10,842	0,058	0,124
23.	SQDG 18:1/24:1	929,6293	C ₅₁ H ₉₄ O ₁₂ S	10,396	0,119	0,557

Số lượng dạng phân tử SQDG trong mẫu thân và trứng Cầu gai vàng và Cầu gai đen nghiên cứu là phong phú, tuy nhiên chỉ có một số dạng có hàm lượng cao vượt trội, còn lại hàm lượng đều rất thấp, hầu hết dưới 1%. Trong mẫu thân và trứng Cầu gai vàng, dạng SQDG 14:0/16:0 chiếm tỉ lệ cao nhất với 31,559 và 30,118% tương ứng với trứng và trong thân. Với Cầu gai đen, dạng phân tử SQDG 16:0/16:0 lại chiếm tỉ lệ

cao vượt trội, chiếm 72,195% trong mẫu trứng và 67,715 % trong mẫu thân. Dạng phân tử này cao thứ hai đối với mẫu trứng và thân Cầu gai vàng.

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

Đề tài sử dụng enzyme Alcalase được mua tại công ty Novozyme, Tp. Hồ Chí Minh. Enzyme Alcalase 2.4 FG thu được từ *Bacillus licheniformis*. Đây là enzyme được phân tách và tinh sạch từ nguồn vi sinh vật. Sử dụng enzyme Alcalase cho phép điều chỉnh dễ dàng độ thủy phân, tính toán được lượng base yêu cầu để duy trì pH không đổi trong suốt quá trình thủy phân. Việc lựa chọn enzyme này cũng dựa trên đặc trưng của nó cho khả năng không hút nước của các axit amin vào giai đoạn cuối, dẫn đến sản phẩm thủy phân không có vị đắng (Adler-Nissen, 1986), đồng thời sản phẩm có sự cân bằng tốt các axit amin thiết yếu (Kristinsson và Rasco, 2000). Hoạt tính 2,4 AU-A/g. Nhiệt độ bảo quản tốt nhất là 0 - 10°C. Điều kiện hoạt động tối ưu cho enzyme Alcalase AF 2.4 L là pH = 7 - 8, nhiệt độ 40 - 60° C. Tất cả protease có thể bị bất hoạt bằng cách xử lý nhiệt ở 85°C, thời gian 10 phút hoặc protease Alcalase bị bất hoạt tại pH = 4 hay thấp hơn trong khoảng 30 phút. Phản ứng có thể dừng tức thời bằng cách thêm vào các acid thích hợp như axit hydrochloric, phosphoric, malic, lactic, acetic. Tăng nhiệt độ tức thời khó đạt được dưới các điều kiện công nghiệp và nó có thể khó để kiểm soát hiệu suất thủy phân do sự thủy phân vẫn tiếp tục trong suốt giai đoạn bất hoạt.

Bên cạnh đó Alcalase đã được chứng minh là một trong các enzyme hiệu quả nhất trong việc giải phóng các peptide có hoạt tính sinh học từ các loại protein có nguồn gốc khác nhau [87]. Alcalase có tính đặc hiệu cao nên nó được sử dụng rộng rãi để thủy phân các loại protein khác nhau và luôn mang lại hiệu quả thủy phân cao, ngay cả khi nó được sử dụng riêng rẽ hay kết hợp với các loại enzyme protease khác. Ahmadifard và cộng sự đã so sánh hiệu quả xúc tác của Alcalase, papain và một loại enzyme tổ hợp thương mại chứa trypsin, thymotrypsin và aminopeptidase khi tiến hành thủy phân gạo và protein đậu tương, kết quả cho thấy enzyme Alcalase cho hiệu quả thủy phân cao hơn vượt trội, gấp 10 lần so với các enzyme còn lại [88].

4.4.1. Kết quả nghiên cứu đơn nhân tố ảnh hưởng tới quá trình thủy phân protein

4.4.1.1. Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/nước tới quá trình thủy phân

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của tỉ lệ nước bổ sung đến quá trình thủy phân protein trong trứng Cầu gai đen và trứng Cầu gai vàng được thể hiện ở Bảng 4.22.

Bảng 4.22. Ảnh hưởng của tỉ lệ nước bổ sung đến hàm lượng protein hoà tan tổng số 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 ^e ± 0,17	138,24 ^e ± 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

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Dung môi đóng vai trò rất quan trọng trong sự hoạt động của enzyme, bên cạnh loại dung môi, nồng độ dung môi thì tỉ lệ nguyên liệu và dung môi cũng sẽ ảnh hưởng trực tiếp tới sự tiếp xúc của cơ chất và trung tâm hoạt động của enzyme, từ đó ảnh hưởng tới hoạt tính xúc tác của enzyme [145]. Từ kết quả của Bảng 4.22 cho thấy thủy phân ở tỉ lệ nước bổ sung khác nhau sẽ thu được hàm lượng protein hoà tan tổng số khác nhau, nếu tỉ lệ nước/nguyên liệu càng lớn thì hàm lượng protein hòa tan tổng số thu được lại càng có xu hướng giảm. Kết quả này cũng tương tự như một số công bố trước đó về nghiên cứu khả năng thủy phân protein của enzyme Alcalase trong môi trường nước [145]. Ngược lại, hàm lượng protein thu được tăng khi tỉ lệ nước/nguyên liệu tăng từ tỉ lệ 0,5/1,0 tới 1,0/1,0. Protein hoà tan tổng số cao nhất đạt $160,24 \pm 0,13$ mg/g với mẫu trứng Cầu gai đen và $181,29 \pm 0,21$ khi tỉ lệ nước/nguyên liệu 1,0/1,0 đây được coi là tỉ lệ tối ưu nhất giữa nước và nguyên liệu trứng Cầu gai trong quá trình thủy phân của nghiên cứu này khi nghiên cứu sự thay đổi đơn nhân tố. Điều này có thể được giải thích là khi lượng dung môi quá cao sẽ làm pha loãng nồng độ sản phẩm, còn khi tỉ lệ dung môi quá thấp thì lại gây ra sự cô đặc cơ chất, và cả hai yếu tố này đều ảnh hưởng tới khả năng hoạt động tối ưu của enzyme [146]. Vậy để đảm bảo thu được hàm lượng protein hòa tan cao nhất tỉ lệ nước/nguyên liệu là 1,0/1,0 được lựa chọn làm cơ sở cho các thí nghiệm tiếp theo.

4.4.1.2. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme bổ sung tới quá trình thủy phân

Trong điều kiện thừa cơ chất, nếu tăng nồng độ enzyme thì quá trình thủy phân xảy ra càng mãnh liệt. Khi nồng độ enzyme bão hoà với nồng độ cơ chất, tăng nồng độ enzyme thì vận tốc quá trình thủy phân rất ít thay đổi, hàm lượng protein hòa tan tổng số khi nghiên cứu thay đổi tỉ lệ bổ sung enzyme bổ sung được thể hiện ở Bảng 4.23.

Bảng 4.23. Kết quả nghiên cứu lựa chọn 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

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Từ kết quả Bảng 4.23 cho thấy tỷ lệ bổ sung enzyme có ảnh hưởng tới quá trình thủy phân. Với tỷ lệ bổ sung enzyme là 0,5% hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được là thấp nhất $160,26 \pm 0,21$ mg/g với mẫu trứng Cầu gai đen và $181,30 \pm 0,34$ mg/g với mẫu trứng Cầu gai vàng, do với lượng enzyme này chưa đủ để thủy phân hết lượng mẫu. Khi tiếp tục tăng lượng enzyme lên 1% thì hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được tăng nhanh $190,24 \pm 0,13$ mg/g và $199,48 \pm 0,21$ mg/g với mẫu trứng Cầu gai đen và Cầu gai vàng tương ứng. Tiếp tục tăng lượng enzyme bổ sung lên 1,5%, 2,0%, 2,5%, hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được so với tỷ lệ bổ sung 1% là giảm nhẹ nhưng không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Điều này có thể giải thích do tỷ lệ enzyme là 1% đã đủ thủy phân hết lượng cơ chất. Nghiên cứu của Monirul Islam và cộng sự năm 2022, cũng cho thấy với cùng một loại enzyme Alcalase, cùng hoạt độ và nhà sản xuất, khi được dùng để thủy phân protein của đậu tương, thì tỉ lệ enzyme bổ sung hiệu quả nhất là 1%, khi tiếp tục tăng tỉ lệ enzyme lên tới 2,5 và 3% thì hiệu quả thủy phân lại thay đổi không đáng kể [97]. Do vậy nghiên cứu đã lựa chọn tỷ lệ bổ sung enzyme là 1% (so với trong lượng tươi nguyên liệu) cho các thí nghiệm đơn nhân tố tiếp theo.

4.4.1.3. Ảnh hưởng của pH tới quá trình thủy phân

Mỗi một loại enzyme đều có khoảng pH hoạt động thích hợp, hay nói cách khác pH ảnh hưởng tới hiệu quả của quá trình thủy phân bởi enzyme. Độ pH liên quan tới mức độ ion hóa cơ chất và độ bền của enzyme nên ảnh hưởng tới hiệu quả xúc tác của enzyme. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của tỉ lệ nước bổ sung đến quá trình thủy phân protein trong trứng Cầu gai đen và trứng Cầu gai vàng được thể hiện ở Bảng 4.24.

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

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Kết quả bảng 4.24 cho thấy pH trong khoảng từ 6,5 đến 7,5 sẽ cho hiệu quả thủy phân cao hơn, và hàm lượng protein hòa tan thu được đạt cao nhất đối với cả hai mẫu trứng Cầu gai vàng và đen khi tiến hành thủy phân ở pH = 7. Hàm lượng protein hòa tan thu được với mẫu Cầu gai vàng và Cầu gai đen khi chỉ thay đổi pH của dịch thủy phân là không đáng kể. Bên cạnh đó nếu pH quá cao, hoặc quá thấp cũng sẽ ảnh hưởng tới chất lượng của bột protein phân tử lượng thấp sản phẩm cũng như khó khăn trong quá trình kiểm soát công nghệ sản xuất. Vì những lý do trên, pH = 7 được lựa chọn cho công nghệ thủy phân trứng Cầu gai vàng và đen với enzyme Alcalase.

4.4.1.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân tới quá trình thủy phân

Tương tự như pH, thì mỗi một enzyme có một khoảng nhiệt độ thích hợp để hoạt động cho hiệu quả xúc tác là cao nhất. Nhiệt độ tối thích của enzyme hoạt động phụ thuộc vào nguồn gốc của enzyme cũng như các yếu tố công nghệ khác bao gồm tỉ lệ enzyme/cơ chất; pH của dịch thủy phân và đặc biệt là thời gian thủy phân. Đặc điểm này được giải thích dựa vào cơ chế hoạt động của Alcalase là một endopeptidase xúc tác sự phân cắt của các liên kết nội phân tử của polypeptide hoặc protein. Khi nhiệt độ tăng, làm tăng năng lượng động học của phức hợp enzyme - cơ chất do đó tốc độ phản ứng và sản phẩm được tạo ra nhanh hơn. Vì thế, hoạt độ enzyme càng cao thì sau quá trình thủy phân các protein được phân cắt thành các acid amin nhiều nên hiệu suất thủy phân tăng tỉ lệ thuận với nhiệt độ.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân tới hàm lượng protein hòa tan thu được được thể hiện ở Bảng 4.25.

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

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Kết quả cho thấy với cả hai mẫu trứng Cầu gai vàng và Cầu gai đen, khi tăng dần nhiệt độ thì hàm lượng protein hòa tan thu được tăng và có sự khác biệt giữa các công thức với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Khoảng nhiệt độ 40 - 50°C cho enzyme hoạt động tốt nhất thể hiện qua hàm lượng protein hòa tan thu được trong dịch thủy phân là cao nhất, tuy nhiên hàm lượng protein hòa tan đạt cực đại khi nhiệt độ phản ứng thủy phân được duy trì ở 45°C đối với cả trứng Cầu gai đen và trứng Cầu gai vàng. Với cả hai mẫu trứng nghiên cứu, tại nhiệt độ 35°C thì hàm lượng protein hòa tan thu được là nhỏ nhất hay nói cách khác hiệu suất thủy phân là thấp nhất. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Ovissipour và ctv (2009a) khi nghiên cứu thủy phân phụ phẩm cá tầm bằng enzyme Alcalase ở ba mức nhiệt độ 35, 45 và 55°C, ghi nhận tốc độ thủy phân thấp nhất là ở nhiệt độ 35°C và cao nhất là ở nhiệt độ 55°C. Hiệu suất thủy phân cao nhất là 46,13% khi thủy phân ở 55°C trong 205 phút; và gần như không thay đổi ở nhiệt độ 35°C (hiệu suất thủy phân đạt 15%) [95]. Từ những nhận xét trên, nhiệt độ 45°C được lựa chọn để thủy phân trứng cầu ga vàng và Cầu gai đen bằng enzyme Alcalase trong điều kiện nghiên cứu đơn nhân tố.

4.4.1.5. Ảnh hưởng của thời gian tới quá trình thủy phân

Thời gian thủy phân ảnh hưởng lớn đến hiệu quả của quá trình thủy phân do enzyme tác động vào chất lượng của sản phẩm, thời gian thủy phân kéo dài sẽ làm giảm hàm lượng protein hòa tan thu được [147]. Hay trong một nghiên cứu khác của Anwar Noman và cộng sự năm 2019, thì khi tiến hành thủy phân protein bằng enzyme Alcalase, quá trình phân cắt mạch peptide diễn ra mạnh mẽ vào những giờ đầu, sau đó nó chỉ xảy ra với tốc độ chậm hơn nhiều và sẽ có xu hướng giảm [148]. Bên cạnh đó việc kéo dài quá trình thủy phân có thể dẫn tới sự thâm nhập của các vi

sinh vật không mong muốn và hình thành nhiều sản phẩm phụ, có tác động không tốt tới sản phẩm protein hòa tan.

Qua kết quả Bảng 4.26 cho thấy thời gian thủy phân thực sự ảnh hưởng tới hàm lượng protein hòa tan thu được có trong dịch thủy phân. Thời gian thủy phân trứng Cầu gai vàng kéo dài hay rút ngắn đều ảnh hưởng lớn đến hiệu quả của quá trình thủy phân do enzyme tác động vào chất lượng của sản phẩm. Thời gian tác động kéo dài thì enzyme có điều kiện để cắt đứt mạch triet để, dẫn đến sự biến đổi sâu sắc của cơ chất. Nhưng nếu kéo dài thời gian thủy phân quá mức sẽ tạo điều kiện cho vi sinh vật hoạt động làm sản sinh ra nhiều sản phẩm thứ cấp như: NH_3 , H_2S , indol, scaptol..., đồng thời khi thời gian kéo dài dẫn tới hiệu quả kinh tế kém. Tuy nhiên nếu rút ngắn thời gian thủy phân thì quá trình thủy phân diễn ra chưa triet để dẫn tới hàm lượng protein hòa tan thu được không cao. Tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian đến quá trình thủy phân, với các khoảng thời gian như sau: 5h; 5,5; 6; 6,5 và 7 giờ. Thủy phân 100 g trứng; tỉ lệ nước/nguyên liệu là 1/1; tỉ lệ enzyme bổ sung là 1%; nhiệt độ thủy phân được cố định ở 45°C trong suốt quá trình thủy phân. Theo dõi tiến trình thủy phân và hàm lượng protein hòa tan tổng số được thể hiện ở Bảng 4.26.

Bảng 4.26. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được từ trứng Cầu gai vàng và Cầu gai đen

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

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Nhìn chung, trong khoảng thời gian từ 5,0 tới 6,5 giờ, thời gian thủy phân tăng hàm lượng protein hòa tan thu được tăng. Hiệu quả thủy phân thu được đạt cao nhất thể hiện thông qua hàm lượng protein hòa tan thu được cao nhất khi thời gian thủy phân đạt 6,0 giờ. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng thời gian thủy phân lên 6,5 giờ thì hàm lượng protein hòa tan thu được gần như không có sự thay đổi, thể hiện ở giá trị chỉ số mũ của hai giá trị protein hòa tan thu được là giống nhau. Bên cạnh đó, khi thời gian

thủy phân tăng lên 7 giờ, thì hàm lượng protein hòa tan thu được có sự giảm rõ rệt chỉ đạt $197,35 \pm 0,17$ mg/g với mẫu trứng Cầu gai đen và $201,4 \pm 0,27$ với mẫu trứng Cầu gai vàng. Điều này có thể được giải thích rằng tại thời điểm sau 6 giờ thì toàn bộ cơ chất đã được thủy phân hoàn toàn. Như vậy thời gian thủy phân thích hợp nhất được lựa chọn cho thí nghiệm đơn nhân tố là 6 giờ, và được sử dụng để tính toán quá trình tối ưu hóa.

4.4.2. Kết quả nghiên cứu tối ưu hóa quá trình thủy phân protein

Thí nghiệm tối ưu hóa quá trình thủy phân protein từ trứng Cầu gai đen và Cầu gai vàng đều 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. Các nhân tố được tối ưu bao gồm tỉ lệ enzyme (X1) ở mức (-1, 0, +1) tương ứng (0,5%, 1,0%, 1,5%); tỉ lệ nước/nguyên liệu (X2) ở mức (-1, 0, +1) là (0,5 mL/g, 1,0 mL/g, 1,5 mL/g) và thời gian thủy phân (X3) ở mức (-1, 0, +1) là (5,5 giờ; 6,0 giờ; 6,5 giờ).

Bảng 4.27. Ma trận thực nghiệm Box-Behnken ba yếu tố và hàm lượng protein hòa tan thu được trong các điều kiện thủy phân khác nhau

TN	Biến thực			Hàm lượng protein hoà tan (mg/g nguyên liệu)	
	A - tỉ lệ enzyme	B - nước/nguyên liệu	C - thời gian thủy phân	Trứng Cầu gai đen	Trứng Cầu gai vàng
1	0,50	0,50	6,00	89,90	53,03
2	1,50	0,50	6,00	126,09	135,14
3	0,50	1,50	6,00	43,33	46,44
4	1,50	1,50	6,00	149,95	160,72
5	0,50	1,00	5,50	30,23	32,40
6	1,50	1,00	5,50	44,04	47,20
7	0,50	1,00	6,50	42,69	45,76
8	1,50	1,00	6,50	192,09	205,88
9	1,00	0,50	5,50	20,75	22,24
10	1,00	1,50	5,50	36,94	39,59
11	1,00	0,50	6,50	125,05	137,24
12	1,00	1,50	6,50	101,20	108,47
13	1,00	1,00	6,00	209,87	224,94
14	1,00	1,00	6,00	204,81	219,52
15	1,00	1,00	6,00	203,11	217,70
16	1,00	1,00	6,00	197,55	211,74
17	1,00	1,00	6,00	200,35	214,74

Ghi chú: A: Tỉ lệ enzyme (%); B: Tỉ lệ nước/nguyên liệu (mL/g); C: Thời gian thủy phân (giờ).

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 Cầu 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 Cầu 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 (mL/g); 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 Cầu 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			

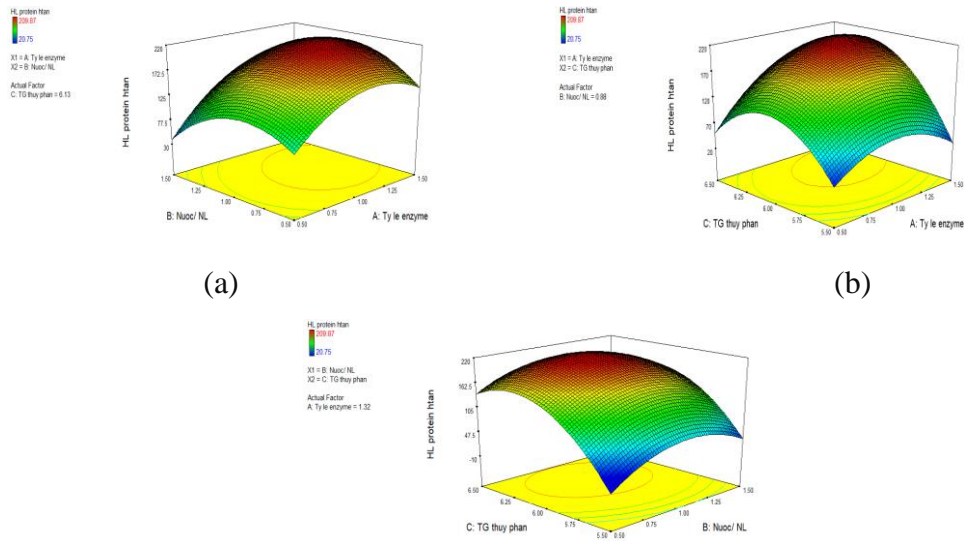
Bảng 4.29. Phân tích phương sai ANOVA của mô hình thủy phân trứng Cầu gai vàng

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,

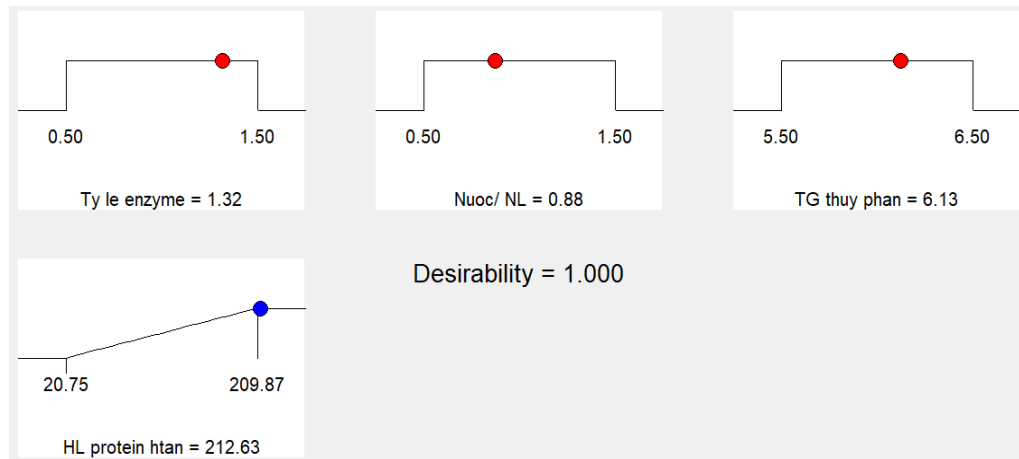
Kiểm tra sự có ý nghĩa và sự tương thích của mô hình được tiến hành bằng phân tích Bảng 4.29., phân tích ANOVA ta thấy giá trị xác suất của mô hình P-value < 0,0001 < 0,05 do đó mô hình được lựa chọn có ý nghĩa. Hệ số hồi quy $R^2 = 0,9954$, cho thấy có 99,54% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán của mô hình, Sử dụng phương pháp hàm kỳ vọng để tối ưu hàm lượng protein hoà tan tổng số thu được. Qua Hình 4.16 cho thấy mô hình 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 enzyme 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

214,627 mg/g trứng Cầu gai (Hình 4.17) kết quả này có độ tương thích cao so với kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm.



Hình 4.16. Bề mặt đáp ứng hàm lượng protein hoà tan tổng số

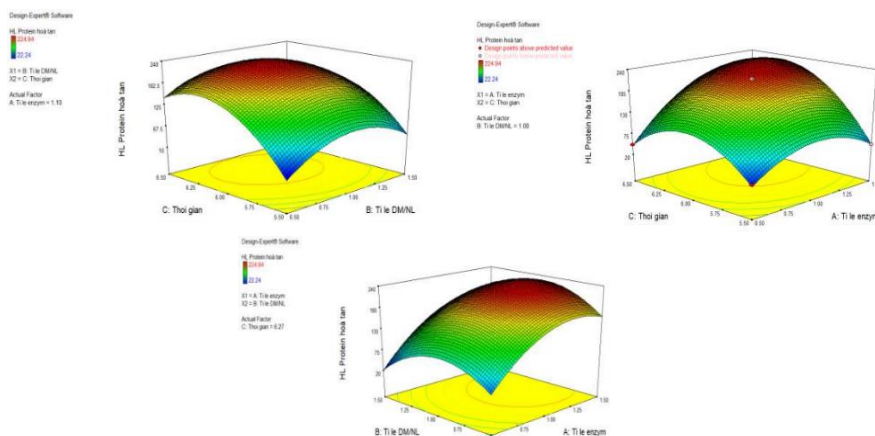
- (a): Mô hình tương tác giữa tỉ lệ enzyme và tỉ lệ nước/nguyên liệu (thời gian thủy phân được giữ ở mức trung bình)
- (b): Mô hình tương tác giữa tỉ lệ enzyme và thời gian thủy phân (tỉ lệ nước/ nguyên liệu được giữ ở mức trung bình)
- (c): Mô hình tương tác giữa tỉ lệ nước/nguyên liệu và thời gian thủy phân (tỉ lệ enzyme được giữ ở mức trung bình)



Hình 4.17. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu hàm lượng protein hoà tan tổng số

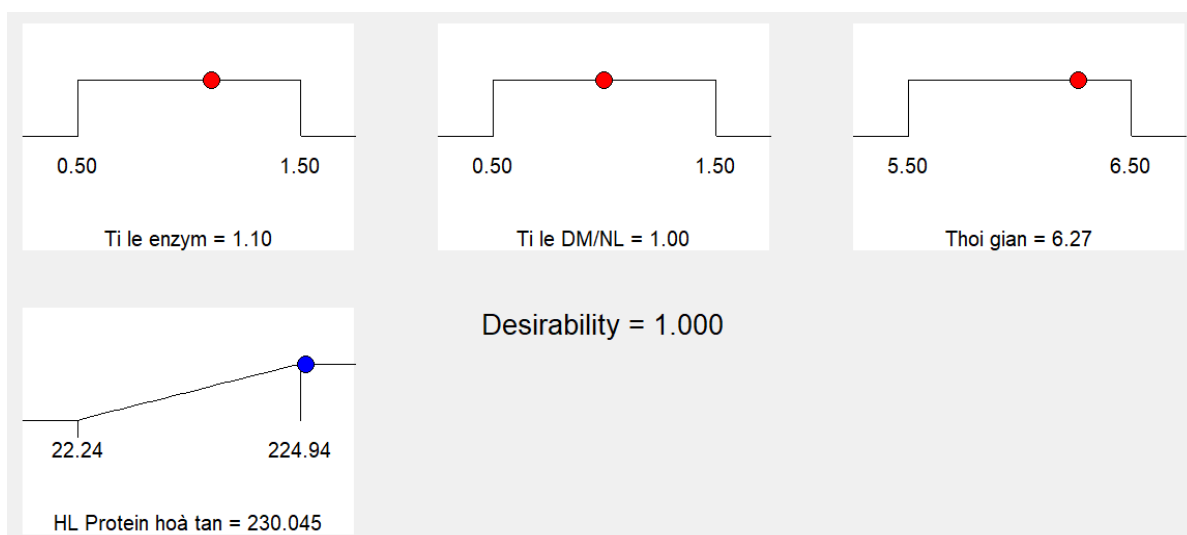
Đối với mẫu trứng Cầu gai vàng, kiểm tra sự có ý nghĩa và sự tương thích của mô hình được tiến hành bằng phân tích Bảng 4.29, phân tích ANOVA ta thấy giá trị xác suất của mô hình $P\text{-value} < 0,0001 < 0,05$ do đó mô hình được lựa chọn có ý nghĩa. Hệ số hồi quy $R^2 = 0,9935$ cho thấy có 99,35% số 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 thuỷ phân trứng Cầu gai bằng phần mềm Design-Expert. Trong đó, phương án tốt nhất để cực đại hàm mục tiêu là: tỉ lệ enzyme 1,1%, tỉ lệ nước/nguyên liệu 1,0 mL/1g nguyên liệu, thời gian thuỷ phân 6,27 giờ. Khi đó hàm lượng protein hoà tan tổng số đạt được trong các điều kiện trên theo tính toán là 230,045 mg/g trứng Cầu gai (Hình 4.19) kết quả này có độ tương thích cao so với kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm.



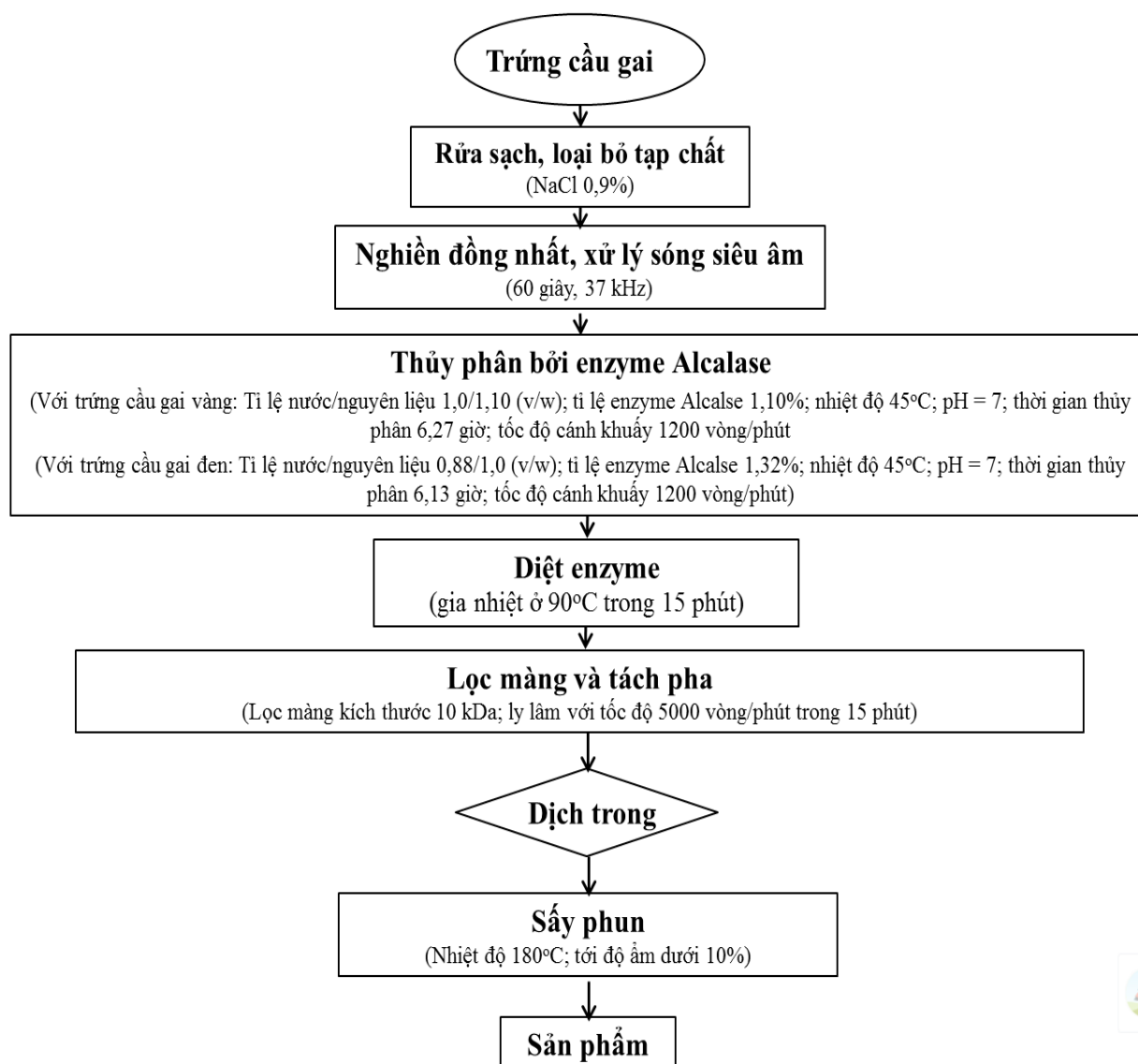
Hình 4.18. Bề mặt đáp ứng hàm lượng protein hoà tan tổng số

Ghi chú: (a): Mô hình tương tác giữa tỉ lệ enzyme và tỉ lệ nước/nguyên liệu (thời gian thuỷ phân được giữ mức trung bình) (b): Mô hình tương tác giữa tỉ lệ enzyme và thời gian thuỷ phân (tỉ lệ nước/ nguyên liệu được giữ mức trung bình) (c): Mô hình tương tác giữa tỉ lệ nước/nguyên liệu và thời gian thuỷ phân (tỉ lệ enzyme được giữ mức trung bình)



Hình 4.19. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu hàm lượng protein hoà tan tổng số thuỷ phân từ trứng Cầu gai vàng

4.4.3. Quy trình thủy phân protein từ trứng Cầu gai



Hình 4.20. Sơ đồ quy trình công nghệ thủy phân trứng Cầu gai

Xử lý nguyên liệu: 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: 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.

Kết quả sản xuất thử nghiệm, đánh giá hoạt tính sinh học và xây dựng tiêu chuẩn cho sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) trứng Cầu gai

Các kết quả phân tích ở trên cho thấy, trứng Cầu gai vàng có thành phần dinh dưỡng cao hơn Cầu gai đen, bên cạnh đó sản lượng Cầu gai vàng trong thực tế cao hơn nhiều lần so với Cầu gai đen, màu sắc trứng Cầu gai vàng tươi và sáng hơn trứng Cầu gai đen, vì những lý do đó đề tài đã lựa chọn trứng Cầu gai vàng để sản xuất thử nghiệm sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe trứng Cầu gai.

4.4.4. Kết quả sản xuất thử nghiệm sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) trứng Cầu gai

Kết quả sản xuất thử nghiệm TPBVSK trứng Cầu gai được thể hiện ở Bảng 4.30.

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
	Σ = 60,2	Σ = 6,08	TB = 10,02

Từ bảng số liệu tổng hợp các mẻ sản xuất thử nghiệm ở trên, thấy rằng hiệu suất thu sản phẩm đạt khoảng 10% so với nguyên liệu ban đầu. Hiệu suất thu hồi giữa các mẻ thử nghiệm khác nhau là khá tương đồng, đều đạt khoảng 10%. Hiệu suất trung bình là 10,02%. Điều này cũng chứng tỏ công nghệ áp dụng có tính ổn định cao.

4.4.5. Đánh giá tác dụng độc tính cấp in vivo của TPBVSK trứng Cầu gai

Số lượng chuột chết và biểu hiện bên ngoài của chuột thí nghiệm

Kết quả thí nghiệm theo dõi số lượng chuột chết và biểu hiện bên ngoài khi sử dụng TPBVSK trứng Cầu gai được trình bày ở Bảng 4.31.

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

Kết quả thí nghiệm trên cho thấy TPBVSK trứng Cầu gai không gây chết động vật thí nghiệm theo đường uống trong thí nghiệm này. Như vậy, TPBVSK trứng Cầu gai không gây độc tính cấp với liều thử cao nhất là 10 g/kg.

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 4.32.

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

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

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 TPBVSK trứng Cầu gai không ảnh hưởng đến quá trình phát triển bình thường của chuột thí nghiệm.

Tiêu thụ thức ăn và nước uống của chuột

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

- Các nhóm thử: theo dõi từ lúc uống TPBVSK trứng Cầu gai trong khoảng 72h thì có hiện tượng chuột giảm tiêu thụ nước uống, thức ăn ở những lô uống liều cao 8-10 g/kg. Tuy nhiên, sau 72 giờ cho đến 7 ngày tất cả các con chuột này đều trở lại ăn uống bình thường.

Quan sát dấu hiệu ngộ độc

Sau khi uống TPBVSK trứng Cầu gai thấy không có chuột chết ở tất các lô thử nghiệm. Điều này cho thấy TPBVSK trứng Cầu gai là an toàn không gây độc tính cấp.

Dựa trên kết quả thu được của thử nghiệm này có thể kết luận TPBVSK trứng Cầu gai thuộc nhóm không gây độc theo đường uống.

4.4.6. Đánh giá độc tính bán trường diễn in vivo của TPBVSK trứng Cầu gai

*** Với đối tượng là thỏ**

Tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng của thỏ

Trong thời gian thí nghiệm, thỏ ở cả 3 lô hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, mắt sáng, lông mượt, ăn uống tốt, phân bình thường. Không thấy biểu hiện gì đặc biệt ở cả 3 lô thỏ trong suốt thời gian nghiên cứu. Sự thay đổi thể trọng thỏ được trình bày ở Bảng 4.33.

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

Lô thí nghiệm	Trọng lượng cơ thể (kg/con)		
	Trước thí nghiệm	Sau 2 tuần	Sau 4 tuần
Mẫu đối chứng	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

Kết quả ở Bảng 4.33. cho thấy: sau 2 tuần và 4 tuần uống TPBVSK trứng Cầu gai, trọng lượng thỏ ở cả 3 lô đều tăng lên so với trước khi nghiên cứu ($P < 0,05$). Không có sự khác biệt về mức độ tăng trọng lượng thỏ giữa lô chứng và các lô uống TPBVSK trứng Cầu gai ($P > 0,05$).

Đánh giá chức năng tạo máu

Ảnh hưởng của TPBVSK trứng Cầu gai đến số lượng huyết sắc tố trong máu thỏ

Để đánh giá ảnh hưởng của TPBVSK trứng Cầu gai khi cho thỏ uống bán trường diễn thì sau thời gian thí nghiệm thỏ ở các lô được lấy máu, thu huyết thanh, xác định một số chỉ tiêu huyết học. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.34.

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 \pm 0,82	5,95 \pm 0,75	5,93 \pm 1,03	5,90 \pm 0,82
Hồng cầu ($\times 10^{12}/L$)	5,21 \pm 0,38	5,26 \pm 0,47	5,21 \pm 0,43	5,25 \pm 0,53
Hemoglobin (g/L)	9,75 \pm 1,05	9,88 \pm 1,23	9,62 \pm 1,03	9,86 \pm 1,38
HCT (fl)	62,38 \pm 1,42	63,98 \pm 1,59	61,86 \pm 1,92	61,78 \pm 1,68
MCV (g/L)	5,96 \pm 0,96	5,93 \pm 0,78	5,93 \pm 1,03	5,90 \pm 0,98
Tiểu cầu ($\times 10^9/L$)	326,12 \pm 12,39	328,90 \pm 15,53	334,68 \pm 19,23	331,12 \pm 12,39

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

Kết quả ở Bảng 4.34. cho thấy: sau 4 tuần uống TPBVSK trứng Cầu gai, một số chỉ số huyết học cơ bản của thỏ ở cả 3 lô đều tăng lên so với trước khi nghiên cứu ($P < 0,05$). Không có sự khác biệt ở mức thống kê về các chỉ số này của thỏ giữa lô đối chứng và các lô uống TPBVSK trứng Cầu gai ($P > 0,05$).

Đánh giá chức năng gan, thận

Đánh giá chức năng gan, thận thông qua hoạt độ enzyme AST , ALT, Creatinin trong máu thỏ được trình bày ở Bảng 4.35.

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 \pm 3,62	41,90 \pm 2,82	41,88 \pm 3,17	42,16 \pm 3,54
ALT (UI/L)	55,26 \pm 4,71	56,63 \pm 4,33	57,01 \pm 3,53	61,20* \pm 4,42
Creatinin (UI/L)	1,18 \pm 0,18	1,17 \pm 0,20	1,21 \pm 0,16	1,20 \pm 0,15

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

Bảng 4.35. cho thấy:

- Khi cho động vật uống TPBVSK trứng Cầu gai liều 100 mg/kg/ngày trong thời gian 28 ngày không làm tăng chỉ số AST, ALT của gan so với đối chứng ($P>0,05$) và không làm tăng chỉ số Creatinin của thận so với đối chứng ($P>0,05$).

- Khi cho động vật uống TPBVSK trứng Cầu gai liều 300 mg/kg/ngày trong thời gian 28 ngày không làm tăng chỉ số AST, ALT của gan so với đối chứng ($P>0,05$) và không làm tăng chỉ số Creatinin của thận so với đối chứng ($P>0,05$).

- Khi cho động vật uống TPBVSK trứng Cầu gai liều 500 mg/kg/ngày trong thời gian 28 ngày không làm tăng chỉ số AST của gan và không làm tăng chỉ số Creatinin của thận so với đối chứng ($P>0,05$), nhưng có thể làm tăng chỉ số ALT của gan so với đối chứng ($P<0,05$).

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

Sau thời gian cho uống bán trường diễn, mổ ở tất cả các lô được mô, qua sát trực quan gan, thận, lách. Kết quả quan sát trực quan mô bệnh học được trình bày ở Bảng 4.36.

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 4.36 cho thấy: gan, thận, lách của thỏ ở các lô được uống TPBVSK trứng Cầu gai về màu sắc là không có sự sai khác so với lô đối chứng. Như vậy, TPBVSK trứng Cầu gai không ảnh hưởng đến mô và các cơ quan trong cơ thể. Kết quả này cũng cho thấy TPBVSK trứng Cầu gai không ảnh hưởng đến chức năng sinh lí của một số cơ quan trong cơ thể của thỏ.

Như vậy, kết quả ở trên cho thấy: Sau 4 tuần uống mẫu thử liên tục tất cả các xét nghiệm đánh giá chức năng tạo máu (số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, thể tích trung bình hồng cầu), số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu, số lượng tiểu cầu, chức năng gan và chức năng thận, hình thái đại thể gan, thận, lách của thỏ ở cả lô uống Trứng Cầu gai liều 100 mg, 300 mg và 500 mg/kg/ngày đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($P > 0,05$). Điều này cho thấy TPBVSK trứng Cầu gai ở các liều nghiên cứu không gây độc cho thỏ khi cho uống bán trường diễn trong thời gian 4 tuần.

*** Đối với đối tượng là chuột**

Kết quả theo dõi biểu hiện bên ngoài của chuột thí nghiệm

Theo dõi sự biểu hiện chức năng của chuột thí nghiệm, nhận thấy chuột ở lô uống sản phẩm TPBVSK trứng Cầu gai 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, sản phẩm TPBVSK trứng Cầu gai 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 chuột thí nghiệm

Không chỉ có theo dõi biểu hiện bên ngoài của chuột thí nghiệm, sự thay đổi trọng lượng của chuột cũng được theo dõi trong quá trình thí nghiệm. Trọng lượng của chuột thí nghiệm được trình bày ở Bảng 4.37.

Kết quả cho thấy chuột uống TPBVSK trứng Cầu gai ở các liều nghiên cứu (100 mg, 300 mg và 500 mg) trong thời gian 28 ngày không ảnh hưởng đến sự tăng trọng lượng của chuột so với lô đối chứng (không có sự sai khác thống kê, $P > 0,05$).

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

Lô TNo	Trọng lượng trung bình của chuột 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

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

Kết quả kiểm tra một số chỉ tiêu huyết học

Để đánh giá ảnh hưởng của việc cho uống mẫu nghiên cứu trong thời gian 28 ngày thì 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 enzyme creatinphosphokinase (CPK), serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), serum glutamic purivic transaminase (SGPT) được trình bày ở Bảng 4.38.

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

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

Bảng 4.38. cho thấy:

- Khi cho động vật uống TPBVSK trứng Cầu gai liều 100 mg/kg/ngày trong thời gian 28 ngày không ảnh hưởng đến các số chỉ tiêu huyết học so với đối chứng ($P>0,05$).

- Khi cho động vật uống TPBVSK trứng Cầu gai liều 300 mg/kg/ngày trong thời gian 28 ngày không ảnh hưởng đến các số chỉ tiêu huyết học so với đối chứng ($P>0,05$).

- Khi cho động vật uống TPBVSK trứng Cầu gai liều 500 mg/kg/ngày trong thời gian 28 ngày không ảnh hưởng đến các số chỉ tiêu huyết học so với đối chứng ($P>0,05$).

Kết quả kiểm tra một số chỉ tiêu hóa sinh máu của chuột thí nghiệm

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 ± 1,88	118,70 ± 1,46	117,00 ± 2,25	118,53 ± 2,09
ALT (UI/L)	34,17 ± 0,79	35,57 ± 0,69	37,33 ± 0,75	39,73* ± 0,67
Creatinin (UI/L)	25,67 ± 0,66	26,00 ± 1,01	26,10 ± 0,38	26,20 ± 0,64

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

Bảng 4.39 cho thấy:

- Khi cho động vật uống TPBVSK trứng Cầu gai liều 100 mg/kg/ngày trong thời gian 28 ngày không làm tăng chỉ số AST, ALT của gan so với đối chứng ($P>0,05$) và không làm tăng chỉ số Creatinin của thận so với đối chứng ($P>0,05$).

- Khi cho động vật uống TPBVSK trứng Cầu gai liều 300 mg/kg/ngày trong thời gian 28 ngày không làm tăng chỉ số AST, ALT của gan so với đối chứng ($P>0,05$) và không làm tăng chỉ số Creatinin của thận so với đối chứng ($P>0,05$).

- Khi cho động vật uống TPBVSK trứng Cầu gai liều 500 mg/kg/ngày trong thời gian 28 ngày không làm tăng chỉ số AST của gan và không làm tăng chỉ số Creatinin của thận so với đối chứng ($P>0,05$), nhưng có thể làm tăng chỉ số ALT của gan so với đối chứng ($P<0,05$).

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 gan, thận, lách, phổi đồng thời cân khối lượng gan thận lách để đánh giá ảnh hưởng của chất nghiên cứu. Kết quả quan sát trực quan mô bệnh học được trình bày ở Bảng 4.50.

Bảng 4.40. Kết quả mô giải phẫu các cơ quan nội tạng chuột thí nghiệm khi uống TPBVSK trứng Cầu gai

Lô thí nghiệm	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

Kết quả ở Bảng 4.40 cho thấy gan, thận, lách ở các lô chuột được uống mẫu TPBVSK trứng Cầu gai về màu sắc là không có sự sai khác so với lô đối chứng.

Kết quả về trọng lượng gan, thận, lách chuột thí nghiệm

Không chỉ có quan sát trực quan các nội quan của chuột thí nghiệm, trọng lượng các nội quan này cũng được kiểm tra. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.51.

Bảng 4.41. 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	0,388 ± 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 4.41 cho thấy: Trọng lượng gan/10g thể trọng, trọng lượng thận/10g thể trọng, trọng lượng lách/10gram thể trọng ở lô uống TPBVSK trứng Cầu gai liều 100 mg/kg/ngày so với đối chứng là không có sự sai khác thống kê ($P>0,05$).

Trọng lượng gan/10g thể trọng, trọng lượng thận/10g thể trọng, trọng lượng lách/10gram thể trọng ở lô uống TPBVSK trứng Cầu gai liều 300 mg/kg/ngày so với đối chứng là không có sự sai khác thống kê ($P>0,05$).

Trọng lượng gan/10g thể trọng, trọng lượng thận/10g thể trọng, trọng lượng lách/10gram thể trọng ở lô uống ở lô uống TPBVSK trứng Cầu gai liều 500 mg/kg/ngày so với đối chứng là không có sự sai khác thống kê ($P>0,05$).

4.4.7. Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của TPBVSK trứng Cầu gai

Superoxid dismutase (SOD) là một trong những enzyme quan trọng trong việc loại bỏ gốc tự do, có hoạt tính chống oxy hóa, trong cơ thể sinh vật do quá trình oxy hóa thức ăn. Enzyme có trong hầu hết các sinh vật từ vi khuẩn, nấm, động vật nguyên sinh, thực vật, động vật không xương sống đến động vật có xương sống, so xúc tác cho phản ứng sau:



Theo phương pháp của Imanari và cộng sự, hoạt độ của enzyme SOD trong huyết thanh của 3 lô chuột được ăn chế độ khác nhau của chế phẩm TPBVSK trứng Cầu gai được xác định thông qua khả năng thu dọn gốc tự do superoxid anion (O_2^-). Trong cơ thể sinh vật, hoạt tính của enzyme SOD càng cao thì độ ức chế sinh ra superoxid anion càng cao.

Bảng 4.52 trình bày hoạt độ ức chế superoxid anion của SOD của huyết thanh chuột được ăn chế độ khác nhau chế phẩm TPBVSK trứng Cầu gai. Kết quả Bảng 4.52 cho thấy chế phẩm TPBVSK trứng Cầu gai làm tăng hoạt độ ức chế superoxid anion trong huyết thanh chuột ở lô ĐC là 27,44% thì ở lô thí nghiệm 1 (TN1) là 36,25% và ở lô thí nghiệm 2 (TN2) là 39,70% với độ chênh lệch có ý nghĩa thống kê giữa mẫu ĐC và TN1 có $P < 0,05$ và giữa ĐC và TN2 là $P < 0,01$.

Bảng 4.42. 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

Khả năng làm tăng hoạt độ ức chế superoxid anion trong huyết thanh chuột của chế phẩm TPBVSK trứng Cầu gai có thể giải thích là do sự phong phú các chất carotenoid trong trứng Cầu gai. Các carotenoid là những tác nhân trói buộc và thu lượm các gốc tự do vốn được hình thành trong hệ thống lipid và hoạt tính của chúng gấp 20 đến 100 lần mạnh hơn so với vitamin E. Carotenoid là chất chống oxy hóa mạnh. Các nhà khoa học đã chứng minh được rằng việc kiềm hãm, phân hủy các gốc tự do sẽ làm chậm quá trình lão hóa. Như vậy chế phẩm TPBVSK trứng Cầu gai là một loại thực phẩm chức năng có hoạt tính chống oxy hóa cao và làm chậm quá trình lão hóa.

4.4.8. Kết quả phân tích một số thành phần hóa sinh của sản phẩm TPBVSK trứng Cầu gai

Thành phần protein tổng số và acid amin

Bảng 4.43. 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
Agrinine	4,296	Proline	2,120

*: acid amin thiết yếu; % MK: % tính theo mẫu khô

Kết quả bảng 4.43 cho thấy trong sản phẩm TPBVSK trứng Cầu gai có chứa 17 loại acid amin, trong đó có 8 acid amin thiết yếu. Các loại acid amin có hàm lượng cao trong sản phẩm TPBVSK trứng Cầu gai bao gồm acid Aspartic, Aspartic, Glycine, Agrinine, Cysteine, Lysine. Đặc biệt thành phần acid amin thiết yếu Lysine chiếm tỉ lệ cao hơn các thành phần khác, điều này cho thấy đây là một sản phẩm thực phẩm rất tốt cho trẻ nhỏ và người già.

Thành phần lipid và acid béo

Bảng 4.44. 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

% MK: % tính theo mẫu khô

Thành phần acid béo của mẫu TPBVSK trứng Cầu gai phong phú, kết quả phân tích phát hiện được 25 loại acid béo có trong sản phẩm, đây cũng là những acid béo phổ biến của các mẫu sinh vật biển. Tỉ lệ các acid béo không no chiếm tỉ lệ tương đối cao, tới 61,81%. Bên cạnh đó trong sản phẩm TPBVSK trứng Cầu gai có mặt cả ba loại acid béo thiết yếu là AA (9,85%); EPA (7,18%) và DHA (2,51%).

Thành phần hooc mon

Bảng 4.45. Thành phần hooc mon 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 của TPBVSK trứng Cầu gai có hàm ẩm dưới 10%, hàm lượng protein tổng số cao chiếm 74,67%; thành phần lipid tổng số là 21,56%, như vậy của TPBVSK trứng Cầu gai được xếp vào thực phẩm giàu năng lượng. Bên cạnh đó hàm lượng Zn trong sản phẩm khá cao, đạt 158,35 (mg/kg). Zn là nguyên tố có mặt trong nhiều enzyme và có ảnh hưởng tốt tới quá trình sinh sản. Sắt là nguyên tố cao thứ hai sau Zn, Fe tham gia vào quá trình tạo hồng cầu, giúp quá trình vận chuyển oxy trong cơ thể. Hàm lượng As và Se trong trứng Cầu gai tương đối thấp. Trong trứng Cầu gai thủy phân có thành phần acid béo tự do tương tự như mẫu trứng Cầu gai ban đầu, hàm lượng protein hòa tan cao chứa 17 acid amin và có đầy đủ các acid amin thiết yếu, đặc biệt hàm lượng carotenoid tổng số trong trứng Cầu gai thủy phân cao với 331,54 (ng/g vck).

Sau quá trình xác định độ an toàn, sản phẩm TPBVSK trứng Cầu gai được sản xuất để tiến hành đăng kí thực phẩm chức năng và đã được Cục An toàn thực phẩm cấp số XNCB: 4143/2018/ĐKSP.



Hình 4.21. TPBVSK Trứng Cầu gai

BỘ Y TẾ
CỤC AN TOÀN THỰC PHẨM

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Hà Nội, ngày 29 tháng 7 năm 2018

GIẤY TIẾP NHẬN ĐĂNG KÝ BẢN CÔNG BỐ SẢN PHẨM

Số: AAA/2018/ĐKSP

Cục An toàn thực phẩm xác nhận đã nhận Bản công bố sản phẩm của:

Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, địa chỉ: 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội; điện thoại: 02438361420, Fax: 02437564390, email: duong.le@danimin.com

Cho sản phẩm: Thực phẩm bảo vệ sức khỏe Trứng cầu gai

Do: Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, địa chỉ: Nhà 1H, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, sản xuất phù hợp với:

Tiêu chuẩn sản phẩm số TCCS 04-HCTN của nhà sản xuất.

Doanh nghiệp phải hoàn toàn chịu trách nhiệm về tính phù hợp của sản phẩm đã công bố./.

Nơi nhận:
- Tổ chức, cá nhân;
- Lưu: VT, KN.



CỤC TRƯỞNG

Nguyễn Thanh Phong

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

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 *Tripneuster 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 loài 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; triacylglycerol; 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: Tỷ lệ enzyme (%); B: Tỷ 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: Tỷ lệ nước/nguyên liệu: 0,88/1 (w/v); tỷ 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: Tỷ lệ nước/nguyên liệu: 1/1 (v/w); tỷ 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 bột 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 Cầu 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 Cầu gai đen vì nó chiếm tỉ lệ rất lớn trong lipid tổng của loài Cầu gai này.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN TỚI LUẬN ÁN

1. **Hoa Dinh 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. **Đinh Thị Kim Hoa**, Lưu Hồng Sơn, Nguyễn Thị Tình, Tạ Thị Lượng, Nguyễn Xuân Vũ, Đoàn Lan Phương, “Tối ưu hóa quá trình thủy phân trứng Cầu gai *Tripneuster gratilla* bằng enzyme Alcalase[#]”, *Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc năm 2021 (2021)* 969 – 975
3. **Dinh Thi 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 *Tripneuster gratilla*, *Vietnam Journal of Science and Technology* **56** (4A) (2018) 30-38.
4. **Dinh Thi Kim Hoa**, Hoang Thi Bich, Pham Quoc Long, Tran Quoc Toan, Doan Lan Phuong, Protein hydrolysis of eggs from the sea urchin *Tripneuster 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. **Đinh 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 Dinh**, 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. **Đinh 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*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C. V. Minn, P. V. Kiem, L. M. Huong, and Y. H. Kim, “Cytotoxic constituents of *Diadema setosum*,” *Arch. Pharm. Res.*, vol. 27, no. 7, pp. 734–737, Jul. 2004, doi: 10.1007/BF02980141.
- [2] Nguyễn Xuân Duy, Phạm Thị Hiền, “Thành phần hóa học của trứng Cầu gai *Tripneustes gratilla* thu hoạch ở miền Trung Việt Nam.,” *Tạp Chí Nông Nghiệp Và Phát Triển Nông Thôn Kỳ II Tháng 4 Năm 2011*.
- [3] N.T.P. Thao, B.T.T. Luyen, E.J. Kim, J.i. Kang, H.k. Kang, N.X. Cuong, N.H. Nam, P.V. Kiem, C.V.n. Minh, and Y.H. Kim, “Steroidal constituents from the edible sea urchin *Diadema savignyi* Michelin induce apoptosis in human cancer cells,” *J. Med. Food* 2015 18 1 45-53.
- [4] Võ Mai Như Hiếu, “Nghiên cứu ứng dụng nhóm hoạt chất tự nhiên quinonoid từ vỏ cầu gai Khánh Hòa định hướng tạo chế phẩm mỹ phẩm.” Viện Hàn lâm KHCNVN, VAST06.01/19-20, 2020.
- [5] M. Zhang *et al.*, “A polysaccharide component from *Strongylocentrotus nudus* eggs inhibited hepatocellular carcinoma in mice by activating T lymphocytes,” *Oncol. Lett.*, vol. 13, no. 3, pp. 1847–1855, Mar. 2017, doi: 10.3892/ol.2017.5624.
- [6] M. S. Brewer, “Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 10, no. 4, pp. 221–247, Jul. 2011, doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x.
- [7] W. Verachia, M. Sewell, B. Niven, M. Leus, M. Barker, and P. Bremer, “Seasonal changes in the biochemical composition of *Evechinus chloroticus* gonads (Echinodermata: Echinoidea),” *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.*, vol. 46, no. 3, pp. 399–410, Sep. 2012, doi: 10.1080/00288330.2012.697070.
- [8] H. A. Anderson, J. W. Mathieson, and R. H. Thomson, “Distribution of spinochrome pigments in echinoids,” *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 28, no. 1, pp. 333–345, Jan. 1969, doi: 10.1016/0010-406X(69)91347-4.
- [9] M. Service and A. C. Wardlaw, “Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L.),” *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.*, vol. 79, no. 2, pp. 161–165, Jan. 1984, doi: 10.1016/0305-0491(84)90008-7.

- [10] C. Fernandez, "Seasonal Changes in the Biochemical Composition of the Edible Sea Urchin *Paracentrotus lividus* Echinodermata: Echinoidea in a Lagoonal Environment," *Mar. Ecol.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–11, Mar. 1998, doi: 10.1111/j.1439-0485.1998.tb00449.x.
- [11] T. W. Goodwin and S. Srisukh, "A study of the pigments of the sea-urchins, *Echinus esculentus* L. and *Paracentrotus lividus* Lamarck," *Biochem. J.*, vol. 47, no. 1, pp. 69–76, Jun. 1950, doi: 10.1042/bj0470069.
- [12] D.-Y. Zhou *et al.*, "Extraction and antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from spines of purple sea urchin *Strongylocentrotus nudus*," *Food Chem.*, vol. 129, no. 4, pp. 1591–1597, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.06.014.
- [13] A. V. Lebedev, M. V. Ivanova, and D. O. Levitsky, "Echinochrome, a naturally occurring iron chelator and free radical scavenger in artificial and natural membrane systems," *Life Sci.*, vol. 76, no. 8, pp. 863–875, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.lfs.2004.10.007.
- [14] H. Hatate, H. Murata, Y. Hama, R. Tanaka, and N. Suzuki, "Antioxidative activity of spinochromes extracted from shells of sea urchins," *Fish. Sci.*, vol. 68, no. sup2, pp. 1641–1642, 2002, doi: 10.2331/fishsci.68.sup2_1641.
- [15] H. A. Anderson, J. W. Mathieson, and R. H. Thomson, "Distribution of spinochrome pigments in echinoids," *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 28, no. 1, pp. 333–345, Jan. 1969, doi: 10.1016/0010-406X(69)91347-4.
- [16] Liu, C.H.; Xi, T.; Lin, Q.X.; Gao, Y.; Xing, Y.Y, "Extraction purification and immunological activity assay of a polysaccharide eggs of sea urchin *Strongylocentrotus nudus*," *Chin J Mar Drugs* 2006 253 7-11.
- [17] R. Amarowicz, J. Synowiecki, and F. Shahidi, "Sephadex LH-20 separation of pigments from shells of red sea urchin (*Strongylocentrotus franciscanus*)," *Food Chem.*, vol. 51, no. 2, pp. 227–229, 1994, doi: 10.1016/0308-8146(94)90262-3.
- [18] Ryszard, A.; Jozef, S.; Fereidoon, S., "Antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from shells of purple sea urchin *Anthocidaris crassispina*," *LWT-Food Sci Technol* 2009 42 1296-1300.
- [19] Gao, H.; Chen, S.M, "Pharmacological study of *Stroglyocentrotus nudus* extracts," *Pharmacol Bull* 1987 33 166.

- [20] Y. Liu *et al.*, “IDENTIFICATION OF EPIDIOXYSTEROL FROM SOUTH CHINA SEA URCHIN *TRIPNEUSTES GRATILLA* LINNAEUS AND ITS CYTOTOXIC ACTIVITY: EPIDIOXYSTEROL FROM SEA URCHIN *TRIPNEUSTES GRATILLA*,” *J. Food Biochem.*, vol. 35, no. 3, pp. 932–938, Jun. 2011, doi: 10.1111/j.1745-4514.2010.00426.x.
- [21] N. Chinprahast, T. Shirai, and K. Hoamuangkaew, “Comparative study on extractive components of fresh and boiled gonads of three species of sea urchins from the Gulf of Thailand,” *Fish. Sci.*, vol. 79, no. 4, pp. 707–714, Jul. 2013, doi: 10.1007/s12562-013-0641-6.
- [22] Salma, W., Wahyuni, S., Yusuf, I., Haya, L. O. M. Y., Yusuf, I., & Asad, S., “Immune Nutrient Content of Sea Urchin (*Diadema setosum*) Gonads,” *Int. J. Nutr. Food Sci. Vol. 5 Issue 5 Sept. 2016 Pages 330-336*.
- [23] Kalogeropoulos, N., Mikellidi, A., Nomikos, T., & Chiou, A., “Screening of macro- and bioactive microconstituents of commercial finfish and sea urchin eggs,” *LWT - Food Sci. Technol.* 46 525- 531.
- [24] C. V. Minn, P. V. Kiem, L. M. Huong, and Y. H. Kim, “Cytotoxic constituents of *diadema setosum*,” *Arch. Pharm. Res.*, vol. 27, no. 7, pp. 734–737, Jul. 2004, doi: 10.1007/BF02980141.
- [25] C. Galasso *et al.*, “Food Modulation Controls Astaxanthin Accumulation in Eggs of the Sea Urchin *Arbacia lixula*,” *Mar. Drugs*, vol. 16, no. 6, p. 186, May 2018, doi: 10.3390/md16060186.
- [26] P. Cirino *et al.*, “The Sea Urchin *Arbacia lixula*: A Novel Natural Source of Astaxanthin,” *Mar. Drugs*, vol. 15, no. 6, p. 187, Jun. 2017, doi: 10.3390/md15060187.
- [27] H. Sahara *et al.*, “Anti-tumor Effect of Chemically Synthesized Sulfolipids Based on Sea Urchin’s Natural Sulfonoquinovosylmonoacylglycerols,” *Jpn. J. Cancer Res.*, vol. 93, no. 1, pp. 85–92, Jan. 2002, doi: 10.1111/j.1349-7006.2002.tb01204.x.
- [28] Z. Zhang, C. Zhang, H. Liao, Y. Liu, W. Cheng, and J. Du, “Antitumor activities of extractive from sea urchin in vitro,” *Chin. J. Cancer Prev. Treat.* 2003 10 569-572.

- [29] C.h. Liu, L. Ye, Q.x. Lin, T. Xi, Y.y. Xing, and Y. Gao, "Studies on preparation and anti-tumor activity of the polysaccharide from the eggs of *Strongylocentrotus Nudus* (SEP)," *Pharmaceutical Biotechnol.-Beijing* 2006 136 429.
- [30] Wang, J.; Gong, X.G., "Research progress on anti-tumor and immune regulation of polysaccharide".
- [31] G. M. Cragg and D. J. Newman, "Plants as a source of anti-cancer agents," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 100, no. 1–2, pp. 72–79, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.jep.2005.05.011.
- [32] Md. Shamim Parvez¹, M. Aminur Rahman^{1*} and Fatimah Md. Yusoff ^{1,2}, "Sea Urchin Fisheries in Malaysia: Status, Potentials and Benefits," *Int J Chem Env. Biol Sci IJCEBS Vol 4 Issue 1 2016 ISSN 2320–4087*.
- [33] W. Shang *et al.*, "Functional properties of gonad protein isolates from three species of sea urchin: a comparative study," *J. Food Sci.*, vol. 85, no. 11, pp. 3679–3689, Nov. 2020, doi: 10.1111/1750-3841.15464.
- [34] L. Qin *et al.*, "Preparation and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 44, no. 4, pp. 1113–1118, May 2011, doi: 10.1016/j.lwt.2010.10.013.
- [35] C. Powell, A. D. Hughes, M. S. Kelly, S. Conner, and G. J. McDougall, "Extraction and identification of antioxidant polyhydroxynaphthoquinone pigments from the sea urchin, *Psammechinus miliaris*," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 59, no. 1, pp. 455–460, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.lwt.2014.05.016.
- [36] A. Archana and K. R. Babu, "Nutrient composition and antioxidant activity of gonads of sea urchin *Stomopneustes variolaris*," *Food Chem.*, vol. 197, pp. 597–602, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.003.
- [37] Abubakar, L., Mwangi, C., Uku, J., Ndirangu, S., "Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin *Tripneustes gratilla*," *Afr J Pharmacol Ther* 1 19–23.
- [38] C. Li, T. Haug, O. B. Styrvold, T. Ø. Jørgensen, and K. Stensvåg, "Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin,

- Strongylocentrotus droebachiensis,” *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 32, no. 12, pp. 1430–1440, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.dci.2008.06.013.
- [39] F. E. Russell, “Comparative pharmacology of some animal toxins,” *Fed. Proc.*, vol. 26, no. 4, pp. 1206–1224, 1967.
- [40] H. Jiao *et al.*, “Polysaccharide Constituents of Three Types of Sea Urchin Shells and Their Anti-Inflammatory Activities,” *Mar. Drugs*, vol. 13, no. 9, pp. 5882–5900, Sep. 2015, doi: 10.3390/md13095882.
- [41] Velar Martínez RE, Illnait-Zaragozı MT, Pérez HA, Monzote FL, “Actividad antifúngica in vitro de ocho extractos de invertebrados marinos frente a *Candida* spp,” *Rev. Cuba. Farm.* 2016 501–9.
- [42] L. G. Hernández Montiel, T. Rivas García, M. Romero Bastidas, C. J. Chiquito Contreras, F. H. Ruiz Espinoza, and R. G. Chiquito Contreras, “Potencial antagónico de bacterias y levaduras marinas para el control de hongos fitopatógenos,” *Rev. Mex. Cienc. Agríc.*, no. 20, Mar. 2018, doi: 10.29312/remexca.v0i20.1000.
- [43] M. S. Pereira, A.-C. E. S. Vilela-Silva, A.-P. Valente, and P. A. S. Mourão, “A 2-sulfated, 3-linked α -l-galactan is an anticoagulant polysaccharide,” *Carbohydr. Res.*, vol. 337, no. 21–23, pp. 2231–2238, Nov. 2002, doi: 10.1016/S0008-6215(02)00215-X.
- [44] R. Fonseca, G. Santos, and P. Mourão, “Effects of polysaccharides enriched in 2,4-disulfated fucose units on coagulation, thrombosis and bleeding: Practical and conceptual implications,” *Thromb. Haemost.*, vol. 102, no. 11, pp. 829–836, 2009, doi: 10.1160/TH08-11-0773.
- [45] V. M. Nhu Hieu, T. T. Thanh Van, C. T. T. Hang, N. P. Mischenko, F. Sergey A., and H. B. Truong, “Polyhydroxynaphthoquinone Pigment From Vietnam Sea Urchins as a Potential Bioactive Ingredient in Cosmeceuticals,” *Nat. Prod. Commun.*, vol. 15, no. 11, p. 1934578X2097252, Nov. 2020, doi: 10.1177/1934578X20972525.
- [46] E. E. AbouElmaaty, A. A. Ghobashy, M. H. Hanafy, M. H. Yassien, M. I. Ahmed, and M. M. Hamed, “Preliminary bioassay on antibacterial effects of *Tripneustes gratilla* extracts from the Red Sea, Egypt,” *Egypt. J. Aquat. Biol. Fish.*, vol. 24, no. 4, pp. 77–88, Jun. 2020, doi: 10.21608/ejabf.2020.95566.

- [47] Đặng Ngọc Bách, “‘Nghiên cứu thành phần hóa học và khảo sát hoạt tính sinh học loài Cầu gai *Diadema savignyi*.’ Luận văn thạc sĩ kỹ thuật, ĐH Khoc học Tự nhiên, 2014.” Luận văn thạc sĩ kỹ thuật, ĐH Khoc học Tự nhiên, 2014.
- [48] M. Pulfer and R. C. Murphy, “Electrospray mass spectrometry of phospholipids,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 22, no. 5, pp. 332–364, Sep. 2003, doi: 10.1002/mas.10061.
- [49] E. Falch, T. Rustad, R. Jonsdottir et al., “Geographical and seasonal differences in lipid composition and relative weight of by-products from gadiform species,” *J. Food Compos. Anal.* 2006 19 6-7727-736.
- [50] C. M. Talbott, I. Vorobyov, D. Borchman, K. G. Taylor, D. B. DuPré, and M. C. Yappert, “Conformational studies of sphingolipids by NMR spectroscopy. II. Sphingomyelin,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1467, no. 2, pp. 326–337, Aug. 2000, doi: 10.1016/S0005-2736(00)00229-7.
- [51] S. Ferguson-Yankey, C. Talbott, L. Li et al., “Sphingo-and glycerolipids: structural roles in mammalian lens membranes,” *Invest Ophthalmol 1998 Vis Sci.*
- [52] R. B. Gennis, *Biomembranes: molecular structure and function*. in Springer advanced texts in chemistry. New York: Springer-Verlag, 1989.
- [53] A. Yamaji-Hasegawa, F. Hullin-Matsuda, P. Greimel, and T. Kobayashi, “Pore-forming toxins: Properties, diversity, and uses as tools to image sphingomyelin and ceramide phosphoethanolamine,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1858, no. 3, pp. 576–592, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.bbamem.2015.10.012.
- [54] D. Borchman, W. C. Byrdwell, and M. C. Yappert, “Regional and age-dependent differences in the phospholipid composition of human lens membranes,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 35, no. 11, pp. 3938–3942, Oct. 1994.
- [55] T. J. McIntosh, S. A. Simon, D. Needham, and C. H. Huang, “Structure and cohesive properties of sphingomyelin/cholesterol bilayers,” *Biochemistry*, vol. 31, no. 7, pp. 2012–2020, Feb. 1992, doi: 10.1021/bi00122a017.
- [56] K.-A. Karlsson and B. E. Samuelsson, “The structure of ceramide aminoethylphosphonate from the sea anemone, *Metridium senile*,” *Biochim.*

- Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.*, vol. 337, no. 2, pp. 204–213, Feb. 1974, doi: 10.1016/0005-2760(74)90202-1.
- [57] R. C. Murphy and S. J. Gaskell, “New Applications of Mass Spectrometry in Lipid Analysis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 29, pp. 25427–25433, Jul. 2011, doi: 10.1074/jbc.R111.233478.
- [58] B. I. Andray, P. T. D. Ly, G. R. Viacheslav et al., “Fatty acid, Lipid class, and Phospholipid Molecular Species Composition of the Soft Coral *Xenia* sp. (Nha Trang Bay, the South China Sea, Vietnam),” *Springer June 2015* 50 6575-589.
- [59] D. T. P. Ly, T. Q. De, P. M. Quan et al., “Investigation of the lipid, phospholipid, fatty acid and phosphatidylcholine content and composition of the Vietnamese soft coral *capnella* sp,” *Vietnam J. Mar. Sci. Technol.* 2016 16 3306-314.
- [60] J. Li *et al.*, “A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems,” *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 10, no. 2, pp. 81–98, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.ajps.2014.09.004.
- [61] 1Hanaa H. Abd El Baky, 1, Farouk K. El Baz, 2Gamal S. El Baroty, 3Mohsen M. S. Asker, and and 1Eman A. Ibrahim, “Phospholipids of some marine microalgae: Identification, antiviral, anticancer and antimicrobial bioactivities,” *Pharma Chem.* 2014 669-18.
- [62] Đặng Thị Phương Ly, “Luận án Tiến Sĩ ‘Nghiên cứu thành phần lipid và các dạng phân tử của phospholipid từ một số loài san hô mềm ở Việt Nam’,” Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam, 2016.
- [63] M. Mishra, A. Sree, M. Acharya, and P. Das, “Fatty acid profile, volatiles and antibacterial screening of lipids of the sponge *Fasciospongia cavernosa* (Schmidt) collected from the bay of Bengal (Orissa coast),” *J. Serbian Chem. Soc.*, vol. 74, no. 11, pp. 1241–1248, 2009, doi: 10.2298/JSC0911241M.
- [64] A. E. B. H. El-Baroty GS, “Cytotoxicity, Antioxidants and Antimicrobial Activities of Lipids Extracted from Some Marine Algae,” *J. Aquac. Res. Dev.*, vol. 05, no. 07, 2014, doi: 10.4172/2155-9546.1000284.
- [65] T. Ohshima, Y. Fujita, and C. Koizumi, “Oxidative stability of sardine and mackerel lipids with reference to synergism between phospholipids and α -

- tocopherol,” *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 70, no. 3, pp. 269–276, Mar. 1993, doi: 10.1007/BF02545307.
- [66] T. Segawa, S. Hara, and Y. Totani, “Antioxidative Behavior of Phospholipids for Polyunsaturated Fatty Acids of Fish Oil. II,” *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, vol. 43, no. 6, pp. 515–519, 1994, doi: 10.5650/jos1956.43.515.
- [67] B. L. Peterson and B. S. Cummings, “A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 20, no. 3, pp. 227–243, Mar. 2006, doi: 10.1002/bmc.563.
- [68] J. Schiller *et al.*, “Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 43, no. 5, pp. 449–488, Sep. 2004, doi: 10.1016/j.plipres.2004.08.001.
- [69] V. Ruiz-Gutiérrez and M. C. Pérez-Camino, “Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds,” *J. Chromatogr. A*, vol. 885, no. 1–2, pp. 321–341, Jul. 2000, doi: 10.1016/S0021-9673(00)00181-3.
- [70] V. P. Skipski, R. F. Peterson, M. Barclay, “Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography,” *Biochem J* 1964 Feb 902 374–378.
- [71] A. David, B. Melvin, “Quantitative two-dimensional thin-layer chromatography of naturally occurring phospholipids,” *J. Lipid Res.* 1963628-631.
- [72] S. L. Abidi and T. L. Mounts, “High-performance liquid chromatography of phosphatidic acid,” *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, vol. 671, no. 1–2, pp. 281–297, Sep. 1995, doi: 10.1016/0378-4347(94)00602-2.
- [73] Y. Guan, Y. Zeng, W. Bai, and Y. Sun, “Utilization of *Candida utilis* Cells for the Production of Yeast Extract: Effects of Enzyme Types, Dosages and Treatment Time,” *Adv. J. Food Sci. Technol.*, vol. 5, no. 5, pp. 551–556, May 2013, doi: 10.19026/ajfst.5.3125.
- [74] Đặng Thị Thu, “Công nghệ Enzyme,” NXB Khoa học kỹ thuật, 2012.
- [75] O. L. Tavano, A. Berenguer-Murcia, F. Secundo, and R. Fernandez-Lafuente, “Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 17, no. 2, pp. 412–436, Mar. 2018, doi: 10.1111/1541-4337.12326.

- [76] D. Bhandari, S. Rafiq, Y. Gat, P. Gat, R. Waghmare, and V. Kumar, "A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety," *Int. J. Pept. Res. Ther.*, vol. 26, no. 1, pp. 139–150, Mar. 2020, doi: 10.1007/s10989-019-09823-5.
- [77] A. Gildberg and E. Stenberg, "A new process for advanced utilisation of shrimp waste," *Process Biochem.*, vol. 36, no. 8–9, pp. 809–812, Mar. 2001, doi: 10.1016/S0032-9592(00)00278-8.
- [78] R. Šližytė, E. Daukšas, E. Falch, I. Storrø, and T. Rustad, "Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products," *Process Biochem.*, vol. 40, no. 6, pp. 2021–2033, May 2005, doi: 10.1016/j.procbio.2004.07.016.
- [79] J. Gunasekaran, N. Kannuchamy, S. Kannaiyan, R. Chakraborti, and V. Gudipati, "Protein Hydrolysates from Shrimp (*Metapenaeus dobsoni*) Head Waste: Optimization of Extraction Conditions by Response Surface Methodology," *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, vol. 24, no. 5, pp. 429–442, Jul. 2015, doi: 10.1080/10498850.2013.787134.
- [80] K. F. Chai, A. Y. H. Voo, and W. N. Chen, "Bioactive peptides from food fermentation: A comprehensive review of their sources, bioactivities, applications, and future development," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 19, no. 6, pp. 3825–3885, Nov. 2020, doi: 10.1111/1541-4337.12651.
- [81] H. D. De Holanda and F. M. Netto, "Recovery of Components from Shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) Processing Waste by Enzymatic Hydrolysis," *J. Food Sci.*, vol. 71, no. 5, Jun. 2006, doi: 10.1111/j.1750-3841.2006.00040.x.
- [82] R. Ganugula, R. Chakrabarti, and K. R. S. S. Rao, "Distribution of Proteolytic Activity in the Different Protein Fractions of Tropical Shrimp Head Waste," *Food Biotechnol.*, vol. 22, no. 1, pp. 18–30, Feb. 2008, doi: 10.1080/08905430701863621.
- [83] S. S. Dey and K. C. Dora, "Optimization of the production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 51, no. 1, pp. 16–24, Jan. 2014, doi: 10.1007/s13197-011-0455-4.

- [84] Chokkara Madhu Babu, Rupsankar Chakrabarti, Krothapalli Raja Surya Sambasivarao, “Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids,” *LWT - Food Sci. Technol.* 412 227-235.
- [85] G. Wilson-Sanchez *et al.*, “Antimutagenicity and Antiproliferative Studies of Lipidic Extracts from White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*),” *Mar. Drugs*, vol. 8, no. 11, pp. 2795–2809, Nov. 2010, doi: 10.3390/md8112795.
- [86] C.-M. López-Saiz *et al.*, “Antimutagenic Compounds of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Isolation and Structural Elucidation,” *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, vol. 2016, pp. 1–7, 2016, doi: 10.1155/2016/8148215.
- [87] V. G. Tacias-Pascacio, R. Morellon-Sterling, E.-H. Siar, O. Tavano, Á. Berenguer-Murcia, and R. Fernandez-Lafuente, “Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 165, pp. 2143–2196, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060.
- [88] N. Ahmadifard, J. H. C. Murueta, A. Abedian-Kenari, A. Motamedzadegan, and H. Jamali, “Comparison the effect of three commercial enzymes for enzymatic hydrolysis of two substrates (rice bran protein concentrate and soy-been protein) with SDS-PAGE,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 53, no. 2, pp. 1279–1284, Feb. 2016, doi: 10.1007/s13197-015-2087-6.
- [89] Trần Thị Bích Thủy, Đỗ Thị Thanh Thủy, “Nghiên cứu ứng dụng enzyme protamex để thủy phân cá trích (*Sardinella gibbosa*) thu dịch đậm,” *Tạp Chí Khoa Học Và Công Nghệ Thủ Sản*, vol. 2/2016.
- [90] T. T. M. Thu, T. N. T. Mai, L. T. M. Thủy, and T. T. Trúc, “Nghiên cứu thu hồi dịch thủy phân từ đầu cá lóc (*Channa striata*) bằng enzyme alcalase và flavourzyme,” *Can Tho Univ. J. Sci.*, vol. 57, no. CĐ Công nghệ thực phẩm, pp. 85–92, May 2021, doi: 10.22144/ctu.jsi.2021.009.
- [91] Mươi N. V. and Vy H. T. T., “Khảo sát điều kiện hoạt động tối ưu của enzyme alcalase thủy phân protein từ thịt đầu tôm thẻ chân trắng,” *Can Tho Univ. J. Sci.*, vol. 54(Nông nghiệp), p. 148, 2018, doi: 10.22144/ctu.jsi.2018.077.
- [92] B. Liaset, K. Julshamn, and M. Espe, “Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of

- salmon frames with ProtamexTM,” *Process Biochem.*, vol. 38, no. 12, pp. 1747–1759, Jul. 2003, doi: 10.1016/S0032-9592(02)00251-0.
- [93] S. Sathivel, S. Smiley, W. Prinyawiwatkul, and P. J. Bechtel, “Functional and Nutritional Properties of Red Salmon (*Oncorhynchus nerka*) Enzymatic Hydrolysates,” *J. Food Sci.*, vol. 70, no. 6, Aug. 2005, doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb11437.x.
- [94] Souissi N., Bougatef A., Triki-Ellouz Y. and Nasri M. (2007), “Biochemical and functional properties of Sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates,” *Food Technology Biotechnol.* 45 2 Pp 187 - 194.
- [95] Ovissipour M., Abedian A., Motamedzadegan A., Rasco B., Safari R., Shahiri H., 2009a., “The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera.” *Food Chem.* 115 1 238-242.
- [96] A. Saiga, S. Tanabe, and T. Nishimura, “Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 12, pp. 3661–3667, Jun. 2003, doi: 10.1021/jf021156g.
- [97] Md. S. Islam, H. Wang, H. Admassu, A. A. Sulieman, and F. A. Wei, “Health benefits of bioactive peptides produced from muscle proteins: Antioxidant, anti-cancer, and anti-diabetic activities,” *Process Biochem.*, vol. 116, pp. 116–125, May 2022, doi: 10.1016/j.procbio.2022.03.007.
- [98] I. D. Nwachukwu and R. E. Aluko, “Antioxidant Properties of Flaxseed Protein Hydrolysates: Influence of Hydrolytic Enzyme Concentration and Peptide Size,” *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 95, no. 8, pp. 1105–1118, Aug. 2018, doi: 10.1002/aocs.12042.
- [99] M. M. Aondona, J. K. Ikya, M. T. Ukeyima, T. J. A. Gborigo, R. E. Aluko, and A. T. Girgih, “In vitro antioxidant and antihypertensive properties of sesame seed enzymatic protein hydrolysate and ultrafiltration peptide fractions,” *J. Food Biochem.*, vol. 45, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1111/jfbc.13587.
- [100] F. Hall, P. E. Johnson, and A. Liceaga, “Effect of enzymatic hydrolysis on bioactive properties and allergenicity of cricket (*Gryllobates sigillatus*) protein,” *Food Chem.*, vol. 262, pp. 39–47, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.04.058.

- [101] M. van Boekel *et al.*, “A review on the beneficial aspects of food processing,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 54, no. 9, pp. 1215–1247, Sep. 2010, doi: 10.1002/mnfr.200900608.
- [102] T. J. Ashaolu, “Applications of soy protein hydrolysates in the emerging functional foods: a review,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 55, no. 2, pp. 421–428, Feb. 2020, doi: 10.1111/ijfs.14380.
- [103] G. R., B. Q., and L. P., “Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 59, no. 1, pp. 15–32, Jun. 2002, doi: 10.1007/s00253-002-0975-y.
- [104] J. H. Chiang, S. M. Loveday, A. K. Hardacre, and M. E. Parker, “Effects of enzymatic hydrolysis treatments on the physicochemical properties of beef bone extract using endo- and exoproteases,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 54, no. 1, pp. 111–120, Jan. 2019, doi: 10.1111/ijfs.13911.
- [105] C. Kamnerdpetch, M. Weiss, C. Kasper, and T. Scheper, “An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 40, no. 4, pp. 508–514, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.05.006.
- [106] E. Kula, E. Kocadag Kocazorbaz, H. Moulahoum, S. Alpat, and F. Zihnioglu, “Extraction and characterization of novel multifunctional peptides from *Trachinus Draco* (greater weever) myofibrillar proteins with ACE/DPP4 inhibitory, antioxidant, and metal chelating activities,” *J. Food Biochem.*, vol. 44, no. 5, May 2020, doi: 10.1111/jfbc.13179.
- [107] D.-H. Ngo, Z.-J. Qian, B. Ryu, J. W. Park, and S.-K. Kim, “In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems,” *J. Funct. Foods*, vol. 2, no. 2, pp. 107–117, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.jff.2010.02.001.
- [108] X. Li, Y. Luo, H. Shen, and J. You, “Antioxidant activities and functional properties of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) protein hydrolysates,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 92, no. 2, pp. 292–298, Jan. 2012, doi: 10.1002/jsfa.4574.
- [109] C.-F. Chi, F.-Y. Hu, B. Wang, Z.-R. Li, and H.-Y. Luo, “Influence of Amino Acid Compositions and Peptide Profiles on Antioxidant Capacities of Two Protein Hydrolysates from Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Dark Muscle,”

- Mar. Drugs*, vol. 13, no. 5, pp. 2580–2601, Apr. 2015, doi: 10.3390/md13052580.
- [110] “T. C. V. Nam (1990), TCVN 3700 Thủy sản - Phương pháp xác định hàm lượng nước.”
- [111] “T. C. V. Nam, TCVN 5105 Thủy sản - Phương pháp xác định hàm lượng tro, 1990.”
- [112] “TCVN 3705-90, phương pháp xác định hàm lượng nitơ tổng số và protein thô đối với các nguyên liệu, bán thành phẩm và sản phẩm thủy sản.”
- [113] H. Mæhre, I.-J. Jensen, and K.-E. Eilertsen, “Enzymatic Pre-Treatment Increases the Protein Bioaccessibility and Extractability in Dulse (*Palmaria palmata*),” *Mar. Drugs*, vol. 14, no. 11, p. 196, Oct. 2016, doi: 10.3390/md14110196.
- [114] J. H. Waterborg and H. R. Matthews, “The Lowry Method for Protein Quantitation,” in *Proteins*, vol. 1, New Jersey: Humana Press, 1984, pp. 1–4. doi: 10.1385/0-89603-062-8:1.
- [115] E. G. Bligh and W. J. Dyer, “A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION,” *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 37, no. 8, pp. 911–917, Aug. 1959, doi: 10.1139/o59-099.
- [116] “The AOCS Lipid Library (2014) Mass spectrometry of fatty acid derivatives. <http://lipidlibrary.aocs.org/ms/masspec.html>. Accessed Aug 2014.”
- [117] “T. C. V. Nam (2009), TCVN8126 Thực phẩm - Xác định hàm lượng chì, cadimi, kẽm, đồng và sắt - Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử sau khi đã phân hủy bằng vi sóng.”
- [118] H. K. Lichtenthaler and C. Buschmann, “Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV - VIS Spectroscopy,” *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.*, vol. 1, no. 1, Aug. 2001, doi: 10.1002/0471142913.faf0403s01.
- [119] Panadda Phattanawasin, Uthai Sotanaphun, Lawan Sriphong, Inthira Kanchanaphibool, and Nusara Piyapolrunroj, “A Comparison of Image Analysis Software for Quantitative TLC of Ceftriaxone Sodium,” *I*, vol. 5, p. Silpakorn University Science and Technology Journal, 2011, doi: 10.14456/SUSTJ.2011.1.

- [120] A. B. Imbs and L. T. P. Dang, “The molecular species of phospholipids of the cold-water soft coral *Gersemia rubiformis* (Ehrenberg, 1834) (Alcyonacea, Nephtheidae),” *Russ. J. Mar. Biol.*, vol. 43, no. 3, pp. 239–244, May 2017, doi: 10.1134/S1063074017030051.
- [121] W. H. Organization, *Working group on the safety and efficacy of herbal medicine, 2000, Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization.*
- [122] B. Y. Tế, *Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y và thuốc từ dược liệu, 2015, Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27 tháng 10 năm 2015 của Cục khoa học công nghệ và đào tạo Bộ Y Tế.*
- [123] Imanari T., Hirota M. and Miyazaki M., “Improved assay method for superoxide dismutase,” *Igakano Ayumi* 101 496-497, 1977.
- [124] P. Phattanawasin, U. Sotanaphun, L. Sriphong et al., “A comparison of image analysis software for quantitative TLC of ceftriaxone sodium,” *Sci. Eng. Health Stud.* 2011 5 17-13.
- [125] V. I. Svetashev and V. E. Vaskovsky, “A simplified technique for thin-layer microchromatography of lipids,” *J. Chromatogr. A*, vol. 67, no. 2, pp. 376–378, May 1972, doi: 10.1016/S0021-9673(01)91245-2.
- [126] Nguyễn Xuân Duy, Phạm Thị Hiền, “Thành phần hóa học của trứng Cầu gai *Tripneustes gratilla* thu hoạch ở miền Trung Việt Nam.,” *Tap chí Nông Nghiệp Và Phát Triển Nông Thôn Kỳ II Tháng 4 Năm 2011.*
- [127] Yu-Chun Chen, Tai-Yuan Chen, Tze-Kuei Chiou, and Deng-Fwu Hwang, “Seasonal Variation on General Composition, Free Amino Acids and Fatty Acids in the Gonad of Taiwan’s Sea Urchin *Tripneustes gratilla*,” *J. Mar. Sci. Technol.*, vol. 21, no. 6, Jan. 2013, doi: 10.6119/JMST-013-0429-1.
- [128] C. Liyana-Pathirana, F. Shahidi, A. Whittick, and R. Hooper, “LIPID AND LIPID SOLUBLE COMPONENTS OF GONADS OF GREEN SEA URCHIN (*STRONGYLOCENTROTUS DROEBACHIENSIS*),” *J. Food Lipids*, vol. 9, no. 2, pp. 105–126, Jun. 2002, doi: 10.1111/j.1745-4522.2002.tb00213.x.
- [129] T. Dincer and S. Cakli, “Chemical Composition and Biometrical Measurements of the Turkish Sea Urchin (*Paracentrotus Lividus*, Lamarck, 1816

-),” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 47, no. 1, pp. 21–26, Jan. 2007, doi: 10.1080/10408390600550265.
- [130] Spiegel, M., McBride, S. C., Marciano, S., and Lupatsch, I., “The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin *Paracentrotus lividus*,” *Eff. Photoperiod Temp. Reprod. Eur. Sea Urchin Paracentrotus Lividus 2003*.
- [131] J. R. Mora, M. Iwata, and U. H. von Andrian, “Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 9, pp. 685–698, Sep. 2008, doi: 10.1038/nri2378.
- [132] A. Cardin and M. L. Meara, “The Lipids of Sea-Urchin Semen,” *J. Exp. Biol.*, vol. 30, no. 4, pp. 561–566, Dec. 1953, doi: 10.1242/jeb.30.4.561.
- [133] M. Mita, A. Oguchi, S. Kikuyama, H. Namiki, I. Yasumasu, and M. Nakamura, “Comparison of sperm lipid components among four species of sea-urchin based on echinoid phylogeny,” *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.*, vol. 108, no. 4, pp. 417–422, Aug. 1994, doi: 10.1016/0305-0491(94)90093-0.
- [134] C. Chen and C. P. Tripp, “A comparison of the behavior of cholesterol, 7-dehydrocholesterol and ergosterol in phospholipid membranes,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1818, no. 7, pp. 1673–1681, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.bbamem.2012.03.009.
- [135] C. Bernsdorff and R. Winter, “Differential Properties of the Sterols Cholesterol, Ergosterol, β -Sitosterol, *trans*-7-Dehydrocholesterol, Stigmasterol and Lanosterol on DPPC Bilayer Order,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, no. 38, pp. 10658–10664, Sep. 2003, doi: 10.1021/jp034922a.
- [136] D. M. Pereira, P. Valentão, N. Teixeira, and P. B. Andrade, “Amino acids, fatty acids and sterols profile of some marine organisms from Portuguese waters,” *Food Chem.*, vol. 141, no. 3, pp. 2412–2417, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.120.
- [137] M. Edidin, “The State of Lipid Rafts: From Model Membranes to Cells,” *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 32, no. 1, pp. 257–283, Jun. 2003, doi: 10.1146/annurev.biophys.32.110601.142439.

- [138] Fujino, Y., Negishi, T., & Umatani, K., “Studies on lipids in the sea urchin egg. Part I. On the chemical changes of lipids during curing with salt”.,” *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 1970 17 343–349.
- [139] Mol, S., Baygar, T., Varlik, C., & Tosun, S. Y., “Seasonal variations in yield, fatty acids, amino acids and proximate composition of sea urchin *Paracentrotus lividus* roe”,” *J. Food Drug Anal.* 162 68–74.
- [140] G. Chen *et al.*, “A comparative analysis of lipid and carotenoid composition of the gonads of *Anthocidaris crassispina*, *Diadema setosum* and *Salmacis sphaeroides*,” *Food Chem.*, vol. 120, no. 4, pp. 973–977, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.11.034.
- [141] S. V. Khotimchenko and I. V. Kulikova, “Lipids of Different Parts of the Lamina of *Laminaria japonica* Aresch.,” *Bot. Mar.*, vol. 43, no. 1, Jan. 2000, doi: 10.1515/BOT.2000.008.
- [142] A. B. Imbs, E. V. Ermolenko, V. P. Grigorchuk, T. V. Sikorskaya, and P. V. Velansky, “Current Progress in Lipidomics of Marine Invertebrates,” *Mar. Drugs*, vol. 19, no. 12, p. 660, Nov. 2021, doi: 10.3390/md19120660.
- [143] E. V. Ermolenko, T. V. Sikorskaya, and V. P. Grigorchuk, “The Phospholipid Molecular Species Profile of *Apostichopus japonicus* Tissues Modifies through Exposure to n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Deficient Diet,” *Mar. Drugs*, vol. 20, no. 9, p. 578, Sep. 2022, doi: 10.3390/md20090578.
- [144] Emiliano Manzo,^{1,*} Laura Fioretto,¹ Dario Pagano,¹ Genoveffa Nuzzo,¹ Carmela Gallo,¹ Raffaele De Palma,² and Angelo Fontana¹, “Chemical Synthesis of Marine-Derived Sulfoglycolipids, a New Class of Molecular Adjuvants,” *Mar Drugs* 2017 Sep 159 288 *Publ. Online 2017 Sep 20 Doi 103390md15090288*.
- [145] O. L. Awuor, M. Edward Kirwa, M. Betty, and M. F. Jackim, “Optimization of Alcalase hydrolysis conditions for production of Daga (*Rastrineobola argentea*) Protein hydrolysate with antioxidative properties,” *Ind. Chem.*, vol. 03, no. 01, 2017, doi: 10.4172/2469-9764.1000122.
- [146] B. Mbatia, D. Adlercreutz, P. Adlercreutz, A. Mahadhy, F. Mulaa, and B. Mattiasson, “Enzymatic oil extraction and positional analysis of ω -3 fatty acids in

Nile perch and salmon heads,” *Process Biochem.*, vol. 45, no. 5, pp. 815–819, May 2010, doi: 10.1016/j.procbio.2010.02.010.

- [147] A. Y. T. Putra, D. F. Rosida, and A. D. Priyanto, “Influence of Enzyme Concentration and Hydrolysis Time on Soluble Protein Content of Protein Hydrolysate Prepared from Apple Snail (*Pila ampullacea*),” *Int. J. Eco-Innov. Sci. Eng.*, vol. 2, no. 02, pp. 26–29, Nov. 2021, doi: 10.33005/ijeise.v2i02.46.
- [148] A. Noman *et al.*, “Influence of Degree of Hydrolysis on Chemical Composition, Functional Properties, and Antioxidant Activities of Chinese Sturgeon (*Acipenser sinensis*) Hydrolysates Obtained by Using Alcalase 2.4L,” *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, vol. 28, no. 6, pp. 583–597, Jul. 2019, doi: 10.1080/10498850.2019.1626523.

PHỤ LỤC