

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



TRẦN DUY PHONG

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT HÓA HỌC

Hà Nội - Năm 2024

TRẦN DUY PHONG

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT HÓA HỌC

2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

TRẦN DUY PHONG

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT HÓA HỌC

Mã số: 9 52 03 01

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)



Nguyễn Thị Trung

Trần Duy Phong
Trần Duy Phong

Trần Quốc Tuấn
Trần Quốc Tuấn

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

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

Hà Nội, ngày 08 tháng 4 năm 2024

Tác giả luận án
(Ký và ghi rõ họ tên)



Trần Duy Phong

LỜI CẢM ƠN

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

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

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

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

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

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

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày 8 tháng 4 năm 2024

Tác giả luận án
(Ký và ghi rõ họ tên)



Trần Duy Phong

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	3
1.1. Giới thiệu rong Nâu.....	3
1.1.1. Đặc điểm, phân bố của rong Nâu.....	3
1.1.2. Một số ứng dụng của rong Nâu	3
1.1.3. Thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của rong Nâu.....	4
1.2. Các công nghệ chế biến một số sản phẩm từ rong Nâu	11
1.2.1. Công nghệ truyền thống.....	11
1.2.2. Công nghệ hiện đại	19
1.3. Định hướng nghiên cứu.....	33
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	35
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	35
2.1.1. Mẫu rong Nâu	35
2.1.2. Hóa chất và thiết bị	38
2.2. Các phương pháp nghiên cứu.....	38
2.2.1. Phương pháp xác định hàm lượng phenolic tổng	38
2.2.2. Phương pháp xác định alginate.....	38
2.2.3. Phương pháp sàng lọc ảo (<i>in silico docking</i>).....	40
2.2.4. Phương pháp xác định hàm lượng và thành phần lipid	40
2.2.5. Phương pháp xác định thành phần và hàm lượng các axit béo.....	41
2.2.6. Xác định hàm lượng fucoidan bằng phương pháp so màu	41
2.3. Phương pháp đánh giá tác dụng sinh học.....	43
2.3.1. Phương pháp đánh giá chỉ tiêu an toàn.....	43
2.3.2. Phương pháp xác định độc tính cấp.....	43
2.3.3. Nghiên cứu tính độc bán trường diễn	44
2.3.4. Phương pháp đánh giá tác dụng đào thải kim loại nặng	46
2.3.5. Phương pháp đánh giá khả năng chống loãng xương	46
2.3.6. Phương pháp thử hoạt tính chống oxi hóa	48
2.3.7. Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào.....	48
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	49
3.1. Nghiên cứu khảo sát đánh giá nguyên liệu.....	49

3.1.1. Nghiên cứu khảo sát hàm lượng alginate của một số loại rong Nâu thu hoạch tại biển Việt Nam	49
3.1.2. Nghiên cứu khảo sát hàm lượng các axit béo và lớp chất lipid	52
3.1.3. Nghiên cứu dự đoán khả năng ức chế enzym tyrosinase của một số hợp chất phân lập từ rong Mơ	56
3.1.4. Lựa chọn rong nguyên liệu cho quy trình công nghệ	60
3.2. Kết quả nghiên cứu chiết xuất phenolic từ rong Mơ	61
3.2.1. Quy trình công nghệ chiết xuất phenolic từ rong Mơ	61
3.2.2. Kết quả nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết phenolic theo phương pháp chiết hỗ trợ vi sóng	62
3.2.3. Kết quả tối ưu hóa điều kiện chiết xuất phenolic từ rong Mơ bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM)	67
3.2.4. Đánh giá hoạt chất cao chiết phenolic	73
3.3. Nghiên cứu quy trình chiết xuất fucoidan từ bã rong	74
3.3.1. Quy trình công nghệ chiết xuất fucoidan từ bã rong	74
3.3.2. Các yếu tố tác động tới quá trình chiết tách fucoidan	75
3.4. Kết quả nghiên cứu chiết xuất alginate	81
3.4.1. Quy trình công nghệ chiết xuất alginate	81
3.4.2. Kết quả nghiên cứu quá trình thủy phân nguyên liệu bởi enzyme	83
3.4.3. Nghiên cứu quá trình chiết xuất alginate và thu nhận Canxi alginate	86
3.5. Đánh giá chất lượng và một số hoạt tính của Canxi alginate	93
3.5.1. Đánh giá chất lượng Canxi alginate	93
3.5.2. Đánh giá hoạt tính chống loãng xương của Canxi alginate	94
3.5.3. Kết quả nghiên cứu về độ an toàn của Canxi alginate	95
3.5.4. Đánh giá tác dụng đào thải kim loại nặng của Canxi alginate	103
3.6. Nghiên cứu xử lý các phụ phẩm của quá trình chế biến	105
3.6.1. Thành phần cơ bản của bã rong Mơ sau khi chiết alginate	105
3.6.2. Nghiên cứu lựa chọn chế phẩm vi sinh có khả năng phân giải bã rong Mơ sau chiết alginate	106
3.6.3. Theo dõi sự biến động của một số yếu tố trong quá trình ủ bã rong bằng chế phẩm S.EM	106
3.6.4. Đánh giá thành phần phân bón từ bã rong	108

3.7. Xây dựng quy trình công nghệ tích hợp chế biến các sản phẩm từ rong Mơ	109
3.7.1. Sơ đồ và thuyết minh quy trình.....	109
3.7.2. Đánh giá hiệu quả các quá trình chiết xuất.....	113
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	115
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	117
TÀI LIỆU THAM KHẢO	118

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu, chữ viết tắt	Diễn giải
ALP	Alkaline Phosphatase
ALT	Alanine Aminotransferase
AST	Aspartate Aminotransferase
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAE	Enzyme-assisted extraction (Chiết xuất hỗ trợ enzyme)
EDTA	Ethylene Diamine Tetracetic Acid
EPA	Axit Eicosapentaenoic
ExEA	Extrusion-assisted Extraction (Chiết xuất hỗ trợ ép đùn)
LD	Lethal dose (Liều gây chết trung bình)
GAE	Phương pháp tương đương axit gallic
HeLa	Tế bào ung thư cổ tử cung
MAE	Microwave - assisted extraction (Chiết xuất hỗ trợ vi sóng)
MCF-7	Tế bào ung thư vú
MUFA	Monounsaturated Fats Acids
MW	Molecular Weight (Trọng lượng phân tử)
PC-3	Tế bào ung thư tuyến tiền liệt
PGE	Polyglycerol Esters of Fatty Acids
PLE	Pressurized liquid extraction (Chiết chất lỏng điều áp)
PSE	Pressurized solvent extraction (chiết dung môi điều áp)
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids
RSM	Response Surface Methods (Phương pháp đáp ứng bề mặt)
SFE	Supercritical fluid extraction (Chiết lỏng siêu tới hạn)
TCVN	Tiêu chuẩn Việt Nam
UAE	Ultrasound – assisted extraction (Chiết xuất hỗ trợ siêu âm)

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Một số quy trình chiết alginate thông thường [10, 48].....	12
Bảng 1.2. Chiết phenolic từ rong Nâu theo phương pháp thông thường [56, 57].....	15
Bảng 1.3. Một số quy trình chiết fucoidan truyền thống [59].....	17
Bảng 1.4. Chiết xuất phenolic từ rong theo phương pháp PLE [56, 57].....	28
Bảng 2.1. Các mẫu rong Nâu sử dụng trong nghiên cứu.....	35
Bảng 2.2. Ký hiệu 7 nhóm chuột thử nghiệm.....	46
Bảng 3.1. Biến động theo tháng của axit alginic (%) trong một số mẫu rong Nâu.....	50
Bảng 3.2. Thành phần hóa học chính của một số loại rong Mơ.....	50
Bảng 3.3. Thành phần hóa học và tính chất lý hóa của canxi alginat chiết từ rong Mơ.....	51
Bảng 3.4. Kết quả về hàm lượng lipid tổng các mẫu rong Nâu.....	52
Bảng 3.5. Kết quả mô phỏng docking phân tử các hợp chất tiềm năng.....	57
Bảng 3.6. Dự đoán độc tính của các chất ức chế tiềm năng.....	59
Bảng 3.7. Các mức thí nghiệm của các biến công nghệ.....	67
Bảng 3.8. Ma trận kế hoạch hóa thực nghiệm của quá trình chiết xuất.....	68
Bảng 3.9. Bảng kết quả phân tích ANOVA của 2 hàm mục tiêu.....	69
Bảng 3.10. Bảng kết quả các hàm mục tiêu Y1, Y2.....	70
Bảng 3.11. Giá trị biến mã hóa và biến thực tại điều kiện tối ưu.....	72
Bảng 3.12. Giá trị các hàm mục tiêu tại điều kiện tối ưu.....	72
Bảng 3.13. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của mẫu cao chiết phenolic.....	73
Bảng 3.14. Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của mẫu cao chiết phenolic.....	74
Bảng 3.15. Thành phần hóa học của rong Mơ và bã rong Mơ sau chiết phenolic.....	74
Bảng 3.16. Thành phần hóa học của rong Mơ và bã thải rong Mơ sau chiết fucoidan.....	81
Bảng 3.17. Khảo sát tác động của việc xử lý nguyên liệu với enzyme.....	84
Bảng 3.18. Xác định chỉ tiêu chất lượng chính.....	93
Bảng 3.19. Kết quả phân tích chỉ tiêu vi sinh vật.....	93
Bảng 3.20. Chỉ tiêu hàm lượng kim loại nặng.....	94
Bảng 3.21. Kết quả đánh giá hoạt tính chống loãng xương của Canxi alginate.....	95
Bảng 3.22. Số lượng chuột chết, biểu hiện bên ngoài sau khi uống Canxi alginate.....	96
Bảng 3.23. Kết quả theo dõi khối lượng của chuột ở các lô.....	97
Bảng 3.24. Sự thay đổi trọng lượng chuột khi cho uống Canxi alginate (gram/con).....	98
Bảng 3.25. Các chỉ tiêu huyết học khi cho chuột uống Canxi alginate.....	99

Bảng 3.26. Một số chỉ tiêu hóa sinh khi uống Canxi alginate.....	100
Bảng 3.27. Ảnh hưởng của Canxi alginate đến nồng độ creatinin trong máu chuột	100
Bảng 3.28. Kết quả mổ giải phẫu cơ quan nội tạng khi uống Canxi alginate	101
Bảng 3.29. Trọng lượng của một số nội quan (gram/10 gram thể trọng)	102
Bảng 3.30. Phương án thử nghiệm đánh giá tác dụng đào thải kim loại nặng	103
Bảng 3.31. Thành phần cơ bản trong bã rong Mơ sau khi chiết alginate.....	105
Bảng 3.32. Ảnh hưởng của loại chế phẩm đến tỷ lệ C/N của khô ủ	106
Bảng 3.33. Một số chỉ tiêu đánh giá bã rong trước và sau khi ủ chế phẩm S.EM.....	109
Bảng 3.34. Hiệu quả sản xuất ở quy mô 5 kg nguyên liệu rong/mẻ.....	112
Bảng 3.35. Hiệu suất chiết theo các phương án kỹ thuật khác nhau	113
Bảng 3.36. So sánh hiệu suất chiết với một số nghiên cứu khác	114

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Biểu đồ sự xuất hiện của rong Nâu trên thế giới [1]	3
Hình 1.2. Các monomer có trong axit Alginic.....	5
Hình 1.3. Trình tự chuỗi alginate	5
Hình 1.4. Công thức cấu tạo của fucoidan	7
Hình 1.5. Công thức cấu tạo của fucoxanthin.....	9
Hình 1.6. Cấu trúc hóa học của một số loại phlorotannin	10
Hình 1.7. Sơ đồ định hướng nghiên cứu	34
Hình 2.1. Mẫu rong nguyên liệu <i>S. swartzii</i>	37
Hình 3.1. Hàm lượng alginate trong một số mẫu rong Nâu.....	49
Hình 3.2. Hàm lượng axit béo trong các mẫu rong Nâu được khảo sát.....	53
Hình 3.3. Biểu đồ hàm lượng các axit béo n-3 và n-6 trong các mẫu nghiên cứu	54
Hình 3.4. Biểu đồ hàm lượng axit béo n-7 và n-9 trong các mẫu nghiên cứu	55
Hình 3.5. Kết quả dự đoán năng lượng liên kết của các hợp chất với enzyme tyrosinase..	56
Hình 3.6. Cấu hình liên kết trong không gian hai chiều và ba chiều được dự đoán bởi phần mềm AutoDock4.2.6 của các hợp chất.....	59
Hình 3.7. Sơ đồ chiết phenolic trong rong Mơ	61
Hình 3.8. Biểu đồ ảnh hưởng của nồng độ etanol đến quá trình chiết phenolic	62
Hình 3.9. Biểu đồ ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu đến quá trình chiết phenolic..	63
Hình 3.10. Biểu đồ ảnh hưởng của thời gian vi sóng đến quá trình chiết phenolic.....	65
Hình 3.11. Biểu đồ ảnh hưởng của công suất vi sóng đến quá trình chiết phenolic.....	66
Hình 3.12. Mô hình bề mặt đáp ứng của hàm mục tiêu Y1	71
Hình 3.13. Mô hình bề mặt đáp ứng của hàm mục tiêu Y2.....	71
Hình 3.14. Điều kiện tối ưu và kết quả hàm mục tiêu	73
Hình 3.15. Sơ đồ chiết fucoidan từ bã rong Mơ	75
Hình 3.16. Ảnh hưởng của loại dung môi đến hàm lượng fucoidan của dịch chiết.....	76
Hình 3.17. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu đến hàm lượng fucoidan	77
Hình 3.18. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tách đến hàm lượng fucoidan.....	77
Hình 3.19. Ảnh hưởng của thời gian và cường độ sóng siêu âm đến hàm lượng fucoidan ..	78
Hình 3.20. Ảnh hưởng của hàm lượng CaCl ₂ tủa axit alginic trong dịch chiết tách đến độ sạch fucoidan thu nhận được.....	80
Hình 3.21. Ảnh hưởng của nồng độ etanol đến độ sạch và hiệu suất thu nhận fucoidan.	81

Hình 3.22. Sơ đồ chiết alginate từ bã rong Mơ.....	82
Hình 3.23. Ảnh hưởng của pH lên hàm lượng đường khử.....	84
Hình 3.24. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hàm lượng đường khử.....	85
Hình 3.25. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme/cơ chất lên hàm lượng đường khử.....	85
Hình 3.26. Ảnh hưởng của thời gian xử lý enzyme lên hàm lượng đường khử.....	86
Hình 3.27. Ảnh hưởng của nồng độ HCl xử lý bã rong tới hiệu suất và độ nhớt alginate chiết tách từ bã rong.....	86
Hình 3.28. Ảnh hưởng của nồng độ Na ₂ CO ₃ tới hiệu suất và độ nhớt alginate chiết tách từ bã rong.....	87
Hình 3.29. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu suất và độ nhớt alginate chiết từ bã rong.....	88
Hình 3.30. Ảnh hưởng của thời gian và cường độ sóng siêu âm đến hiệu suất alginate chiết tách từ bã rong.....	89
Hình 3.31. Ảnh hưởng của thời gian và cường độ sóng siêu âm đến độ nhớt alginate chiết tách từ bã rong.....	89
Hình 3.32. Ảnh hưởng của hàm lượng H ₂ O ₂ (dung dịch H ₂ O ₂ 5%) lên độ nhớt và độ truyền qua của sản phẩm alginate.....	91
Hình 3.33. Ảnh hưởng của tỷ lệ CaCl ₂ tới hiệu suất thu của Ca(Alg) ₂	92
Hình 3.34. Ảnh chuột sau khi thí nghiệm độc cấp tính.....	96
Hình 3.35. Ảnh gan, thận, lách chuột sau khi thí nghiệm độc bán trường diễn.....	101
Hình 3.36. Kết quả thử nghiệm tác dụng đào thải kim loại nặng của Canxi alginate.....	103
Hình 3.37. Ảnh hưởng của loại chế phẩm đến tỷ lệ C/N của khối ủ.....	106
Hình 3.38. Theo dõi diễn biến nhiệt độ trong đống ủ.....	107
Hình 3.39. Theo dõi sự biến động pH trong đống ủ.....	107
Hình 3.40. Theo dõi tỷ lệ C/N trong đống ủ.....	108
Hình 3.41. Bã rong trước khi ủ (a) và sau khi ủ 6 tuần (b).....	108
Hình 3.42. Sơ đồ quy trình chế biến toàn diện rong Mơ.....	110
Hình 3.43. Chế phẩm bột Canxi alginate.....	112

MỞ ĐẦU

Tại các vùng biển ở Việt Nam tính đến 2019 đã phát hiện được 834 loài rong biển, trong đó có hơn 147 loài rong Nâu có giá trị kinh tế cao, trữ lượng lớn. Rong Nâu phân bố từ biển Bắc đến Nam, tập trung nhiều nhất là ở biển miền Trung, trữ lượng của họ rong Mơ (Sargassaceae) là lớn nhất, có thể khai thác làm nguyên liệu sản xuất cho các sản phẩm cho công nghiệp, thực phẩm chức năng, dược phẩm...

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

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

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

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

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

- Khảo sát, đánh giá nguồn nguyên liệu rong Nâu thu được tại một số vùng biển Việt Nam (đánh giá hàm lượng alginate, lipit và axit béo; nghiên cứu dự đoán khả năng làm trắng da của một số hợp chất phân lập từ chi rong...)

- Sử dụng tích hợp các kỹ thuật tiên tiến như siêu âm, vi sóng, enzyme, ly tâm tốc độ cao... để xây dựng quy trình công nghệ chế biến toàn diện rong Nâu thành các sản phẩm có giá trị cao (fucoxanthin, phlorotannin, fucoidan, alginate...).

- Khảo sát, đánh giá chất lượng sản phẩm và một số hoạt tính sinh học của hợp chất phenolic và chế phẩm bột canxi alginate thu được từ quá trình chế biến rong Nâu.

Những đóng góp mới của luận án:

- Khảo sát, đánh giá nguyên liệu rong Nâu thu nhận từ các vùng biển Việt Nam, lựa chọn được đối tượng rong phù hợp để chiết xuất tối đa hàm lượng alginate và sản xuất chế phẩm Canxi alginate. Tiến hành đánh giá hoạt tính chống loãng xương, độ an toàn, tác dụng đào thải các kim loại nặng của Canxi alginate.

- Lần đầu tiên tiến hành sàng lọc ảo (*in silico docking*) đối với các hợp chất phenolic từ rong Nâu để đánh giá tiềm năng ức chế enzyme Tyrosinase, qua đó định hướng cho nghiên cứu tiếp theo về thực nghiệm sản xuất chế phẩm làm trắng da.

- Lần đầu tiên tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) đối với quy trình chiết xuất phenolic từ rong Nâu theo phương pháp hỗ trợ vi sóng.

- Lần đầu tiên sử dụng tích hợp các kỹ thuật tiên tiến (chiết siêu âm, chiết vi sóng, chiết enzyme...) để chiết xuất toàn diện các sản phẩm có giá trị từ đối tượng rong Nâu.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Giới thiệu rong Nâu

1.1.1. Đặc điểm, phân bố của rong Nâu

Ngành rong Nâu bao gồm 16 bộ với khoảng 285 chi và khoảng 2040 loài, trong đó khoảng 1500 loài được xác định trên toàn thế giới [1]. Các chi như *Cystoseira*, *Dictyota*, *Ectocarpus*, *Sargassum*, và *Sphacelaria* bao gồm một số lượng lớn các loài [2, 3]. Ngoại trừ một số chi sống ở vùng nước ngọt (ít hơn 1%), hầu hết các loại rong Nâu đều sống ở biển và phần lớn phát triển ở các khu vực nước nông và vùng gian triều [1, 4]. Khoảng 95% các loài rong Nâu phân bố ở vùng nước lạnh đến ôn đới.



Hình 1.1. Biểu đồ sự xuất hiện của rong Nâu trên thế giới [1]

Tính đến năm 2013, ở Việt Nam đã ghi nhận được 827 loài, thuộc 4 ngành là rong Lam (Cyanophyta), rong Đỏ (Rhodophyta), rong Nâu (Ochrophyta) và rong Lục (Chlorophyta). Đến nay, vẫn chưa có công trình nào đánh giá được tổng trữ lượng rong biển trên toàn vùng biển Việt Nam bởi các nghiên cứu thường chỉ được tiến hành ở từng khu vực riêng biệt và mới đưa ra trữ lượng của một số loài rong biển kinh tế tại thời điểm nghiên cứu. Một số chương trình điều tra, đánh giá nguồn lợi rong biển đưa ra trữ lượng chi rong Mỡ (*Sargassum*) thuộc ngành rong Nâu của Việt Nam vào khoảng 35.000 – 75.000 tấn [5].

1.1.2. Một số ứng dụng của rong Nâu

Sử dụng làm thực phẩm: Rong Nâu làm thực phẩm nhiều nhất là các loài thuộc chi *Laminaria* (như *L. japonica*, *L. ochotensis*, *L. angustata*, *L. coriacea* và *Laminaria longissima*) phân bố tự nhiên ở Hàn Quốc, Nhật Bản và được nuôi trồng thành công ở Trung Quốc [4, 5].

Làm phân bón: Các loài rong thuộc chi *Ascophyllum*, *Ecklonia* và *Fucus* thường được dùng như chất phụ gia điều hòa đất và phân bón vì trong rong có chứa nhiều hợp chất nitơ, kali và phốt pho. Tại Việt Nam, người dân thường lấy rong Mơ bón cho lúa, khoai sắn, đậu, cải củ, mía, cà phê, cà chua, dưa hấu rất tốt [5].

Chế biến keo rong: Loại keo rong được chế biến chủ yếu nhất từ rong Nâu là alginate. Các loài thuộc chi *Sargassum* được sử dụng nhiều để sản xuất alginate. Ngoài ra, alginate được sản xuất ở Mỹ, Châu Âu và Trung Quốc còn từ các loài thuộc chi *Laminaria*, *Macrocystis*, *Ecklonia*, *Durvillea*, *Ascophyllum* [5].

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

Điều chế các chất có hoạt tính sinh học: Rong biển chứa các polysaccharid có ý nghĩa trong ngành y dược. Đặc biệt trong rong Nâu chứa nhiều alginate, được sử dụng trong điều trị bệnh tim mạch, chống đông máu, chống oxy hóa và hạ huyết áp,... Một số loài rong Nâu thường được sử dụng là *Saccharina japonica* - tên thương phẩm: Laminaria hoặc haidai; *Ecklonia kurome*; một số loài thuộc chi *Sargassum*, có tác dụng để điều trị ung; *Saccharina* khô dùng để làm giãn cổ tử cung [5].

Làm thức ăn chăn nuôi: Từ lâu, rong biển đã được sử dụng làm thức ăn cho gia súc (cừu, bò, ngựa) ở các vùng ven biển. Ngày nay, rong biển làm thức ăn gia súc được sản xuất ở quy mô công nghiệp (dạng bột) [7].

1.1.3. Thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của rong Nâu

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

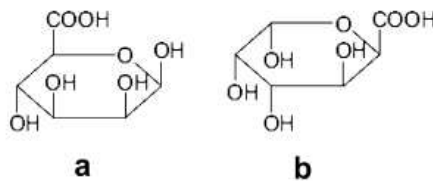
1.1.3.1. Carbonhydrate

Trong thành phần của rong biển, polysaccharid là thành phần quan trọng nhất xét về mặt hàm lượng hóa học và giá trị thương mại. Các polysaccharit chủ yếu được chia thành ba nhóm: polysaccharit cấu trúc, chất nhầy giữa các tế bào và polysaccharit lưu trữ. Tính chất hóa học của các polysaccharit này không chỉ khác với các tính chất

được tìm thấy trong thực vật trên cạn mà còn giữa các lớp rong biển [8]. Các polysaccharit chính của rong Nâu là axit alginic (alginate), fucoidan và laminaran.

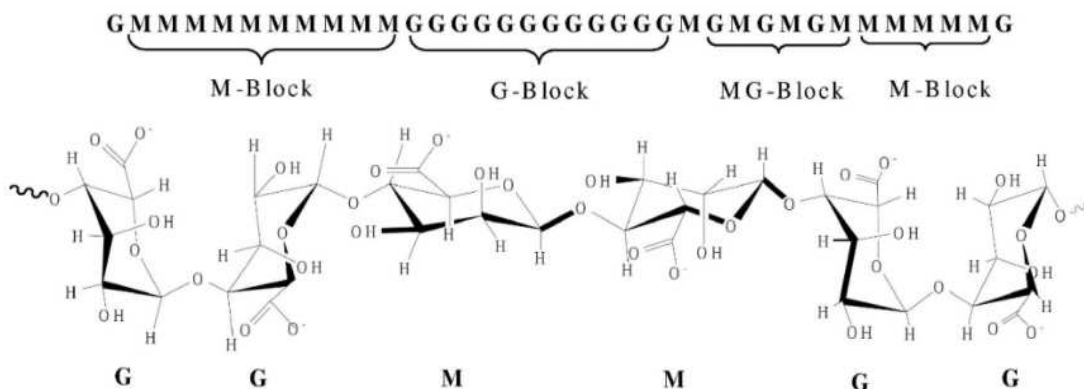
❖ *Alginate*

Alginate chiết xuất từ rong Nâu ở cả dạng axit và muối. Dạng axit là một axit polyuronic mạch thẳng, được gọi là axit alginic; dạng muối là thành phần quan trọng của thành tế bào trong tất cả rong Nâu, chiếm tới 40–47% trọng lượng khô của sinh khối rong biển. Hầu hết các loại rong Nâu là nguồn alginate tiềm năng. Hàm lượng axit alginic khác nhau giữa các loài và mùa thu hoạch và thường chiếm từ 10% đến 30% trọng lượng rong khô. Đặc tính của alginate phụ thuộc vào loài rong biển và loại alginate có trong chúng [9].



(a) axit β -D-mannuronic; (b) axit α -L-guluronic

Hình 1.2. Các monomer có trong axit Alginic.



Hình 1.2. Trình tự chuỗi alginate

Axit alginic bao gồm các đơn vị axit β -D-mannuronic (M) và gốc axit α -L-guluronic (G) nối với nhau bằng liên kết β -1,4. Các đơn vị này được phân phối ngẫu nhiên trong một chuỗi mạch thẳng. Chúng cũng có thể được sắp xếp thành các khối đồng nhất MM hoặc GG và không đồng nhất hoặc xen kẽ như MG. Đặc tính vật lý khác nhau của alginate giữa các loài là do tỷ lệ khác nhau của các gốc axit mannuronic và axit guluronic. Trọng lượng phân tử của các chế phẩm thương mại nằm trong khoảng từ 32.000 đến 200.000, với mức độ trùng hợp từ 180-930 [8].

Alginate là muối của axit alginic chuỗi dài, trong rong Nâu xuất hiện chủ yếu dưới dạng muối canxi của axit alginic, mặc dù muối magiê, kali và natri cũng có mặt.

Natri alginate là polyme tan trong nước tạo ra dung dịch có độ nhớt cao, có khả năng tạo gel với sự có mặt của các cation đa hóa trị, chẳng hạn như canxi, natri alginate [10].

Alginate được ứng dụng ở nhiều lĩnh vực do tính chất lưu biến, khả năng tương thích sinh học, khả năng phân hủy sinh học và ít độc tính. Tỷ lệ của ba loại khối – MM, GG và MG xác định tính chất vật lý của alginate – alginate có G cao có đặc tính tạo gel cao hơn, trong khi những loại có M cao có độ nhớt cao hơn. Việc đánh giá tỷ lệ M/G cũng rất cơ bản – đối với alginate có tỷ lệ M/G cao, alginate tạo ra gel đàn hồi, trong khi đối với alginate có tỷ lệ M/G thấp tạo ra gel giòn [10].

Nhiều ngành công nghiệp liên quan đến chế biến thực phẩm, dược phẩm, thức ăn chăn nuôi và mỹ phẩm sử dụng axit alginic chiết xuất từ *Saccharina* và *Undaria*. Axit alginic thô được tinh chế để sử dụng làm phụ gia thực phẩm. Trong thực phẩm, chúng chủ yếu được sử dụng làm chất ổn định trong kem, phomai, siro và topping [8].

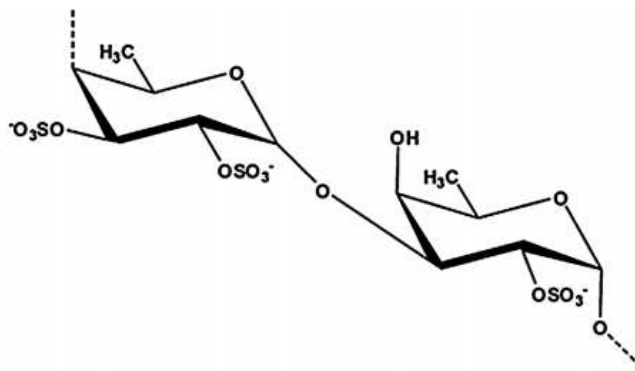
Axit alginic có nhiều tác dụng như: Chống tăng huyết áp, giảm nồng độ cholesterol, có thể ngăn chặn sự hấp thụ các chất hóa học độc hại và đóng vai trò chính là chất xơ tiêu hóa để duy trì sức khỏe; Chống lại chất gây ung thư tiềm ẩn, làm sạch hệ thống tiêu hóa và bảo vệ màng bề mặt của dạ dày và ruột; Hấp thụ các chất như cholesterol, sau đó được loại bỏ khỏi hệ thống tiêu hóa và dẫn đến các phản ứng hạ đường huyết. Alginate với trọng lượng phân tử ≥ 50 kDa có thể ngăn ngừa bệnh béo phì, hạ cholesterol máu và tiểu đường [11, 12]. Trong điều trị bệnh tiểu đường loại II, uống 5 g natri alginate mỗi sáng giúp ngăn chặn sự gia tăng nồng độ glucose, insulin và C-peptide sau bữa ăn và làm chậm quá trình vận chuyển xuống dạ dày. Bữa ăn bổ sung 5% alginate tảo bẹ làm giảm cân bằng hấp thụ glucose trong 8 giờ ở lợn. Các nghiên cứu tương tự đã được thực hiện trên chuột và người [13].

Một tác dụng đối với sức khỏe khác là đặc tính liên kết của axit alginic với các ion kim loại hóa trị hai, với mức độ tạo gel hoặc kết tủa với các kim loại trong khoảng $Ba < Pb < Cu < Sr < Cd < Ca < Zn < Ni < Co < Mn < Fe < Mg$. Không có enzyme đường ruột nào có thể tiêu hóa axit alginic. Điều này có nghĩa là các kim loại nặng được đưa vào cơ thể con người sẽ bị axit alginic trong ruột tạo thành gel hoặc dạng kết tủa và không thể hấp thụ vào mô cơ thể [9].

Tác dụng cầm máu của alginate cũng được khai thác trong phẫu thuật. Băng gạc, bông, gạc và các vật liệu đặc biệt được tẩm dung dịch natri alginate được sản xuất và sử dụng bên ngoài và bôi lên các điểm chảy máu trong quá trình phẫu thuật trên các cơ quan nhu mô [14].

❖ *Fucoidan*

Rong Nâu chứa fucoidan polysaccharit sunfat, một loại axit polyuronic, là chất xơ hòa tan trong nước. Fucoidan, được đặt tên bởi Kylin vào năm 1915, là một polyme của fucan sulfat gồm các đơn vị L-fucose-4-sulfate được liên kết với nhau bằng liên kết 1,2 và trong một số trường hợp, nó còn chứa thêm fucan sulfat với liên kết 1,3 hoặc 1,4, mang chuỗi mạch bên của các gốc galactose, xyloza hoặc uronic. Hàm lượng fucoidan thay đổi từ ít nhất là 2% trong họ Laminariaceae đến hơn 20% (trọng lượng khô) trong họ Fucaceae, có mối liên hệ giữa hàm lượng fucoidan và độ sâu mà rong phát triển (hàm lượng này giảm khi độ sâu của rong tăng) [8].



Hình 1.3. Công thức cấu tạo của fucoidan

Fucoidan được tìm thấy chủ yếu trong thành tế bào của rong Nâu, nhưng không có ở các loại tảo hoặc thực vật bậc cao khác. Fucoidan có thể chiếm hơn 40% trọng lượng khô của chiết xuất thành tế bào tảo rong và có thể dễ dàng chiết bằng nước nóng hoặc dung dịch axit. Fucoidan nhớt ở nồng độ rất thấp, dễ bị phân hủy bởi axit hoặc bazơ pha loãng [15].

Fucoidan được biết là có nhiều đặc tính sinh học như chống đông máu, chống ung thư và kháng vi-rút [16 - 21]. Ngoài ra, fucoidan thể hiện hoạt tính chống oxy hóa đáng kể trong các thí nghiệm in vitro [22, 23].

❖ *Laminaran*

Laminaran là polysaccharit dự trữ được tìm thấy phổ biến trong rong biển Nâu và bao gồm khoảng 20 gốc glucose nối với nhau bằng liên kết β -1,3. Hàm lượng laminaran thay đổi theo mùa và theo môi trường sống và có thể đạt tới 32% trọng lượng khô [9]. Laminaran có khả năng bảo vệ chống nhiễm trùng do vi khuẩn và bảo vệ chống lại sự chiếu xạ nghiêm trọng, tăng cường miễn dịch, ức chế khối u, chống đông máu và giảm cholesterol trong máu [9, 24, 25].

1.1.3.2. Lipid

Lipid là một nhóm rộng lớn các phân tử tự nhiên bao gồm chất béo, sáp, sterol, vitamin tan trong chất béo (chẳng hạn như vitamin A, D, E và K), mono-, di- và triacylglycerol, diglyceride, phospholipid và các loại khác. Hàm lượng lipid trong rong Nâu trung bình chỉ 1 – 3% trọng lượng khô, thấp hơn so với các sinh vật biển khác.

Các axit béo của rong Nâu thường có mạch thẳng, số nguyên tử carbon chẵn và có một hoặc nhiều liên kết đôi. Đặc biệt, rong Nâu có các axit béo thiết yếu như axit eicosapentanoic (EPA, C20:5n-3). Rong Nâu giàu axit béo với 20 nguyên tử carbon là EPA và axit arachidonic (AA, C20:4n-6). Tỷ lệ axit béo n-6/n-3 là rất quan trọng đối với lượng ăn vào của con người vì cả hai loại này cạnh tranh cùng một loại enzyme để tổng hợp các tuyến tiền liệt có nguồn gốc từ cả hai họ n-3 và n-6. *Sargassum* có tỷ lệ n-6/n-3 tốt (0,3) và cũng có hàm lượng lipid tổng cao (3,9%) [7,9,10]. Kiểm tra thành phần glycolipid trong một số loại rong Nâu cho thấy hàm lượng monoglycosyldiacylglycerol (MGDG) thay đổi từ 26% đến 47%, hàm lượng diglycosyldiacylglycerol (DGDG) từ 20% đến 44% và hàm lượng sulphaquinovosylglycerol từ 18% đến 52% tổng số glycolipid. Hàm lượng glycolipid trong hai loài *Fucus* chiếm 14% chất béo hòa tan trong este [26, 27].

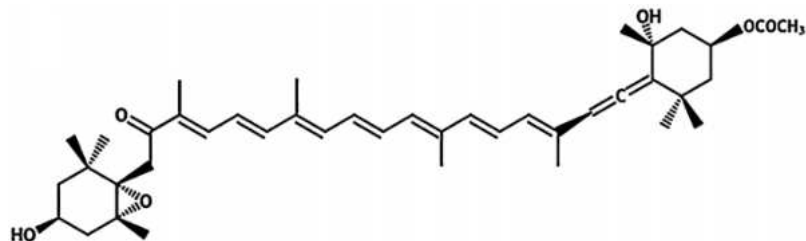
1.1.3.3. Sắc tố màu

Chlorophyll và carotenoid là các sắc tố màu được tìm thấy trong tất cả các loại rong biển. Chlorophyll a có mặt trong tất cả các loại rong biển; nhưng chlorophyll c chỉ có trong rong Nâu. Hàm lượng chlorophyll a là 565–2.000 mg/kg chất khô ở các loài rong Nâu [9].

Carotenoid là sắc tố phổ biến nhất trong tự nhiên và chúng có mặt trong tất cả các loại rong, thực vật bậc cao và nhiều vi khuẩn quang hợp. Các sắc tố chính của rong Nâu là β -caroten, violaxanthin và fucoxanthin, trong đó fucoxanthin chiếm ưu thế [8].

Màu Nâu của rong Nâu là kết quả của sự chiếm ưu thế của sắc tố fucoxanthin, sắc tố này che lấp các sắc tố khác như chlorophyll a và chlorophyll c, β -carotene và các xanthophyll khác. Fucoxanthin là một xanthophyll và có cấu trúc độc đáo, bao gồm một liên kết allenic bất thường và 5,6-monoepoxide trong phân tử của nó [28]. Fucoxanthin là một trong những carotenoid phong phú nhất trong tự nhiên. Hàm lượng trong rong biển thay đổi theo mùa và vòng đời. Ở dạng tinh

khuyết, fucoxanthin dễ bị oxy hóa. Tổng hàm lượng carotenoid của *F. serratus* được tìm thấy là khoảng 0,08% chất khô và fucoxanthin bao gồm khoảng 70% tổng số carotenoid. Hàm lượng fucoxanthin nằm trong khoảng từ 172-720 mg/kg trọng lượng khô ở các loài rong Nâu, với nồng độ tối đa ở *F. serratus* [9, 29].



Hình 1.5. Công thức cấu tạo của fucoxanthin

Fucoxanthin từ *Undaria* tươi chủ yếu được tìm thấy dưới dạng đồng phân hình học all-trans (~88%). Các dạng trans ổn định hơn; nhưng dạng cis của fucoxanthin được phát hiện có tác dụng ức chế cao hơn với tế bào ung thư bạch cầu (HL-60) và tế bào ung thư ruột kết (Caco-2). Sự hấp thu và kết hợp dạng trans của fucoxanthin vào lipid tế bào nhanh hơn so với dạng cis [30]. Fucoxanthin dễ dàng chuyển đổi thành fucoxanthinol trong tế bào ruột người và chuột [9].

Các thí nghiệm đã chỉ ra rằng fucoxanthin từ rong biển Nâu *Undaria* làm giảm đáng kể khả năng sống sót của các tế bào ung thư tuyến tiền liệt ở người, giảm tỷ lệ chuột mang khối u và số lượng khối u trung bình trên mỗi con chuột khi được cho vào nước uống [31, 32]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tác dụng chống ung thư, bao gồm ức chế sự tăng sinh của dòng tế bào ung thư bạch cầu ở người (HL-60) và gây ra quá trình chết theo chương trình của chúng [33, 34, 35].

Fucoxanthin tinh khiết ức chế sự tích tụ lipid tế bào chất trong 3T3-L1 có thể được gây ra bởi insulin, và theo cách phụ thuộc vào liều lượng làm giảm đáng kể sự biểu hiện của các gen chuyển hóa lipid trong các tế bào mỡ 3T3-L1. Có thể nhận thấy fucoxanthin có tác dụng ngăn ngừa béo phì một cách hiệu quả [33].

1.1.3.4. Phenolic

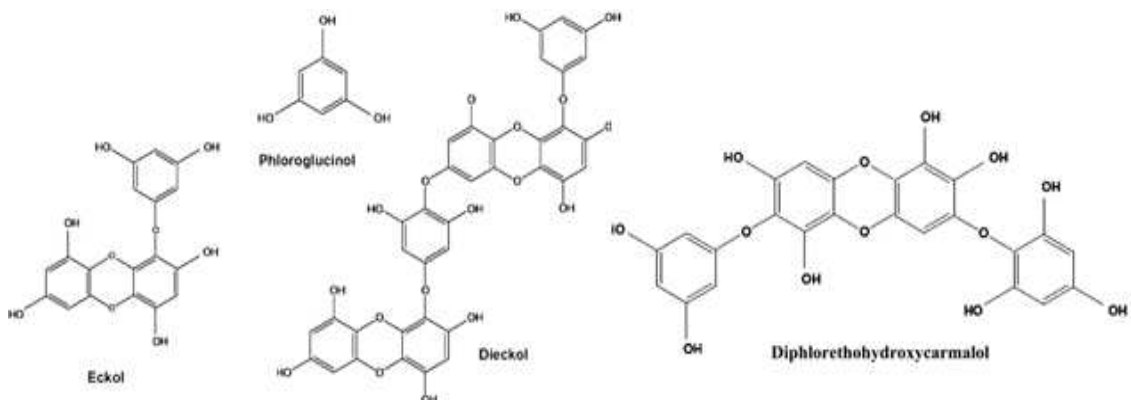
Phenolic có cấu tạo gồm nhóm hydroxyl (-OH) liên kết trực tiếp với nhóm hydrocarbon thơm. Phenolics đóng vai trò quan trọng đối với chức năng chống oxy hóa của rong biển. Hàm lượng và thành phần của phenolic trong rong biển thay đổi theo loài, theo mùa. Ví dụ, phenolic trong *Ascophyllum* ở mức tối thiểu (~9–10%

trọng lượng khô) trong thời kỳ quả rụng nhiều nhất (tháng 5) và đạt mức tối đa (~12–14%) trong “mùa đông” [9].

Trong rong Nâu, phlorotannin là nhóm các hợp chất phenolic chính. Phlorotannin là những thành phần cực kỳ ưa nước với nhiều kích thước phân tử từ 126 kDa đến 650 kDa [1]. Rong Nâu chứa nhiều loại phlorotannin khác nhau như fucoll, phlorethol, fucophlorethol, fuhalol, phlorotannin halogen hóa và sulfit hóa [36, 37].

Phlorotannin sở hữu một số đặc tính hoạt động sinh học, bao gồm ức chế antiplasmin, giải độc kim loại nặng, tác dụng kháng khuẩn, chống tia cực tím và hóa trị ngăn ngừa các yếu tố nguy cơ mạch máu. Cũng có báo cáo rằng phlorotannin đã kéo dài thời gian cảm ứng trong quá trình oxy hóa methyl α -linolenate [38 - 42]. Có thể nhận thấy phlorotannins là hợp chất chống oxy hóa tự nhiên trong rong Nâu, có khả năng chống lại sự thoái hóa do oxy hóa cũng như ngăn ngừa và/hoặc điều trị các bệnh liên quan đến gốc tự do.

Phlorotannin có có nhiều tác dụng như chống tiểu đường, chống oxy hóa, chống tăng sinh, chống HIV và bảo vệ da, chống phóng xạ và chống dị ứng. Các loài *Ecklonia* khác nhau cho thấy các đặc tính nêu trên do sự hiện diện của các hợp chất phlorotannin khác nhau như fucodiphlorethol G, phloroglucinol, eckol, dieckol và phlorofucofuroeckol A. Rong Nâu ăn được *Eisenia arborea* đã được sử dụng trong y học dân gian và cho thấy tác dụng chống dị ứng nhờ hợp chất phlorofucofuroeckol B. *Himanthalia elongate* cho thấy tác dụng chống vi khuẩn và chống oxy hóa cao, do sự hiện diện của phloroglucinol [1].



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

1.1.3.5. Một số thành phần khác

Mannitol là một loại rượu đường quan trọng hiện diện trong nhiều loài rong Nâu, đặc biệt là ở *Laminaria* và *Ecklonia*. Hàm lượng mannitol chiếm 5 – 30%

trong rong Nâu và có thể dao động theo mùa rộng, thay đổi theo môi trường. Mannitol được ứng dụng đa dạng trong dược phẩm, sản xuất kẹo cao su, trong công nghiệp sơn và vecni, sản xuất da và giấy, trong công nghiệp chất dẻo và sản xuất chất nổ [43].

Thành phần và hàm lượng protein của rong biển thay đổi theo loài, nhưng nhìn chung hàm lượng của rong Nâu là thấp (trung bình 5 – 15% trọng lượng khô) [9]. Hầu hết rong biển chứa tất cả các axit amin thiết yếu và là nguồn giàu axit amin có tính axit, axit aspartic và axit glutamic [44]. Protein rong Nâu cũng là một nguồn giàu threonine, valine, leucine, lysine, glycine và alanine, với các axit amin như cysteine, methionine, histidine, tryptophan và tyrosine được ghi nhận ở mức thấp hơn [45, 46].

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

1.2.1. Công nghệ truyền thống

Alginate được chiết xuất theo nhiều cách khác nhau tùy thuộc vào ứng dụng, nhưng quy trình được sử dụng phổ biến nhất là quy trình được mô tả bởi Calumpong và cs. (1999), dựa trên việc chiết xuất alginate dưới dạng natri alginate. Phương pháp này dựa trên việc chuyển đổi các alginate canxi và magie không hòa tan có trong thành tế bào rong Nâu thành các alginate natri hòa tan và sau đó được thu hồi dưới dạng axit alginic hoặc canxi alginate. Quá trình này được thực hiện bằng cách bổ sung tuần tự axit, rượu và natri cacbonat sau đó tách rắn/lỏng, kết tủa và làm khô [10, 47].

Chiết xuất alginate từ rong biển gồm nhiều giai đoạn. Rong biển tươi được rửa sạch, phơi khô và xay thành bột. Sau đó, sinh khối rong biển được ngâm trong nước để bù nước, trong đó các hóa chất khác nhau được thêm vào để loại bỏ các hợp chất không mong muốn trong rong biển. Sau đó, tiền xử lý bằng axit hoặc kiềm được áp dụng để phá vỡ thành tế bào thực vật, tiếp theo là quá trình chiết xuất natri cacbonat để thu được alginate hòa tan trong nước từ nền sinh khối rong biển. Có ba con đường kết tủa để thu hồi alginate từ dung dịch, đó là con đường natri alginate, con đường canxi alginate và con đường axit alginic, với sản phẩm cuối cùng thường được phân lập ở dạng natri alginate [48].

Theo Phạm Quốc Long và cs. (2009), có hai cách thu hồi alginate: Cách thứ nhất là thêm axit để tạo thành gel axit alginic không tan trong nước và tách nó dưới

dạng rắn ra khỏi nước. Sau đó bổ sung cồn vào axit alginic, tiếp theo là cacbonate natri để chuyển hóa axit alginic về alginate natri. Cách thứ 2 là thêm vào dung dịch chiết ban đầu một muối canxi, tạo thành gel alginate canxi với một kết cấu dạng sợi, không hòa tan trong nước và có thể tách ra khỏi chúng. Sau đó thêm axit vào để chuyển hóa thành alginic axit. Axit alginic dạng sợi này được tách ra rất dễ và đặt vào trong một máy trộn hình cầu với cồn và natri cacbonat được đưa từ từ vào bột nhão cho đến khi tất cả axit alginic được chuyển hóa về alginate natri, bột alginate natri đôi khi còn được ép thành những viên nhỏ sau đó sấy và nghiền mịn [49].

Bảng 1.1. Một số quy trình chiết alginate thông thường [10, 48]

Loài rong	Quy trình chiết	Hiệu suất
<i>Sargassum natans</i> , <i>Sargassum vulgare</i> , <i>Padina gymnospora</i> , <i>Padina antillarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Ngâm rong qua đêm trong formaldehyde 2% (w/w) - Rửa rong bằng nước và thêm HCl 0,2M (để qua đêm) - Rửa và thêm Na₂CO₃ 2% ở 99°C trong 3 giờ - Lọc và kết tủa natri alginate trong isopropanol 80% 	Từ 16±0,7% dw đối với <i>P. gymnospora</i> đến 29±4,2% dw đối với <i>L. digitata</i>
<i>Ecklonia radiata</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Kích thước rong 0,25–1,4 mm - Ngâm trong Etanol, 3 giờ, (tỉ lệ rong/cồn = 1:10 w/v) - Bổ sung HCl để pH=1-6,5, nhiệt độ 25-55°C, trong thời gian 1-120 phút - Rửa chất rắn, chiết bằng Na₂CO₃ 0,2 M, 45°C, 2 giờ (tỉ lệ 1:20 w/v) - Kết tủa bằng etanol, tỉ lệ 2/1 - Sấy kết tủa ở 60°C 	Hiệu suất 32,2–45,4%, trọng lượng phân tử = 373–986 kDa
<i>Sargassum turbinarioides</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Ngâm rong khô trong formaldehyde 2% (24 giờ, nhiệt độ phòng) - Rửa chất rắn bằng nước và thêm HCl 0,2M (24 giờ) - Rửa chất rắn và chiết bằng Na₂CO₃ 2% (3 giờ, 100°C) - Thu thập phần hòa tan bằng cách ly tâm - Kết tủa alginate bằng etanol 95% (tỉ lệ 1:3) và rửa bằng axeton 	10% dw
<i>Ascophyllum nodosum</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Ngâm bột rong (kích thước 0,25 mm) trong CaCl₂ 1%, 18 giờ (tỉ lệ 1:15 w/v) 	Hiệu suất = 18,3–23,7%, tỉ lệ M/G=

	<ul style="list-style-type: none"> - Sau đó, bổ sung vào phần chất rắn HCl 5%, 1 giờ (tỉ lệ 1:15 w/v) - Chiết phần chất rắn thu được bằng Na₂CO₃ 3% (w/v) trong 1 giờ (tỉ lệ 1:15 w/v) - Thu phần hoà tan, kết tủa bằng etanol (tỉ lệ 1:1 v/v) - Sấy ở 50°C 	0,91–1,33
<i>Sargassum duplicatum</i> , <i>Sargassum crassifolium</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Rửa sạch và ngâm các mảnh lá rong trong nước cho đến khi chúng nở ra rồi ngâm trong HCl 0,3% trong 1 giờ - Chiết xuất: các mảnh rong được rửa sạch bằng nước cất và ngâm trong Na₂CO₃ 4% (w/w) có khuấy ít nhất 2 giờ - Tách phần nổi phía trên khỏi dung dịch bằng cách axit hoá dùng HCl 10% và rửa axit alginic bằng nước và làm khô - Thêm NaOH 10% để sản xuất natri alginate 	-
<i>Nizimuddinia zanardini</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Bột rong khô được ngâm trong) formaldehyde 2%, 24 giờ (tỉ lệ 1:32 w/v) - Thêm HCl 0,2 M vào chất rắn (tỉ lệ 1:32 w/v), 60°C, 3 giờ. - Thu phần chất rắn, chiết bằng Na₂CO₃ 3% (w/w), 60°C, 2,5 giờ (tỉ lệ 1:32 g/l) - Kết tủa bằng cồn 96% (V=3 lần) - Đông khô kết tủa thu được 	Hiệu suất 27%, Mw=103–119 kDa, tỉ lệ M/G= 1,22
<i>Sargassum</i> sp. <i>Turbinaria</i> sp. <i>Hormophysa</i> sp.	<ul style="list-style-type: none"> - Hoà bột rong biển vào nước cất và thêm HCl 0,1M, khuấy mạnh để có được pH=3 (24 giờ, ở nhiệt độ phòng) - Rửa sinh khối bằng nước cất. - Thêm Na₂CO₃ 1M và EDTA, pH là 11 (80°C, 2 giờ) - Axit hóa bằng HCl 6N (pH =3), thu kết tủa bằng ly tâm và huyền phù trong nước cất - Bổ sung NaOH 1M (pH 10) – kết tủa natri alginate với etanol khi có mặt NaCl và rửa bằng hỗn hợp etanol/nước 	31%dw – <i>Sargassum</i> sp. 31% dw– <i>Turbinaria</i> sp. 30% dw– <i>Hormophysa</i> sp. Khi không có EDTA, năng suất alginate thấp hơn (10-13%) liên quan đến sự hiện diện của phức hợp canxi trong vách tế bào
<i>Sargassum latifolium</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Rong biển kích thước 1–5 mm, hoà vào CaCl₂ 0,54%, 30 phút, rồi ngâm NaCl 0,5%, 1 giờ, 100°C (tỉ lệ 1:15 w/v) 	Hiệu suất 17,54%

	<ul style="list-style-type: none"> - Chiết bằng Na₂CO₃ 5% trong 30 phút ở 100°C (1:5 w/v) - Kết tủa bằng 80% Etanol - Sấy ở 50°C 	
<i>Laminiaria digitata</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Rong biển có kích thước 5 mm²–5 cm², ngâm trong formaldehyde 2% (w/v), 4 tháng - Bổ sung H₂SO₄ 0,5 M qua đêm ở 4°C - Chiết bằng Na₂CO₃ 4% (w/w) ở 20°C - Kết tủa bằng H₂SO₄ pH=2 - Sấy ở 30°C 	<ul style="list-style-type: none"> - Hiệu suất 33–39%, Mw = 105 kDa

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

Chew và cs. (2008) đã xác định hàm lượng các hợp chất phenolic trong chiết xuất metanol (MeOH) và trong hỗn hợp metanol-nước (20% và 50%) của *Padina antillarum* [50]. Hàm lượng cao nhất thu được trong MeOH 50% trong khi hàm lượng thấp hơn 2 lần thu được trong chiết xuất metanol nguyên chất (100%). López và cs. (2011) đã báo cáo kết quả hoàn toàn trái ngược đối với chiết xuất từ *Halopteris scoparia*, trong đó sản lượng phenolics cao nhất được phát hiện trong chiết xuất MeOH và thấp nhất trong hỗn hợp MeOH-nước 50% [51]. Otero và cs. (2019) cũng báo cáo hàm lượng phenolic cao hơn (hơn 2 lần) trong hỗn hợp etanol-nước (50%) so với chỉ trong etanol [52], tương tự như kết quả nghiên cứu của Machu và cs. (2015) trong chiết xuất MeOH 80% của *Undaria pinnatifida*, trong đó hàm lượng thậm chí cao gấp 4,5 lần so với chiết xuất MeOH nguyên chất [53]. Mặt khác, Del Pilar Sánchez-Camargo và cs. (2016) đã nghiên cứu dịch chiết *Sargassum muticum* trong nước, etanol (EtOH) và EtOH 50% theo cùng một quy trình ở nhiệt độ khác nhau, hàm lượng phenolic cao nhất được với dịch chiết EtOH, thấp nhất trong dịch chiết nước [54].

Nghiên cứu của Airanthe và cs. (2011) xác định hàm lượng phenolic của loài rong *Eisenia bicyclis*, *Kjellmaniella crassifolia* và *Alaria crassifolia* bằng cách sử dụng dung môi khác nhau trên 100 g rong biển khô cho thấy hàm lượng phenolics cao nhất với dung môi metanol (từ 72 đến 87 mg PCE/100 g) [55]. Kết quả này cho thấy mối tương quan với đặc tính chống oxy hóa đã thử nghiệm.

Bảng 1.2. Chiết phenolic từ rong Nâu theo phương pháp thông thường [56, 57]

Loài rong	Điều kiện chiết	Hàm lượng phenolic tổng
<i>Alaria crassifolia</i>	Rong/metanol = 1:10; 24 giờ, nhiệt độ phòng	86.82 mg PCE/100g DW
<i>Eisenia bicyclis</i>	Điều kiện 1: rong/nước=1:100; lắc 10 min ở 80 °C Điều kiện 2: rong/hỗn hợp 30% metanol-1% acetic axit là 1:100; lắc 50 phút ở 70°C Điều kiện 3: : rong/ metanol 80% là 1: 100; lắc 1 h ở 70°C) Điều kiện 4: rong/acetone 70% là 1:100; lắc 30 phút ở 30°C Điều kiện 5: rong/ metanol là 1: 100; lắc 24 giờ ở 23°C)	Điều kiện 1: 19,260 mg GAE/100 g DW Điều kiện 2: 19,280 mg GAE/100 g DW Điều kiện 3: 14,320 mg GAE/100 g DW Điều kiện 4: 8410 mg GAE/100 g DW Điều kiện 5: 950 mg GAE/100 g DW
<i>Cystoseira sedoides</i>	Rong/etanol 50% là 1:5; 30 phút ở 50°C	2645 mg PGE/100 g DW
<i>Fucus vesiculosus</i>	Rong/ axeton 70% là 1:20; 1 giờ với 400 vòng / phút	110.28–144.51 mg PGE/100 g DW
<i>Nizimuddiniana zanardinii</i>	Rong/Methano là 1:4 l; 2 giờ, nhiệt độ phòng	675 mg PGE/100 g DW
<i>Saccharina latissima</i>	Điều kiện 1: rong: nước khử ion là 1: 20; 24 giờ, nhiệt độ phòng Điều kiện 2: rong: nước khử ion là 1: 20; 30 phút ở 90°C Điều kiện 3: rong: etanol 80% là 1: 20; 24 giờ, nhiệt độ phòng Điều kiện 4: rong: acetone 70% là 1: 20; 24 giờ, nhiệt độ phòng	Điều kiện 1: 470 mg GAE/100 g DW Điều kiện 2: 780 mg GAE/100 g DW Điều kiện 3: 190 mg GAE/100 g DW Điều kiện 4: 520 mg GAE/100 g DW
<i>Padina pavonica</i>	Rong/EtOH 50% là 1:5, lắc 30 phút, 50°C	7.06 mg PGE/g dw
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Điều kiện 1: rong:nước là 1:20, lắc 24 giờ, nhiệt độ phòng Điều kiện 2: rong:acetone70% là 1:20, lắc 24 giờ, nhiệt độ phòng	Điều kiện 1: 138 mg PGE/g Điều kiện 2: 159 mg PGE/g

Các kỹ thuật chiết xuất fucoidan truyền thống (sử dụng nước nóng, dung dịch axit loãng hoặc dung môi hữu cơ) dựa trên khả năng hòa tan của polysaccharit thành tế bào trong các điều kiện khác nhau. Việc chiết xuất fucoidan thường được thực hiện bằng cách xử lý nguyên liệu rong bằng nước nóng hoặc dung dịch axit (HCl) ở nhiệt độ từ 70 – 100°C, qua nhiều bước và trong vài giờ. CaCl₂ có thể được thêm vào hỗn hợp để ngăn chặn sự giải phóng alginate. Chiết xuất thu được sau đó được phân tách thông qua quá trình kết tủa trong dung môi hữu cơ như etanol [58].

Chiết thường với nước nóng (80 – 100°C) được sử dụng để chiết xuất polysaccharide sunfat hòa tan trong nước từ loài *Sargassum henslowianum* và *Dictyopteris divaricate*. Tuy nhiên, phương pháp này không đủ chọn lọc vì tất cả các loại polysaccharide (fucoidan, alginate và laminarin) và các hợp chất hòa tan trong nước khác từ mẫu rong biển cũng có thể được chiết xuất. Do đó, cần có nhiều bước phân lập hơn để tăng độ tinh khiết của phân đoạn với polysaccharit đích. Hơn nữa, để cải thiện năng suất chiết xuất, việc sử dụng dung dịch HCl 0,1 M đã được chứng minh là có hiệu quả vì nó cho phép thủy phân thành tế bào và tạo điều kiện chiết xuất fucoidan và laminarin từ nền. Ngoài ra, axit chuyển đổi alginate thành axit alginic-không tan trong nước và này được loại bỏ cùng với cặn rong biển rắn, tạo ra phần fucoidan tương đối tinh khiết [59].

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

January và cs. (2019) đã sử dụng cả ba dung môi (muối CaCl₂, axit và nước) để chiết xuất fucoidan từ *Ecklonia maxima*, *Laminaria pallida* và *Splachnidium rugosum*. Kết quả cho thấy rằng chiết bằng nước nóng thông thường (HWE) dẫn đến nồng độ L-fucose cao nhất trong khi chiết bằng axit dẫn đến hàm lượng sunfat và axit uronic cao nhất [60]. Ngược lại, trong khi nghiên cứu chiết xuất fucoidan từ *Sargassum fusiforme*, Liu và cs. (2019) đã đạt được hàm lượng sunfat và axit uronic thấp nhất bằng cách sử dụng axit làm dung môi [61]. Hơn nữa, kết quả này

đã đạt được hiệu suất fucoidan cao nhất với dung môi là axit (11,24%) và thấp nhất với phương pháp CaCl_2 (3,94%). Khối lượng phân tử (MW) của fucoidan được chiết bằng axit thấp hơn đáng kể, trong khi chiết bằng axit và muối đã loại bỏ gần như tất cả protein cho thấy độ tinh khiết cao hơn của chiết xuất thu được. Các hoạt động thu dọn gốc tự do và DPPH cao hơn nhiều đối với fucoidan chiết xuất bằng nước và muối so với fucoidan chiết bằng axit, điều này có sự tương quan thuận với hàm lượng axit uronic, MW và thành phần monosacarit (glucose + galactose).

Bảng 1.3. Một số quy trình chiết fucoidan truyền thống [59]

Loài rong	Quy trình, thông số	Hiệu suất
<i>S. henslowianum</i>	- Tiền xử lý: EtOH 95%; 2 × 12 giờ - Chiết: H_2O ; 3 × 2 giờ; gia nhiệt hồi lưu - Tinh sạch: Kết tủa bằng EtOH; lọc màng (12 kDa)	5,1%
<i>S. fusiforme</i>	- Tiền xử lý: EtOH 95%; 24 giờ; 30°C - Chiết theo 3 phương pháp: + H_2O ; 3 giờ; 80°C + HCl 0.1M; 6 giờ; 25°C + CaCl_2 2%; 3 giờ; 50°C - Tinh sạch: Kết tủa bằng EtOH, lọc màng (3,5 kDa)	3,94–11,24%
<i>E. maxima</i> <i>L. pallida</i> <i>S. rugosum</i>	Chiết theo 3 cách: - Cách 1: H_2O ; 24 giờ; 70 °C - Cách 2: HCl 0,15M; 2 giờ; 65 °C. Sau đó kết tủa bằng EtOH - Cách 3: + Tiền xử lý bằng metanol-chloroform- H_2O (4:2:1); qua đêm; nhiệt độ phòng + Chiết bằng CaCl_2 2%; 5 giờ; 85°C + Tinh sạch bằng CTAB 10%	
<i>Fucus serratus</i> <i>F. vesiculosus</i> <i>A. nodosum</i>	- Tiền xử lý: EtOH 85%; qua đêm, nhiệt độ phòng - Chiết: + HCl 0,1M; 4 giờ; 80 °C + CaCl_2 1%; qua đêm; 4 °C - Kết tủa bằng cồn	F. serratus: 4,2–7,5% F. vesiculosus: 8,1–12,2% A. nodosum: 6,5–8,9%
<i>Cystoseira crinite</i> <i>C. compressa</i> <i>C. sedoides</i>	- Tiền xử lý: metanol-dichloromethane (1:1); 3 × 48 giờ; nhiệt độ phòng - Chiết: CaCl_2 2%; 3 × 3 giờ - Tinh sạch bằng lọc màng (30 kDa)	2,8–3,7%

Rong biển tươi được ưu tiên sử dụng để chiết xuất fucoxanthin thay vì sử dụng rong khô. Các bước tiền xử lý được sử dụng để cải thiện hiệu quả chiết xuất fucoxanthin từ rong biển. Các phương pháp xử lý nhiệt có chức năng hỗ trợ giải phóng fucoxanthin khỏi các liên kết protein, vô hiệu hóa các enzyme oxidase nội sinh (như peroxidase và polyphenol oxidase) làm phân hủy fucoxanthin, thay đổi cấu trúc của thành tế bào rong biển, thúc đẩy tính thấm của nó và nâng cao tốc độ khuếch tán của dung môi. Chần ấm (40°C) và nóng (60 – 100°C) trong 10 – 20 phút đã chứng minh khả năng nâng cao hiệu quả chiết xuất fucoxanthin từ *Laminaria sp.*, *Sargassum fusiforme*, *Sargassum ilicifolium* và *U. pinnatifida* [62 - 64]. Sau khi xử lý, rong biển được tiến hành chiết fucoxanthin bằng nhiều phương pháp khác nhau.

Chiết xuất dung môi thông thường được sử dụng phổ biến để chiết xuất fucoxanthin từ rong biển do đơn giản, không tốn kém. Dung môi hữu cơ thường được sử dụng là acetone, chloroform, etanol, metanol và ethyl acetate hoặc kết hợp các dung môi này [65]. Dung môi khuếch tán qua thành và màng tế bào, sau đó hòa tan các phân tử fucoxanthin nội bào. Cấu trúc hóa học, hằng số điện môi và chỉ số phân cực của dung môi hữu cơ là những thông số chính ảnh hưởng đến khả năng hòa tan của các thành phần [66].

Các kỹ thuật chiết dung môi thông thường gồm ngâm chiết (ngâm nóng và lạnh), chiết ngược dòng và chiết Soxhlet. Kỹ thuật ngâm chiết là chiết xuất rắn/lỏng được nghiên cứu với các thông số khác nhau như tỷ lệ nguyên liệu:dung môi, phần trăm dung môi, thời gian, nhiệt độ... Tỷ lệ nguyên liệu: dung môi được nghiên cứu trong phạm vi rộng từ 1:10 đến 1:500 để tối ưu hóa quy trình chiết xuất. Nhiệt độ được kiểm soát đã thử nghiệm cho ngâm chiết nằm trong khoảng từ 4°C đến 65°C hoặc trong bể nước đá hoặc ở nhiệt độ phòng, trong khi thời gian đánh giá nằm trong khoảng từ 15 phút đến 96 giờ. Việc lựa chọn dung môi để chiết fucoxanthin sẽ quyết định hiệu quả của quá trình chiết [67]. Trong nghiên cứu chiết xuất fucoxanthin từ *S. siliquosum* và *S. polycystum*, dung môi tốt nhất là MeOH. Trong nghiên cứu này, các điều kiện tốt nhất đạt được ở 30 phút và nhiệt độ 45°C với tỷ lệ dung môi/chất rắn là 5 mL/g. Hàm lượng fucoxanthin thu được đối với *S. siliquosum* và *S. polycystum* lần lượt là 491,47 và 449,90 µg/g trọng lượng khô (DW) khi sử dụng EtOH và 706,98 và 521,34 µg/g DW đối với MeOH [68]. Kỹ thuật chiết Soxhlet với ứng dụng nhiệt cung cấp giải pháp thay thế cho ngâm chiết

với mức tiêu thụ dung môi thấp hơn vì nó cho phép tái tuần hoàn. Nghiên cứu gần đây cho thấy hiệu suất chiết đối với rong *Saccharina japonica* là 0,45 mg/g, sử dụng n-hexane làm dung môi ở 40 °C trong 16 giờ [69]. Một nghiên cứu khác với *Undaria pinnatifida* cho thấy điều kiện tốt nhất chiết Soxhlet là 12 giờ ở 78°C với EtOH cho hiệu suất 50 µg/g [70].

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

1.2.2. Công nghệ hiện đại

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

Đây là kỹ thuật chiết xuất với yêu cầu lượng dung môi thấp, thân thiện với môi trường, xử lý dễ dàng và tốc độ chiết xuất nhanh. Nó có thể được sử dụng kết hợp với các kỹ thuật chiết xuất không thông thường khác. Hiệu quả của phương pháp này dựa trên nhiều yếu tố khác nhau như nhiệt độ, thời gian chiết xuất, công suất siêu âm,... Youssouf và cs. (2017) đã nghiên cứu chiết xuất alginate từ *Sargassum binderi* và *Turbinaria ornate* với việc bổ sung xử lý siêu âm ở pH, tỷ lệ nạp chất rắn và thời gian chiết xuất khác nhau [71]. Ở điều kiện tối ưu (pH = 12, sử dụng Na₂CO₃, tỷ lệ rong/nước=10g/L, với siêu âm ở 25kHz, 150W trong 40 phút), hiệu suất chiết xuất alginate đạt 54,06%. Có thể thấy, thời gian chiết xuất alginate đã giảm đáng kể – từ khoảng 2 giờ đối với phương pháp thông thường xuống còn 15–30 phút với sự hỗ trợ của siêu âm.

UAE được sử dụng rộng rãi trong chiết xuất polyphenol do tiêu thụ năng lượng và dung môi thấp. UAE thực hiện tốt việc chiết xuất polyphenol từ các loại thực vật khác nhau cũng như phlorotannins từ rong nâu. Thiết bị của UAE có thể là bể siêu âm (siêu âm gián tiếp) hoặc đầu dò siêu âm (siêu âm trực tiếp). Theo V. Ummat và cs. (2020), so với chiết dung môi truyền thống, các điều kiện UAE được tối ưu hóa (35 kHz, 30 phút và 50% etanol) có thể tăng năng suất chiết xuất của tất cả các loại rong biển được nghiên cứu từ 1,5 lần lên 2,2 lần [72]. Kadam cs. (2015) báo cáo sản lượng phenolic cao hơn trong chiết xuất *Ascophyllum nodosium* và *Laminaria hyperborea* thu được từ UAE so với chiết xuất thông thường [73].

Tuy nhiên, có báo cáo rằng UAE sẽ làm cho một số chất phenolic bị phân hủy trong quá trình chiết xuất và tạo ra các gốc hydroxyl hoạt tính cao trong bong bóng. Mặc dù các gốc tự do tạo ra trong bong bóng tạo bọt trong quá trình UAE, nhưng điều kiện vận hành nhẹ nhàng thường được sử dụng ở UAE sẽ đảm bảo không có thay đổi lớn được tạo ra đối với cấu trúc, chức năng của phần lớn hoạt chất sinh học được chiết xuất. Tại UAE, hiện tượng xâm thực, nhiệt và cơ học có tác động đáng kể đến quá trình chiết. Hơn nữa, việc sử dụng UAE với quy mô công nghiệp là phù hợp do sự tiện lợi của phương pháp chiết xuất này [59].

UAE có thể kết hợp với các công nghệ phi truyền thống khác như xử lý enzym hoặc MAE [59]. Quá trình chiết xuất fucoidan bằng siêu âm từ nguyên liệu thô được thực hiện dưới ảnh hưởng của siêu âm tần số thấp với thời gian ngắn, có thể trong môi trường axit hóa. Ngoài ra, nước và cồn cũng có thể được sử dụng làm môi trường xử lý. Sự xâm thực âm thanh ở UAE tạo ra các lực vật lý như lực cắt, sóng xung kích, tia cực nhỏ và dòng âm thanh, gây ra sự phá vỡ thành tế bào, giảm kích thước hạt và tiếp xúc tốt hơn giữa dung môi và hợp chất mục tiêu. Hơn nữa, siêu âm gây ra sự hình thành và sụp đổ nhanh chóng của bong bóng tạo bọt trong môi trường chất lỏng được xử lý, dẫn đến ứng suất mạnh và sự phân tách chuỗi không thể đảo ngược [59,74].

Wan và cs. (2015) đã áp dụng thiết kế Box–Behnken (BBD) kết hợp với RSM để tối ưu hóa chiết xuất siêu âm cho polysaccharit từ *L. japonica*. Các điều kiện tối ưu hóa thu được là thời gian chiết ở 54 phút, công suất siêu âm ở 1050W, nhiệt độ chiết ở 80°C, tỷ lệ nguyên liệu : dung môi là 1:50 (g/ml). So với chiết truyền thống sử dụng nước nóng, chiết siêu âm có thời gian ngắn hơn, hiệu quả hơn [75].

Xử lý *Sargassum muticum* trong nước bằng sóng siêu âm ở tần số 40 kHz, với công suất 150 W trong 5–30 phút ở 25°C dẫn đến việc sản xuất fucoidan với năng suất cao ($147,6 \pm 8,0$ g/kg nguyên liệu thô) [76]. Về đặc điểm cấu trúc, fucoidan được phân lập bằng siêu âm có hàm lượng fucose thấp hơn [77]. Fucoidan thu được bằng cách chiết siêu âm từ *Nizamuddiniana zanardinii* spp. ở tỷ lệ nước/nguyên liệu thô là 80:1 (công suất 196 W, nhiệt độ chiết xuất 70°C trong 58 phút) ức chế hiệu quả sự phát triển của tế bào ung thư HeLa (62,36%) và HepG2 (56,83%) [78].

Trong nghiên cứu của Okolie và cộng sự (2019) chiết siêu âm ở tần số 20 kHz trong 35 phút với môi trường nước chứa HCl 0,01 M, sau đó là xử lý dịch chiết

với 2% (w/v) CaCl₂ và 4 lần thể tích etanol 95% [79]. Fucoidan thu được từ *Ascophyllum nodosum* spp. cho thấy một hoạt động prebiotic cao tương tự như inulin prebiotic tiêu chuẩn. Việc bổ sung chiết xuất fucoidan vào canh thang MRS (de Man, Rogosa và Sharpe), nồng độ cuối cùng là 0,1 và 0,5% đã cải thiện sự phát triển của *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* [79]. Khi sử dụng cồn làm dung môi chiết siêu âm, hiệu suất thu fucoidan tăng 16,8% so với sử dụng nước nóng. Bằng cách này, fucoidan thu được từ *Sargassum mcclurei* với tỷ lệ dung môi/rong là 24:1, thời gian chiết xuất là 49 phút ở 54°C, với công suất siêu âm là 360 W [80].

Tiếp xúc với siêu âm cũng được biết là dẫn đến sự gia tăng hoạt động của enzyme khi được kết hợp cùng nhau. Phương pháp chiết siêu âm - enzyme cho phép thu được polysacarit có trọng lượng phân tử thấp hơn, sản lượng fucoidan cao hơn so với phương pháp siêu âm (từ 3,6% đến 7,87%) [81]. Trọng lượng phân tử trung bình của fucoidan phân lập bằng phương pháp siêu âm là 1020,85 kDa và siêu âm-enzyme là 443,70 kDa [81].

Chiết siêu âm có thể được kết hợp với các tác động cơ học khác ngoài các tác nhân hóa học. Ví dụ, kết hợp giữa sóng siêu âm (200W, 20kHz, 55°C) và vi sóng (700W, 90°C) dẫn đến sự gia tăng hàm lượng fucoidan sulfat lên 27,16% [82].

UAE được sử dụng phổ biến để chiết xuất các loại caroten và các hoạt tính sinh học có giá trị cao (ví dụ: lutein, astaxanthin, canthaxanthin, b-caroten, axit docosahexaenoic, axit eicosapentaenoic) từ nguyên liệu phức hợp [70]. UAE cũng được dùng để chiết xuất fucoxanthin từ *Padina tetrastrum*. Điều kiện tối ưu hóa đối với nồng độ dung môi, nhiệt độ và thời gian lần lượt là EtOH 80%, 50°C và 30 phút. Tại điều kiện này thu được 750 µg/g DW fucoxanthin, cao hơn so với hàm lượng fucoxanthin thu được bằng phương pháp chiết xuất thông thường [83].

Eom và các cộng sự đã thực hiện chiết xuất bào tử ở quy mô pilot (20L, tối đa 60L), bao gồm polysacarit và fucoxanthin từ *U. pinnatifida* bằng cách sử dụng UAE tuần hoàn và so sánh hiệu suất với chiết xuất axit thông thường và UAE ở quy mô phòng thí nghiệm (1L) [84]. UAE ở quy mô pilot được thực hiện với nước làm dung môi trong các điều kiện 960W, biên độ 80%, 20kHz, 30°C và 3 giờ, trong khi UAE ở quy mô phòng thí nghiệm được thực hiện với HCl 0,1M làm dung môi ở các điều kiện 800W, biên độ 80%, xung 20 giây bật/20 giây tắt, 25°C và 6 giờ. Đối với

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

1.2.2.2. Chiết xuất có hỗ trợ enzyme (EAE)

Chiết xuất polysacarit bằng phương pháp EAE ngày càng được chú ý do đặc điểm thân thiện với môi trường, không độc hại và nhanh chóng. Enzyme có phản ứng đặc hiệu với một chất nền cụ thể hoặc một nhóm chất nền và giúp giữ cho các chất mục tiêu không bị ảnh hưởng trong gian bào sinh khối. Cellulase và protease (ví dụ: Alcalase) được sử dụng phổ biến để chiết xuất alginate (cũng như polysacarit khác) từ rong Nâu, tương ứng nhắm vào cellulose và protein. Borazjani và cs. (2017) đã thực hiện chiết alginate từ *Sargassum angustifolium* với sự hỗ trợ của enzyme [85]. Borazjani kết luận rằng phương pháp tiền xử lý bằng enzym alcalase (5% w/w, pH = 8, 50°C, 24 giờ) hoặc cellulase (5% w/w, pH = 4,5, 50°C, 24 giờ) làm giảm đáng kể hàm lượng protein và polyphenol trong sản phẩm alginate so với phương pháp tiền xử lý bằng axit loãng (HCl 0,1 M, pH = 2, 65°C, 3 giờ, 3 lần). Tuy nhiên, trọng lượng phân tử của alginate thu được từ quy trình có sự hỗ trợ của enzyme đã giảm từ 557 kDa xuống 356 kDa. Gần đây, Okolie và cs. (2020) đã so sánh UAE, MAE và EAE với quy trình chiết xuất alginate thông thường từ *Ascophyllum nodosum*. Chiết xuất với sự hỗ trợ của enzyme cho năng suất cao nhất, nhưng không có khác biệt đáng kể về tỷ lệ M/G của sản phẩm [86]. Nhìn chung, do chi phí cao của enzyme, lợi ích của EAE không hứa hẹn đối với việc sản xuất alginate, mặc dù quy trình EAE có thể được tối ưu hóa hơn nữa.

Enzyme có thể được sử dụng để thúc đẩy quá trình phá vỡ thành tế bào và quá trình chiết xuất sử dụng enzyme là một kỹ thuật thuận lợi do tính chọn lọc đối với các hợp chất mục tiêu, điều này rất quan trọng đối với các chất bị phân huỷ và không ổn

định. So với các phương pháp thông thường, EAE có thể thu được các chất có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn [87]. EAE có khả năng chiết xuất hiệu quả hoạt chất sinh học, đây là phương pháp “xanh”, không độc hại, có thể sử dụng để sản xuất thực phẩm quy mô lớn (sử dụng enzyme cấp thực phẩm) [56]. Chiết xuất từ rong Nâu *Ecklonia cava* thu được sản lượng polyphenol là 20% với enzyme Celluclast (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Đan Mạch) [88]. Khi so sánh các enzyme được thử nghiệm trong tài liệu khoa học, viscozyme và alcalase là hiệu quả nhất để chiết xuất lượng polyphenol cao từ các loài rong Nâu theo các quy trình EAE [56, 89, 90]. Ngoài ra, sự hiệp đồng chiết xuất của hai enzyme cũng đã được quan tâm trong một số nghiên cứu và có thể được nghiên cứu nhiều hơn trong tương lai [56, 91].

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

Kết quả được chứng minh bởi Alboofetileh và cs. (2018) cho thấy Alcalase phá vỡ thành tế bào tốt hơn [92]. Do đó, hiệu quả chiết xuất fucodian cao hơn (5,58%) thu được với sự hỗ trợ của enzyme so với chiết nước nóng thông thường (5,2%). Sản lượng thu fucoidan bằng cách sử dụng Celluclast (4,8%) và Viscozyme (4,28%) thấp hơn so với chiết thường. Nguyên nhân có thể do các polysaccharit bị thủy phân một phần sau thời gian chiết xuất kéo dài (24 giờ) với sự có mặt của các enzyme [92].

Nghiên cứu của Hammed và cs. (2017) cho thấy thời gian thủy phân, giai đoạn chiết xuất và nồng độ enzyme có tác động đáng kể đến sản lượng polysaccharit sunfat [93]. Theo đó, hiệu suất fucoidan cao nhất (25,13%) trong điều kiện tối ưu với thời gian thủy phân là 19,5 giờ, 2 giai đoạn chiết xuất và nồng độ enzyme là 1,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Oh và cs. (2020) đã nghiên cứu fucoidan thu được từ bào tử *U. pinnatifida* chiết có sử dụng enzyme Celluclast. Fucoidan thu được chứa 30,4% sulfat và 52,3% fucose. Fucoidan giàu sulfat thu được từ quy trình thân thiện với môi trường, có thể được sử dụng như một tác nhân chống oxy hóa có lợi trong sản xuất thực phẩm chức năng [94].

Nguyen Thi Thuan và cs. (2020) đã so sánh fucoidan chiết bằng axit HCl 0,1M và chiết có sự hỗ trợ enzyme của *Fucus evanescens* và *Saccharina latissima*. Quy trình EAE này sử dụng kết hợp một bước chế phẩm cellulase thương mại (CellicfiCTec2) và lyase alginate từ *Sphingomonas* sp. (SALy), phản ứng ở pH = 6, 40°C, loại bỏ các polysaccharit không phải fucoidan bằng kết tủa Ca^{2+} và kết tủa etanol của fucoidan thô. Fucoidan thô thu được từ EAE chứa alginate có trọng lượng phân tử thấp với một lượng đáng kể. Tuy nhiên, alginate còn lại này đã được loại bỏ hiệu quả bằng sắc ký trao đổi ion bổ sung để tạo ra fucoidan tinh khiết. Sản lượng fucoidan thu được bằng EAE tương đương hoặc cao hơn một chút so với chiết xuất hóa học đối với cả *F. evanescens* và *S. latissima*, nhưng kích thước phân tử của fucoidan lớn hơn đáng kể với quá trình EAE. Sự phân bố trọng lượng phân tử của các phần fucoidan là 400 đến 800 kDa đối với *F. evanescens* và 300 đến 800 kDa đối với *S. latissima*, trong khi trọng lượng phân tử của fucoidan được chiết xuất hóa học tương ứng từ các loại rong biển này là 10–100 kDa và 50–100 kDa [95].

Đây là kỹ thuật chiết xuất ít độc hại, an toàn với môi trường, được áp dụng để chiết xuất fucoxanthin từ rong với các bước tiền xử lý bằng enzyme và chiết xuất có sự hỗ trợ của enzyme (EAE). So với kỹ thuật chiết xuất khác, EAE không phụ thuộc vào thiết bị sử dụng nhiều năng lượng, có thể áp dụng ở quy mô lớn, không có chất thải độc hại [62, 67, 70].

Một nghiên cứu với *Fucus vesiculosus* cho thấy rằng bằng cách sử dụng enzyme Viscozyme, điều kiện tốt nhất là tỷ lệ enzyme/nước là 0,52%, tỷ lệ rong biển/nước là 5,37% và thời gian ủ enzyme là 3 giờ. Những điều kiện này cho phép thu được 0,657mg fucoxanthin/g DW [96]. Chiết xuất fucoxanthin từ *U. pinnatifida*

bằng cách sử dụng tiền xử lý bằng enzym và sau đó là dimetyl ete (DME)+EtOH cho phép hiệu suất lên đến 96%, các thông số tối ưu cho quá trình tiền xử lý là 37 °C ở pH 6,2 trong 2 giờ, chất rắn 5% (w/v), với 0,05% trọng lượng enzyme sử dụng trộn liên tục [97].

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

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

Phương pháp này được sử dụng phổ biến để chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nguyên liệu tự nhiên. Bức xạ vi sóng được sử dụng để tăng tốc độ chiết bằng cách làm nóng dung môi hiệu quả và nhanh chóng. Có ý kiến cho rằng nhiệt do vi sóng tạo ra làm bay hơi nước trong các tế bào rong biển dẫn đến tăng áp suất lên thành tế bào khiến thành tế bào bị vỡ một cách hiệu quả và sau đó giải phóng các hợp chất giữa các tế bào vào dung môi chiết. Yuan và MacQuarrie (2015) đã giới thiệu phương pháp gia nhiệt vi sóng thay vì gia nhiệt thông thường trong quá trình chiết xuất alginate [98]. Chiếu xạ vi sóng được sử dụng trong ba giai đoạn, bước đầu làm khô rong biển tươi (*Ascophyllum nodosum*, 80 – 94 °C trong 24 phút với chân không), giai đoạn tiền xử lý bằng HCl (90°C trong 15 phút) và giai đoạn chiết xuất bằng Na₂CO₃ (100°C trong 10 phút). Khi chiết xuất alginate cùng với thu hồi fucoidan, thu được hiệu suất 18,24% với trọng lượng phân tử trung bình là 75 kDa. Việc bỏ qua bước fucoidan đã làm tăng hiệu suất chiết xuất lên 23,13% với sự gia tăng đáng kể về trọng lượng phân tử của alginate (195 kDa). Gần đây, Torabi và cs. (2022) đã đánh giá tác động của nhiệt độ, thời gian chiết, công suất vi sóng và tỷ lệ nạp rong đến năng suất chiết xuất bằng MAE để chiết xuất *Nizimuddinia zanardini* [99]. Hiệu suất chiết xuất tốt nhất là 31,39% thu được ở nhiệt độ tiền xử lý là 67°C, công suất vi sóng là 400W và tỷ lệ nạp sinh khối là ~1:30 (w/v) trong 19 phút. Trong nghiên cứu này, gia nhiệt vi sóng chỉ được sử dụng trong giai đoạn tiền xử lý với HCl ở pH=1.

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

chiết xuất ngắn cần thiết để thu được các hợp chất này. MAE có thể tăng sản lượng phlorotannins lên 70% so với chiết dung môi thông thường [100]. Việc sử dụng MAE để chuẩn bị các chiết xuất MeOH của *Ascophyllum nodosum*, *Lessonia nigrecens*, *Lessonia trabeculate* và *Saccharina japonica* dẫn đến hàm lượng phenolics cao hơn so với chiết xuất thu được bằng cách lắc ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ [101]. Tuy nhiên, MAE cũng có thể phân hủy các polyphenol rong nâu nhạy cảm với nhiệt ở một mức độ nhất định [56].

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

Rodriguez-Jasso và cs. (2011) đã chỉ ra rằng tương tác giữa áp suất và thời gian chiết MAE rất có ý nghĩa ($p < 0,01$) đối với lượng fucoidan từ *Fucus vesiculosus* và hiệu suất tối đa (18,22%) đạt được khi chiết 1 g rong/25 ml nước ở áp suất cao nhất (120 psi), thời gian chiết thấp nhất (1 phút) đã được áp dụng. Hàm lượng fucoidan thu được này tương đương với lượng polysaccharit thu được bằng nhiều lần chiết xuất ở 70°C [102].

Lorbeer và cs. (2015) đã chứng minh động học chiết xuất fucoidan từ *Ecklonia radiata* dùng HCl (pH=2) ở 60°C bằng cách sử dụng cả gia nhiệt đối lưu và vi sóng trong các bình hở trong tối đa 3 giờ. Các kết quả chỉ ra rằng việc tối đa hóa sản lượng fucoidan thường phải trả giá bằng độ tinh khiết và tính toàn vẹn cấu trúc. Vi sóng cung cấp một giải pháp thay thế hiệu quả cao và có thể kiểm soát được đối với hệ thống gia nhiệt đối lưu [103, 104].

Hiện tại, phương pháp MAE được áp dụng phổ biến để chiết xuất polysaccharit. Yuan và Macquarrie (2015) đã chiết xuất fucoidan với sự hỗ trợ của vi sóng từ *Ascophyllum nodosum*. Hiệu suất fucoidan tối ưu là 16,08% thu được ở 120°C trong 15 phút chiết xuất. Bản chất trung gian vi sóng của phương pháp này làm cho nó hiệu quả về cả thời gian và nguyên liệu, đồng thời sử dụng nước làm dung môi [105].

Polysacarit thu được từ MAE có nồng độ nhóm sunfat cao hơn và MW thấp hơn. Alboofetileh và cs. (2019) đã báo cáo hàm lượng sunfat cao hơn và MW cao hơn [82], trong khi Yuan và Macquarrie (năm) báo cáo rằng hàm lượng sunfat thấp hơn và MW của polysacarit được chiết xuất bởi MAE thấp hơn so với chiết nước nóng (HWE) [105]. MAE không có ảnh hưởng đáng kể đến loại liên kết glycosid và thành phần monosacarit trong fucoidan từ *Sargassum thunbergii* [106] trong khi hàm lượng fucose cao hơn đã được báo cáo đối với fucoidan *A. nodosum* và *N. zanardinii* cũng như hàm lượng axit uronic thấp hơn [79, 82, 105]. Hơn nữa, chiết xuất polysacarit thu được từ MAE cho thấy hoạt tính chống oxy hóa và thu hồi gốc hydroxyl cao hơn cũng như hoạt động hạ đường huyết tiềm ẩn do MW thấp hơn và hàm lượng nhóm sunfat cao hơn so với chiết thường [106]. Fucoidan được chiết xuất bởi MAE ở 90 °C có tác dụng loại bỏ DPPH tương đương và khả năng khử thậm chí còn cao hơn so với fucoidan được chiết thường [105].

Các thông số MAE cũng có ảnh hưởng mạnh mẽ đến thành phần monosacarit fucoidan, mức độ sunfat hóa, MW và các hoạt động sinh học. Thành phần monosacarit của fucoidan từ *A. nodosum* chỉ ra rằng fucose là thành phần chính của fucoidan được chiết xuất ở 90 °C trong khi axit glucuronic là thành phần chính của fucoidan được phân lập ở 150 °C [105]. Tương tự, bằng cách tăng áp suất chiết xuất từ 30 psi lên 120 psi, hàm lượng fucose trong fucoidan từ *F. vesiculosus* giảm từ 100% xuống 27% và hàm lượng galactose tăng từ 0% lên 57% [102]. Ngoài mức độ sunfat hóa của fucoidan giảm khi tăng nhiệt độ chiết xuất trong MAE, tác dụng nhật rác đối với các gốc tự do DPPH và khả năng khử cũng giảm khi tăng nhiệt độ và thời gian [102, 105].

MAE được đánh giá là kỹ thuật chiết xuất nhanh, hiệu quả. Hiệu ứng nhiệt được tạo ra từ sóng điện từ thúc đẩy sự phân hủy nhanh chóng của màng quang hợp bằng cách đốt nóng có chọn lọc phần phân cực hơn của cellulose. Hiệu ứng làm nóng này rất hữu ích để giải phóng fucoxanthin từ phức hợp fucoxanthin-chl a/c-protein [70]. Sử dụng MAE để chiết xuất fucoxanthin từ *L. japonica*, *U. pinnatifida* và *S. fusiforme* với dung môi EtOH và Aceton thu được hiệu suất tốt nhất. Vì lý do an toàn, EtOH đã được chọn để phân tích thêm, tỷ lệ dung môi/mẫu là 10:1 (mL/g) ở 50 °C trong 10 phút. Sản lượng thu được lần lượt là 5,13; 109,30 và 2,12 mg/100 g đối với mỗi loại rong [107]. Hơn nữa, MAE với các điều kiện 300 W, 2,45 GHz và 30 giây đã được sử dụng như một bước tiền xử lý để tăng cường chiết xuất CO₂

siêu tới hạn của fucoxanthin từ *U. pinnatifida* bằng cách phá vỡ màng tế bào và thúc đẩy khả năng khuếch tán của dung môi qua gian bào [108]. Xu và cộng sự kết hợp MAE-EAE để chiết xuất fucoxanthin từ *S. japonica* [109], điều kiện tối ưu hóa là nhiệt độ vi sóng 42,6 °C, phức hợp enzyme (pectinase hoặc cellulase) với tỷ lệ 1,12, hiệu suất chiết xuất fucoxanthin đạt 0,443 mg/g.

1.2.2.4. Một số phương pháp hiện đại khác

❖ Chiết chất lỏng điều áp (PLE)

Chiết chất lỏng điều áp (PLE) hay chiết dung môi điều áp (PSE) là kỹ thuật sử dụng dung môi lỏng để chiết xuất dưới áp suất cao. Dung môi có thể sử dụng ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ sôi của nó để tăng tốc độ truyền khối cũng như chiết xuất. Việc tăng nhiệt độ chiết xuất có thể thúc đẩy độ hòa tan, tốc độ truyền khối của phlorotannin, làm giảm độ nhớt và sức căng bề mặt của dung môi, dẫn đến tăng tính thấm của dung môi vào gian bào để chiết xuất hợp chất mục tiêu. Ngoài ra, PSE giúp giảm thời gian, tăng sản lượng chiết xuất của hợp chất mục tiêu, có thể áp dụng công nghệ tự động hóa để tiến tới sản xuất ở quy mô lớn. So với phương pháp truyền thống, PSE đắt hơn nhưng giảm đáng kể việc sử dụng dung môi, có thể nghiên cứu và áp dụng quy trình vận hành với quy mô công nghiệp [56]. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, việc áp dụng phương pháp PLE để chiết rong đều thu được hàm lượng phenolic cao hơn [54, 57, 110, 111]. Ngoài ra, sự kết hợp của PSE và EAE cũng cải thiện hiệu quả chiết xuất phlorotannins từ rong *Sargassum muticum* [54].

Bảng 1.4. Chiết xuất phenolic từ rong theo phương pháp PLE [56, 57]

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

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

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

PLE chiết fucoidan cao hơn nhiều so với phương pháp truyền thống. Nhiệt độ cao (>100 °C) và áp suất (> 10 MPa) làm thay đổi tính chất vật lý của dung môi giúp cải thiện khả năng thâm nhập, hiệu ứng mao dẫn và phá hủy tế bào, dẫn đến tăng sản lượng fucoidan của PLE dùng nước làm dung môi (13,15%) so với phương pháp chiết thông thường (5,2%) từ *N. zanardinii* [82]. Cùng với năng suất được cải thiện, thời gian chiết xuất giảm từ 6 giờ (hai chu kỳ 3 giờ) xuống còn 20 phút (hai chu kỳ 10 phút). Trong một nghiên cứu khác, hiệu suất chiết xuất *S. japonica* cao hơn 4 lần bởi PLE (140 °C, 50 bar) với NaOH 0,1% làm dung môi so với chiết thường bằng HCl 0,05M [112].

Bằng cách sử dụng NaOH 0,1%, axit formic 0,1% và nước làm dung môi chiết, nhiệt độ cao hơn ảnh hưởng tích cực đến hàm lượng sunfat. Fucoidan được chiết xuất bằng axit formic 0,1% có hàm lượng sunfat thấp nhất, tiếp theo là chiết xuất bằng nước và chiết xuất bằng NaOH 0,1%. Liên kết este giữa chuỗi polysacarit và nhóm sunfat không dễ bị phá vỡ bởi NaOH trong khi nước ở nhiệt độ cao phá vỡ liên kết este hiệu quả hơn [112]. Hàm lượng axit uronic cao nhất trong fucoidan chiết xuất thu được bằng cách sử dụng axit formic ở 110 °C và 25 bar, trong khi nồng độ đường tổng cao nhất thu được ở 140 °C và 50 bar [112] và ở 180 °C và 13 bar [99]. Khi nhiệt độ và áp suất tiếp tục tăng, nồng độ axit uronic và đường giảm dần cho thấy monosacarit không ổn định ở nhiệt độ và áp suất cao hơn [113]. Fucose là monosacarit chính của fucoidan được chiết xuất bởi PLE, trong khi mannose, galactose, xyloza và glucose cũng có mặt trong phần lớn các mẫu [112]. Fucoidan chiết xuất bằng axit formic thấp hơn đáng kể so với chiết xuất bằng NaOH 0,1%, nước hoặc etanol, cho thấy rằng chiết xuất axit có thể đã gây ra sự phân hủy

chuỗi polysaccharite [112]. Fucoidan thu được cho thấy hoạt tính chống oxy hóa tốt, chống phân bào và chống tăng sinh vừa phải trong các dòng tế bào [59].

Kỹ thuật này dựa trên việc áp dụng nhiệt độ và áp suất cao bằng dung môi lỏng. Đây cũng là một phương pháp xanh vì nó sử dụng lượng dung môi thấp và thời gian ngắn. Hơn nữa, PLE có ưu điểm bổ sung là môi trường không có oxy và ánh sáng thuận lợi cho việc chiết xuất fucoxanthin. Thực hiện PLE với rong Nâu *Eisenia bicyclis*, các thông số ảnh hưởng đến quá trình là nhiệt độ và nồng độ EtOH, giá trị tối ưu là 110 °C và 90% EtOH, hiệu suất đạt được là 0,42 mg/g [114].

❖ Chiết xuất có hỗ trợ ép đùn (ExEA)

Ép đùn là một quá trình cơ nhiệt được sử dụng để sản xuất thực phẩm có hàm lượng tinh bột cao. Peggy Vauchel và cs. (2008) đã nghiên cứu quá trình ép đùn phản ứng để chiết xuất alginate từ *Laminaria digitata* [115]. Chiết kiềm ép đùn phản ứng dường như hiệu quả hơn so với chiết kiềm theo mẻ do thời gian chiết giảm từ khoảng một giờ xuống chỉ còn vài phút, yêu cầu về nước và chất phản ứng (Na_2CO_3 4%) đều giảm một nửa mà năng suất chiết xuất cao hơn 15% và các đặc tính lưu biến của sản phẩm đều được tăng cường.

Gần đây, Sugiono và cs. (năm) đã áp dụng công nghệ ép đùn trong chiết xuất alginate từ rong Nâu *Sargassum cristaefolium* [116]. So với quy trình chiết xuất alginate thông thường, một máy đùn đã được đưa vào giai đoạn chiết xuất Na_2CO_3 để thay thế cốc/bể phản ứng. Các thông số vận hành, như nhiệt độ, tỷ lệ nạp rong, tốc độ cấp liệu của máy đùn và độ pH đã được nghiên cứu. Hiệu suất chiết xuất tốt nhất quan sát được là 45,54%, trong khi có thể đạt được trọng lượng phân tử lên tới 217,94 kDa. Điều thú vị là tỷ lệ M/G của sản phẩm là 0,29, cho thấy hàm lượng guluronate rất cao trong polysaccharit [116].

❖ Chiết chất lỏng siêu tới hạn (SFE)

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

ly sCO₂ thường ở dạng dầu và cô đặc. Có thể dễ dàng tách CO₂ ra khỏi sản phẩm cuối cùng bằng cách điều chỉnh áp suất hoặc nhiệt độ [62].

CO₂ tinh khiết có năng suất chiết xuất fucoxanthin thấp do khả năng hòa tan kém của fucoxanthin trong CO₂ [117, 118]. Các đồng dung môi như etanol được dùng để tăng độ phân cực của CO₂, nâng cao hiệu quả chiết xuất và thu hồi fucoxanthin. SFE đã được áp dụng chiết *U. pinnatifida*, sử dụng EtOH làm đồng dung môi và các phạm vi nhiệt độ khác nhau (30–60 °C) và áp suất (80–300 bar) đã được thử nghiệm. Nhiệt độ cao (50 °C) và áp suất (200 bar) cho giá trị 7,53 mg/g DW [119]. Nghiên cứu khác trên *U. pinnatifida* chỉ ra điều kiện tối ưu với SFE. Đối với phương pháp không có chất cuốn (70 °C và 400 bar trong 3 giờ) cho phép thu được hiệu suất fucoxanthin là 60,12 µg/g. Phương pháp chiết yêu cầu sử dụng EtOH làm chất dẫn trong điều kiện tương tự (60 °C và 400 bar trong 3 giờ) hiệu quả hơn và cho phép đạt được hiệu suất fucoxanthin là 994,53 µg/g [69]. Kỹ thuật này cũng cho phép chiết xuất các phân đoạn dầu giàu fucoxanthin từ hai loại rong *S. japonica* và *S. horneri*. Các điều kiện được tối ưu gồm tốc độ dòng khí CO₂ là 27 mg/phút, 45°C, 250 bar trong 2 giờ, nồng độ của fucoxanthin là $0,41 \pm 0,05$ mg/g đối với *S. japonica* và $0,77 \pm 0,07$ mg/g đối với *S. horneri* [120].

Getachew và cs (2018) đã dùng SFE để chiết xuất đồng thời fucoxanthin từ *S. japonica* và dầu từ hạt cà phê rang (*Coffea arabica*) [68]. Dầu cà phê được chiết xuất hoạt động như một đồng dung môi để nâng cao hiệu quả chiết xuất của fucoxanthin. Trong điều kiện tối ưu tỷ lệ rong:hạt cà phê là 3:1, 40°C và 300 bar, hiệu suất dầu và độ thu hồi là 3,51% và 87,3% với hàm lượng fucoxanthin là 2,08 mg/g dầu đã đạt được. Một số nhược điểm trong sử dụng đồng dung môi để chiết xuất là phát sinh chi phí, có thể chiết xuất kèm một số hợp chất không mong muốn (như chlorophyll) và khó khăn trong việc tách đồng dung môi khỏi dịch chiết [108].

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

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

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

của rong biển không hòa tan. Độ dày của dung dịch cản trở quá trình lọc và dung dịch phải được pha loãng với một lượng lớn nước. Vì rong biển còn sót lại rất mịn và có thể làm tắc nghẽn bộ lọc, nên phải cung cấp chất hỗ trợ lọc khiến quá trình này trở nên tốn kém. Ngoài ra, hóa chất sử dụng để chiết xuất có thể ảnh hưởng đến tính chất hóa lý của fucoxanthin, phlorotannin, fucoidan và alginate [47]. Do đó, để hạn chế các vấn đề gặp phải khi sử dụng kỹ thuật chiết xuất truyền thống, cần có các kỹ thuật chiết xuất và chế biến hiện đại thay thế như siêu âm, enzyme, vi sóng,... kết hợp với lọc và ly tâm.

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

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

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

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

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

- Đánh giá chất lượng, tác dụng sinh học của chế phẩm canxi alginate, xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho sản phẩm.

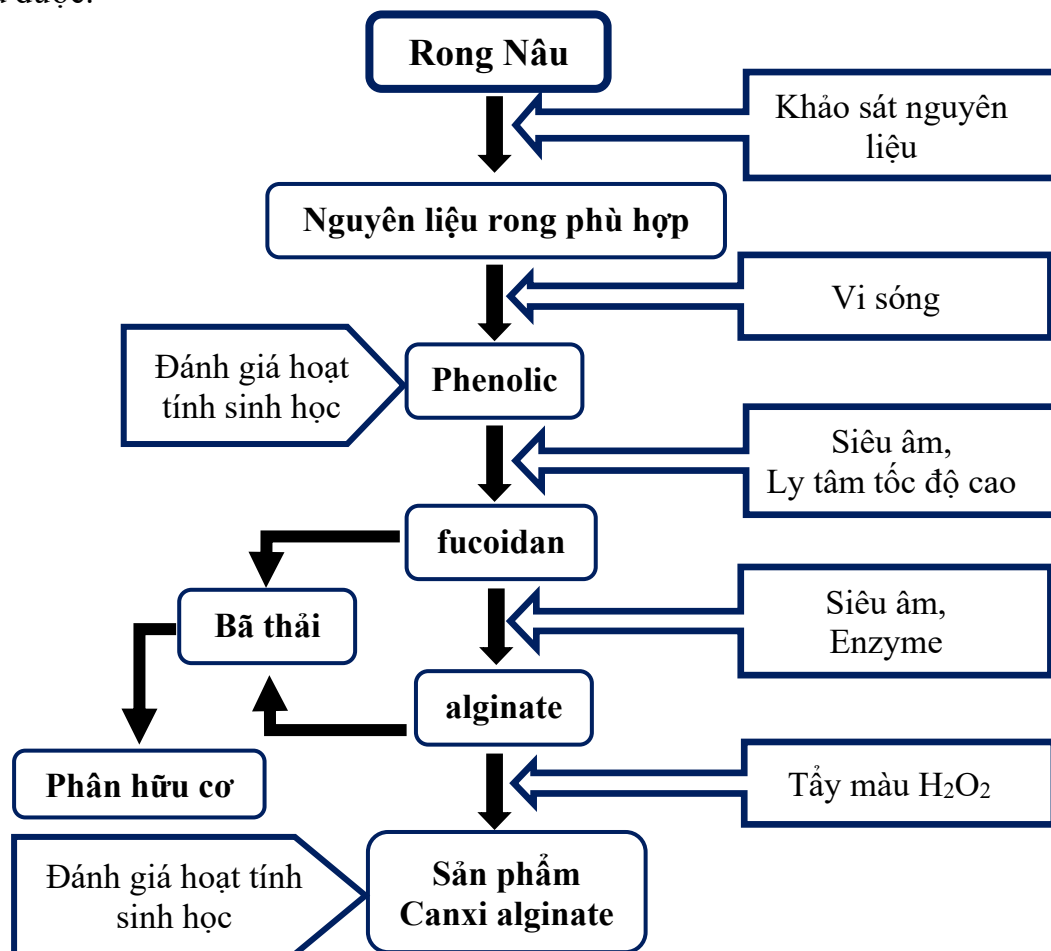
Bên cạnh đó, các vấn đề về sắc tố da thường gây nhiều áp lực về mặt thẩm mỹ, đặc biệt là đối với phụ nữ. Ở châu Á, hàng năm người tiêu dùng tiêu tốn hàng tỷ USD cho các sản phẩm làm sáng da (làm giảm các đốm nắng, tàn nhang hay làm mờ các vết nám). Hiện nay nhiều sản phẩm làm sáng da, chống nám sử dụng hoạt chất là các chất ức chế enzym tyrosinase. Tyrosinase là một đích phân tử quan trọng tham gia vào quá trình hình thành các sắc tố melanin. Ức chế enzym tyrosinase có thể làm hạn chế việc sản sinh quá nhiều các sắc tố melanin từ đó giúp điều trị các rối loạn liên quan đến tăng sắc tố da. Một vấn đề đáng lưu ý là những hoạt chất ức chế enzym tyrosinase hiện nay như hydroquinon và arbutin lại có vấn đề về sự an toàn và tính hiệu quả [121, 122]. Chính vì thế tìm kiếm các hợp chất ức chế tyrosinase hiện vẫn là mối quan tâm của các ngành công nghệ dược phẩm và hóa mỹ phẩm. Rong Nâu chứa các vitamin và khoáng chất như vitamin, axit folic, niacin, axit pantothenic, calci, magie, phospho, sắt, kẽm... và dồi dào hoạt chất làm trắng da, chống lão hóa tự nhiên, giúp da trở nên tươi sáng, mịn màng. Trong các mô hình sàng lọc hoạt chất hiện đại, mới đây xuất hiện mô hình sàng lọc ảo (Virtual Screening - VS) và đã nhanh chóng đóng một vai trò hết sức quan trọng trong các dự án nghiên cứu phát triển thuốc. Mô hình trên sử dụng các tiến bộ trong tin học để sàng lọc ảo, mô tả và dự đoán các cấu trúc mới được cho là có hoạt tính mạnh, làm giảm thiểu chi phí và thời gian trong quá trình phát hiện và phát triển thuốc [123, 124]. Luận án đã sàng lọc 71 hợp chất được tách chiết từ Rong Mơ sử dụng hợp chất tropolone đã được chứng minh có cơ chế ức chế tyrosinase làm chất chuẩn nhằm bước đầu sàng lọc tìm kiếm các hoạt chất có tác dụng ức chế enzym tyrosinase, góp phần làm sáng tỏ tác dụng làm sáng da, chống nám của các loài rong trong thực tiễn.

1.3. Định hướng nghiên cứu

Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước đã xây dựng thành công quy trình chiết xuất các hợp chất như fucoidan, alginate, fucoxanthin, phlorotannin... từ nguồn nguyên liệu rong Nâu. Một số các hợp chất như alginate, fucoidan đã được sản xuất trên quy mô công nghiệp. Tuy nhiên, các quy trình đó đều chủ yếu chỉ tạo ra một sản phẩm duy nhất, chưa có sự tích hợp để thu hồi toàn bộ các hợp chất có giá trị từ rong Nâu. Hiện nay, kinh tế tuần hoàn ngày càng được chú trọng phát triển, việc tận dụng tối đa nguồn nguyên liệu để sản xuất các sản phẩm có giá trị, không phát sinh

chất thải là một xu thế tất yếu. Chính vì vậy, luận án nghiên cứu đặt ra vấn đề xây dựng được quy trình tích hợp và thu hồi tối đa các sản phẩm có giá trị được biết đến trong quá trình sản xuất alginate từ rong Nâu của Việt Nam; đồng thời hạn chế ở mức thấp nhất việc sử dụng các loại hóa chất độc hại và xả thải ra môi trường. Để đạt được mục đích đó, chúng tôi nghiên cứu áp dụng một số các công nghệ, kỹ thuật hiện đại như công nghệ enzyme, siêu âm, vi sóng, ly tâm tốc độ cao... vào trong quá trình sản xuất. Theo đó, các nghiên cứu được định hướng (theo hình 1.7) như sau:

- Nghiên cứu đánh giá chất lượng, xác định nguồn nguyên liệu;
- Nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ tích hợp các kỹ thuật tiên tiến để chiết xuất và sản xuất chế phẩm alginate, đồng thời thu hồi tối đa các thành phần hữu ích khác của rong Nâu như phenolic, fucoidan và tận dụng nguồn bã thải để sản xuất phân bón.
- Nghiên cứu đánh giá chất lượng và một số tác dụng sinh học của chế phẩm thu được.



Hình 1.7. Sơ đồ định hướng nghiên cứu

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Mẫu rong Nâu

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

Bảng 2.1. Các mẫu rong Nâu sử dụng trong nghiên cứu

TT	Họ	Chi	Loài	Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu mẫu
1	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>polycystum</i>	RB01 QN-CT	Quảng Ninh - Cô Tô
2	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>mcclurei</i>	RB02 QN-CT	Quảng Ninh - Cô Tô
3	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>swartzii</i>	RB03 QN-CT	Quảng Ninh - Cô Tô
4	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>polycystum</i>	RB04 QN-CT	Quảng Ninh - Cô Tô
5	Dictyotaceae	<i>Padina</i>	<i>boryana</i>	RB02 QB-HL	Quảng Bình - Hòn La
6	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>polycystum</i>	RB03 QB-HL	Quảng Bình - Hòn La
7	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>sp.</i>	RB04 QB-HL	Quảng Bình - Hòn La
8	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>sp.</i>	RB01 VM-RD	Vĩnh Mốc - Rạn Đá
9	Dictyotaceae	<i>Padina</i>	<i>boryama</i>	RB02 VM-RD	Vĩnh Mốc - Rạn Đá

10	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>gracillimum</i>	RB03 VM- RD	Vĩnh Mốc - Rạn Đá
11	Dictyotaceae	<i>Dictyota</i>	<i>dichotoma</i>	RB04 VM- RD	Vĩnh Mốc - Rạn Đá
12	Laminariaceae	<i>Laminaria</i>	<i>sp.</i>	RB 01 MC1- HM	Mặt Cắt I - Hòn Mê
13	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>sp.</i>	RB 02 MC1- HM	Mặt Cắt I - Hòn Mê
14	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>sp.1</i>	RB 04 HV- SC-BC	Hải Vân-Son Chà-Bãi Chuối
15	Laminariaceae	<i>Laminaria</i>	<i>sp.1</i>	RB 02 HV- SC-MTL	Hải Vân-Son Chà-Mũi Thô Lô
15	Sargassaceae	<i>Turbinaria</i>	<i>sp.</i>	RB 1(1)HT- CLC	Hòn Tai - Cù Lao Chàm
17	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>kjellmanianum</i>	RB 03 LS	Lý Sơn
18	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>sp.3</i>	RB 06 LS	Lý Sơn
19	Dictyotaceae	<i>Dictyota</i>	<i>dichotoma</i>	RB 07 LS	Lý Sơn
20	Sargassaceae	<i>Turbinaria</i>	<i>turbinata</i>	RB 08 LS	Lý Sơn
21	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>tenerrimum</i>	RB 09 LS	Lý Sơn
22	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>mcclurei</i>	RB 01 - NT	Nha Trang
23	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>polycystum</i>	RB 02 - NT	Nha Trang
24	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>swartzii</i>	RB 03 - NT	Nha Trang
25	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>quinhonensis</i>	RB 04 - NT	Nha Trang
26	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>sp.4</i>	RB 05 - NT	Nha Trang

27	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>swartzii</i>	RB 06 - NT	Nha Trang
28	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>mcclurei</i>	RB 06 - NT	Nha Trang
29	Dictyotaceae	<i>Dictyota</i>	<i>dichotoma</i>	RB 01 - TS	Trường Sa
30	Sargassaceae	<i>Turbinaria</i>	<i>turbinata</i>	RB 02 - TS	Trường Sa
31	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>sp.5</i>	RB 02 - TS	Trường Sa
32	Sargassaceae	<i>Sargassum</i>	<i>swartzii</i>	RB 02 - TS	Trường Sa

Mẫu rong được sử dụng trong các nghiên cứu để xây dựng quy trình công nghệ tích hợp là loài *swartzii* thuộc chi rong Mơ (*Sargassum*). Vị trí thu mẫu tại khu vực đảo Cô Tô, Quảng Ninh trong Quý II năm 2019.



Hình 2.1. Mẫu rong nguyên liệu *S. swartzii*

2.1.2. Hóa chất và thiết bị

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

Enzyme được sử dụng là *Htec2* của hãng Novozymes Đan Mạch. Chế phẩm hỗ trợ phân hủy phân hủy các chất nền xenlulo polyme thực vật không hòa tan, đặc biệt là xúc tác quá trình thủy phân liên kết glucosid β -1,4 trong cellulose. Hoạt độ của enzyme: ≥ 100 FBGU/g; tỉ trọng $\sim 1,2$ g/mL ở 25 °C; Nhiệt độ lưu trữ 2 – 8 °C.

Chế phẩm vi sinh được sử dụng là EMZEO, EM-fert 1 và S.EM. Đây là những sản phẩm có sẵn trên thị trường, giá thành phù hợp, có chứa các chủng vi sinh có khả năng phân giải mạnh cellulose, protein, pectin,... như *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *Lactobacillus axitophilus*,... *Lactobacillus plantarum*, *Streptomyces sp.*, *Saccharomyces cerevisiae* với hàm lượng mỗi chủng là $10^7 - 10^8$ CFU/g.

Thiết bị nghiên cứu của phòng thí nghiệm của Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên (lò vi sóng của hãng Sharp, model R-20A1(S)VN, công suất tối đa 800W; Máy siêu âm cầm tay UP200Ht (200W, 26kHz) của hãng Hielscher; Bể siêu âm Elmasonic S100H (500W) của hãng Elma Schmidbauer...)

2.2. Các phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xác định hàm lượng phenolic tổng

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

2.2.2. Phương pháp xác định alginate

Cân khoảng 10g rong khô, ngâm rong trong 500 ml dung dịch formaldehit 1,0%, khuấy nhẹ trong 12 giờ. Sau đó rửa sạch rong bằng nước cất. Tiếp tục ngâm rong trong dung dịch H_2SO_4 0,2 N trong 4 giờ rồi lại rửa sạch bằng nước cất. Alginate được chiết bằng Na_2CO_3 1% trong 12 giờ, có khuấy nhẹ. Lọc thu phần dịch lọc. Kết tủa alginate bằng cồn 95° theo tỉ lệ dịch chiết:cồn là 1:2, lọc thu tủa, rửa tủa bằng acetone, sấy khô ở 40 °C. Cân sản phẩm và tính thành phần phần trăm.

Xác định hàm lượng axit alginic: Mẫu rong được khuấy với dung dịch Na_2CO_3 nồng độ 3% (25 ml) trong vòng 1 giờ ở 70°C , dịch chiết được tách bằng ly tâm, và cặn được xử lý lần hai dưới điều kiện tương tự. Dịch chiết soda gộp lại xử lý ở nhiệt độ phòng với 5 giọt (110 mg; 0,035 ml) bromide (Br-); khuấy một vài phút cho đến khi bromide tan hoàn toàn và giữ qua đêm. Dung dịch đã loại màu được thẩm tách 3 ngày với nước cất chuyên vào trong bình thể tích 500 ml, đưa về vạch bằng nước cất và lọc (nếu cần thiết) qua giấy lọc, hàm lượng alginic axit được xác định trong 0,5 ml dung dịch mẫu bằng phản ứng so màu với 3,5-dimethylphenol và sulfuric axit. Dung dịch sodium alginate (100 mg/l, BDH, UK) được sử dụng để vẽ đường chuẩn trong vùng 0 - 50 μg trên mẫu.

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

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

Xác định màu của alginate: Màu của alginate xác định bằng cách tính% mật độ ánh sáng truyền qua dung dịch alginate 1,0% trên máy UV-VIS tại bước sóng 510 nm. Màu càng sáng độ truyền qua càng cao.

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

Thay t và t_0 vào công thức:

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

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

η_0 , η là hệ số nhớt của nước và của chất lỏng cần đo.

2.2.3. Phương pháp sàng lọc ảo (*in silico docking*)

Phương pháp sàng lọc ảo (*in silico docking*) sử dụng các tiến bộ trong tin học để sàng lọc ảo, mô tả và dự đoán các cấu trúc mới được cho là có hoạt tính sinh học cao. Những phương pháp sàng lọc rút ngắn thời gian và giảm chi phí trong quá trình nghiên cứu và phát triển thuốc. Hợp chất tự nhiên khi lựa chọn để nghiên cứu không bắt buộc có sẵn và việc thử nghiệm chúng chỉ là mô phỏng ảo, do đó không gây tổn kém về nguyên vật liệu. Từ đó với một chất bất kỳ cũng có thể được đánh giá thông qua sàng lọc ảo, tùy vào nghiên cứu, cơ sở dữ liệu hợp chất cho sàng lọc ảo có thể lên tới vài triệu hợp chất và toàn bộ có thể được phân tích chỉ qua một lần sàng lọc. Phương pháp sàng lọc thường được sử dụng các tương tác giữa thụ thể (Receptor) - hợp chất (Ligand) để tìm ra các hợp chất có cấu trúc được dự đoán liên kết với thụ thể tốt nhất thể hiện qua mức năng lượng ΔG thấp nhất.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2.6.1. Tinh chế fucoidan

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

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

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

Thuốc thử:

- Dung dịch axit H_2SO_4 pha mẫu: rót từ từ cẩn thận 6 thể tích axit H_2SO_4 , vào 1 thể tích nước, để cho nguội. - Dung dịch axit H_2SO_4 , 1 M: lấy 5,4 ml axit H_2SO_4 , nhỏ từ từ vào 60 ml nước, để nguội, thêm nước thành 100 ml.

- Dung dịch axit Thioglycolic: pha loãng 1,0 ml axit Thioglycolic thành 30 ml với nước.

Chuẩn bị dung dịch thử:

Cân chính xác khoảng 0,1 g chế phẩm vào bình định mức 100 ml, thêm 70 ml nước đun nóng để hòa tan hoàn toàn. Để nguội, thêm nước vừa đủ tới vạch, lắc

đều. Hút chính xác 5 ml dung dịch trên vào bình định mức 25 ml, thêm 15 ml dung dịch axit H_2SO_4 , 1 M đun cách thủy ở $95\text{ }^\circ C$ trong 2,5 giờ. Để nguội, thêm vừa đủ đến vạch bằng dung dịch H_2SO_4 1 M. Hút chính xác 2 ml dung dịch trên cho vào ống nghiệm để trong nước đá, thêm từ từ chính xác 20 ml axit H_2SO_4 , đậy nút kín, lắc đều, đặt vào nồi cách thủy đang sôi trong 10 phút, lấy ra làm nguội ngâm vào nước lạnh. Thêm vào dung dịch lạnh chính xác 0,2 ml dung dịch axit Thioglycolic (vừa thêm vừa lắc). Để yên trong chỗ tối 3 giờ trước khi đo độ hấp thụ tại bước sóng 400 nm và 430 nm.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn:

Cân chính xác khoảng 50 mg chuẩn L-fucose vào bình định mức 50 ml, hòa tan hoàn toàn trong nước, thêm nước vừa đủ đến vạch. Hút chính xác 2 ml dung dịch trên cho vào bình định mức 100 ml, thêm nước vừa đủ đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 2 ml dung dịch chuẩn trên ống nghiệm để trong nước đá, thêm từ từ chính xác 20 ml axit H_2SO_4 , đậy nút kín, lắc đều, đặt vào nồi cách thủy đang sôi mạnh 10 phút, lấy ra làm nguội, ngâm vào nước lạnh. Thêm vào dung dịch lạnh chính xác 0,2 ml dung dịch axit Thioglycolic (vừa thêm vừa lắc). Để yên trong chỗ tối 3 giờ trước khi đo độ hấp thụ tại bước sóng 400 nm và 430 nm.

Chuẩn bị mẫu trắng:

Mẫu trắng axit H_2SO_4 : Tiến hành tương tự như dung dịch thử nhưng thay 2 ml dung dịch thử bằng 2 ml nước cất. Mẫu trắng của dung dịch thử: Tiến hành tương tự như dung dịch thử nhưng không cho dung dịch axit Thioglycolic. Mẫu trắng của dung dịch chuẩn L-fucose: tiến hành tương tự như dung dịch chuẩn nhưng không cho dung dịch axit Thioglycolic.

Tiến hành

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

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

Trong đó:

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

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

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

mt là khối lượng của mẫu thử (mg)

Xác định hàm lượng Fucoidan:

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

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

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

Trong đó:

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

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

2.3. Phương pháp đánh giá tác dụng sinh học

2.3.1. Phương pháp đánh giá chỉ tiêu an toàn

- Xác định tổng số vi khuẩn yếu khí, nấm men, nấm mốc trong các sản phẩm thực phẩm theo TCVN 4886-89;

- Xác định *E.coli*, theo TCVN 6846:2007;

- Xác định *Salmonella*, theo TCVN 4829:2005;

- Xác định *Staphylococcus aureus*, theo TCVN 4830:2005;

- Xác định *Clostridium perfringens*, theo TCVN 4991:2005;

- Xác định *Bacillus cereus*, theo TCVN 4992:89;

- Xác định aflatoxin, theo TCVN 7596:2007;

- Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí, theo TCVN 4884:2005;

- Tổng bào tử nấm men- mốc TCVN 6265:2007;

- Xác định *Coliforms*, theo TCVN 4882:2007;

- Xác định hàm lượng chì, theo AOAC 994.02;

- Xác định Asen, theo AOAC 952,13;

- Xác định hàm lượng cadimi, theo AOAC 2000;

- Xác định hàm lượng thủy ngân, theo AOAC 971,21;

2.3.2. Phương pháp xác định độc tính cấp

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

Thử nghiệm sơ bộ: Cho 10 chuột (50% đực, 50% cái) nhịn đói ít nhất 12 giờ trước khi dùng mẫu nghiên cứu ở liều duy nhất, liều cao (từ 5000 - 6.000 mg/kg thể trọng), hoặc cao nhất qua đường uống (thể tích tối đa là 0,2 ml-0,3 ml/10 g trọng

lượng chuột tham gia thử nghiệm được bố trí theo “Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu” của Bộ y tế ban hành theo quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015). Theo dõi và ghi nhận cử động tổng quát, biểu hiện về hành vi, trạng thái lông, ăn uống, đi tiểu và số lượng chết của chuột trong vòng 72 giờ, chuột không có dấu hiệu bất thường hoặc chết thì tiếp tục theo dõi đến 7 ngày.

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

- Trường hợp 1: Sau khi cho uống mẫu, số chuột trong lô thử vẫn bảo toàn cho thấy liều cao nhất có thể qua kim mà không làm chuột chết. Liều này được kí hiệu là D_{max} và liều tương đối an toàn dùng trong các thử nghiệm dược lý có thể bằng hoặc lớn hơn $1/5 D_{max}$.

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

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

2.3.3. Nghiên cứu tính độc bán trường diễn

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

Bố trí thí nghiệm

Căn cứ vào kết quả thử nghiệm độc tính cấp cho thấy chế phẩm eicosanoid nghiên cứu thuộc nhóm không có độc tính với liều thử cao nhất là 6000 mg/kg. Vậy LD_0 (liều an toàn không gây chết chuột nhất) trong thử nghiệm này là 6000 mg/kg. Trong khi đó, liều tương đối an toàn (D_s) dùng trong các thử nghiệm dược lý có giá

trị bằng 1/5 hoặc 1/10 liều LD₀ nên mức liều được lựa chọn cho thử nghiệm độc bán trường diễn trên chuột trong thử nghiệm này cao nhất sẽ là 1000 mg/kg, sau đó giảm xuống là 500 mg/kg và 250 mg/kg.

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

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

Theo dõi biểu hiện bên ngoài của động vật thí nghiệm

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

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

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

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

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

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

Xử lý số liệu

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

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

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

Sau thời gian thích nghi, 70 con chuột đã được chia ngẫu nhiên thành 7 nhóm, mỗi nhóm 10 con. Các nhóm này bao gồm 1 nhóm đối chứng và 3 nhóm đã được gây độc chì, cadimin và thủy ngân và 3 nhóm sau khi được gây độc thì được tiếp tục cho ăn canxi alginate. Các nhóm đối chứng nhận hàng ngày 1,0 ml nước cất qua bơm dạ dày (gastric gavage). Động vật của các nhóm khác được cung cấp hàng ngày 1 ml dung dịch chì axetat, cadimi axetate và thủy ngân axetate chứa lần lượt 50 mg Pb, Cd, Hg trên 1,0 kg bằng bơm dạ dày. 3 tuần sau, các động vật thuộc nhóm giải độc được cung cấp một dịch có chứa tương ứng canxi alginate, với liều 0,1 g/kg thông qua bơm dạ dày. Để ngăn chặn sự tương tác của Pb, Cd, Hg và thành phần thức ăn, động vật thuộc tất cả các nhóm không được cho ăn trong 1 giờ sau khi sử dụng kim loại và alginate. Sau 6 tuần thí nghiệm, tất cả các con vật đều được gây mê nhẹ bằng ether và đem mổ. Gan, thận, tim và xương đùi đã được bỏ ra, cân, rửa và lưu trữ cho đến khi phân tích.

Bảng 2.2. Ký hiệu 7 nhóm chuột thử nghiệm

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

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

2.3.5. Phương pháp đánh giá khả năng chống loãng xương

Phương pháp nuôi cấy tế bào in vitro

Dòng tế bào *MC3T3-E1* được nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong môi trường nuôi cấy alpha-MEM có bổ sung 10% huyết thanh phôi bò (FBS), 1,0% kháng sinh

PS ở điều kiện 37 °C và 5% CO₂. Tế bào được cấy chuyển bằng Trypsin - EDTA (0,05%) sau 2 ngày nuôi cấy. Để xác định khả năng biệt hóa MC3T3-E1 thành nguyên bào xương, tế bào sau khi phủ 80% bề mặt nuôi cấy, được nuôi trong môi trường biệt hóa có bổ sung 10mM β-glycerophosphate và 50 μg/ml ascorbic axit.

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

Phương pháp MTT được sử dụng để xác định sự phát triển của tế bào MC3T3-E1 dưới tác động của chất nghiên cứu. Phương pháp này xác định sự phát triển của tế bào thông qua sự hình thành sản phẩm formazan màu khi đưa MTT vào giếng tế bào dưới tác động của enzyme trong tế bào sống. Khả năng sống sót của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

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

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

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

Xác định khả năng kích thích tạo Collagen [10]

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

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

Xác định khả năng kích thích tạo khoáng

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

2.3.6. Phương pháp thử hoạt tính chống oxy hóa

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

2.3.7. Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào

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

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

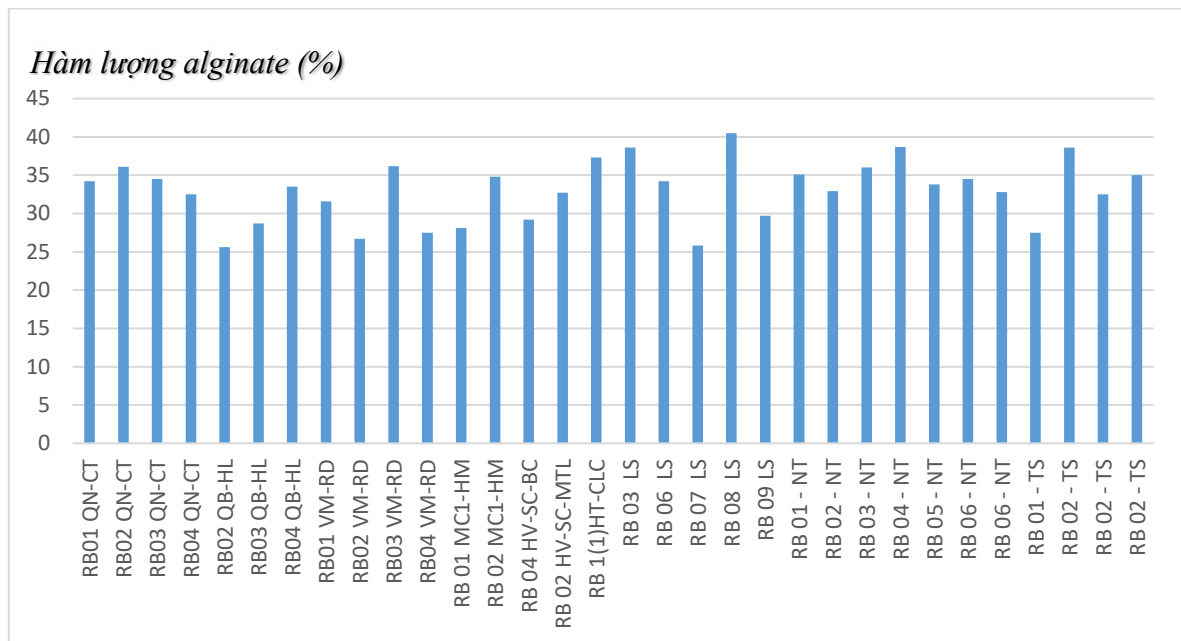
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu khảo sát đánh giá nguyên liệu

3.1.1. Nghiên cứu khảo sát hàm lượng alginate của một số loại rong Nâu thu hoạch tại biển Việt Nam

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

Kết quả phân tích hàm lượng alginate trong các mẫu rong Nâu thu hoạch được thể hiện tại Hình 3.1 (chi tiết tại Phụ lục 1).



Hình 3.1. Hàm lượng alginate trong một số mẫu rong Nâu

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

Kết quả phân tích hàm lượng alginate của một số mẫu rong Nâu vào các thời điểm thu hoạch khác nhau trong năm trình bày trong bảng 3.1.

Bảng 3.1. Biến động theo tháng của axit alginic (%) trong một số mẫu rong Nâu

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

Nhận xét: Kết quả phân tích hàm lượng alginate theo tháng trong các mẫu rong Nâu cho thấy: Hàm lượng alginate tích lũy trong các loài rong khác nhau có sự sai khác nhau rõ rệt. Hàm lượng alginate cao nhất thường vào tháng 4 và tháng 5 là lúc các loài rong đã trưởng thành, phóng thích giao tử và kích thước của cây rong là lớn nhất sau đó từ tháng 6 trở đi thì có hiện tượng hàm lượng alginate giảm dần theo sự tàn lụi của rong. Từ đó cho thấy nên khai thác rong vào tháng 4 và đầu tháng 5 là lúc rong Nâu đã trưởng thành, có kích thước lớn nhất, hàm lượng alginate cao nhất. Mặt khác lúc này rong đã phóng thích các giao tử vào nước biển do vậy ta vừa thu vừa bảo vệ được lợi ích lâu dài, tránh được nạn hủy diệt nguồn lợi.

Qua nghiên cứu, đánh giá sơ bộ hàm lượng alginate và sản lượng của các loại rong Nâu, ta có thể lựa chọn các loài thuộc chi rong Mơ là *S. Mcclurei*, *S. swartzii* và *S. polycystum* để tiến hành các nghiên cứu chiết xuất alginate.

Kết quả phân tích chỉ tiêu của 03 loại rong Mơ thuộc ngành rong Nâu được đưa ra trên bảng 3.2.

Bảng 3.2. Thành phần hóa học chính của một số loại rong Mơ

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

Kết quả phân tích thành phần hóa học chính của 3 loài rong Mơ tại bảng 3.2 cho thấy hàm lượng protein trong các mẫu rong biến động trong khoảng từ 3,1 đến

7,0%, hàm lượng lipit < 2%, hàm lượng tro từ 30,2% đến 46,3%. Hàm lượng tro cao chứng tỏ nguyên liệu rong chứa hàm lượng muối khoáng cao, vì vậy trước khi chế biến cần thiết phải rửa sạch các chất khoáng còn bám trên cây rong.

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

Thành phần hóa học và tính chất lý hóa của canxi alginate chiết từ 3 loại rong Mơ được so sánh với mẫu rong đối chứng của Nga. Kết quả thể hiện trên bảng 3.3. Các mẫu canxi alginate sản xuất từ 3 loại rong Mơ của Việt Nam khá tương đồng với mẫu rong của Nga về thành phần và tính chất hóa lý, thậm chí có tỷ lệ canxi tốt hơn. Tuy nhiên, độ trương trong nước trong các mẫu rong của Việt Nam kém hơn và hòa tan một lượng nhỏ trong nước.

Bảng 3.3. Thành phần hóa học và tính chất lý hóa của canxi alginat chiết từ rong Mơ

STT	Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị	<i>S. mcclurei</i>	<i>S. swartzii</i>	<i>S. polycystum</i>	Mẫu đối chứng của Nga
01	Dạng		Bột đồng nhất	Bột đồng nhất	Bột đồng nhất	Bột đồng nhất
02	Màu sắc		Trắng ngà	Trắng ngà	Trắng xám	Trắng đến xám
03	Mùi vị		Đặc trưng	Đặc trưng	Đặc trưng	Đặc trưng
04	Độ ẩm	%	4,2	4,7	4,3	< 10
05	Hàm lượng tro	%	20,5	19,7	21,0	19-21
06	Axit alginic	%	73,0	74,0	73,5	73-74
07	Canxi	%	10,3	10,7	11,7	≥ 9
08	Độ tan trong nước	%	0,04	0,02	0,03	Không tan
09	Độ trương trong nước	%	150-200	150-200	150-200	200

3.1.2. Nghiên cứu khảo sát hàm lượng các axit béo và lớp chất lipid

3.1.2.1. Kết quả khảo sát hàm lượng lipid tổng trong các mẫu rong Nâu

Kết quả khảo sát hàm lượng lipid tổng trong các mẫu rong Nâu được thể hiện tại bảng 3.4.

Bảng 3.4. Kết quả về hàm lượng lipid tổng các mẫu rong Nâu

TT	Ký hiệu mẫu	Ngày thu mẫu	Nhiệt độ	Độ muối	Độ sâu	Hàm lượng lipid tổng (%)
1	RB02 QB-HL	29/04/2016	27,9	31,5	21	0,32
2	RB03 QB-HL	29/04/2016	28	32	19	0,6
3	RB04 QB-HL	29/04/2016	28,2	32,2	16	0,17
4	RB01 VM-RD	27/04/2016	28,5	32,5	10	0,16
5	RB02 VM-RD	27/04/2016	28,5	31,6	9	0,93
6	RB03 VM-RD	26/04/2016	28,3	32,3	12	0,3
7	RB04 VM-RD	26/04/2016	28	31,2	20	1,28
8	RB 01 MC1-HM	24/04/2016	27,4	30,8	13	0,55
9	RB 02 MC1-HM	24/04/2016	27,3	30,5	15	0,27
10	RB 04 HV-SC-BC	08/07/2017	28,9	31,7	14	0,37
11	RB 02 HV-SC-MTL	07/07/2017	29,3	32,3	9	0,4
12	RB 1(1) HT-CLC	13/07/2017	28,8	31,1	10	0,27
13	RB 03 LS	04/09/2017	30,5	30,9	8	2,11
14	RB 06 LS	06/09/2017	30,5	30,9	8	0,4
15	RB 07 LS	06/09/2017	30,5	30,9	8	0,9
16	RB 08 LS	07/09/2017	31,5	31,2	11	1,58
17	RB 09 LS	07/09/2017	31,6	31,2	10	0,67

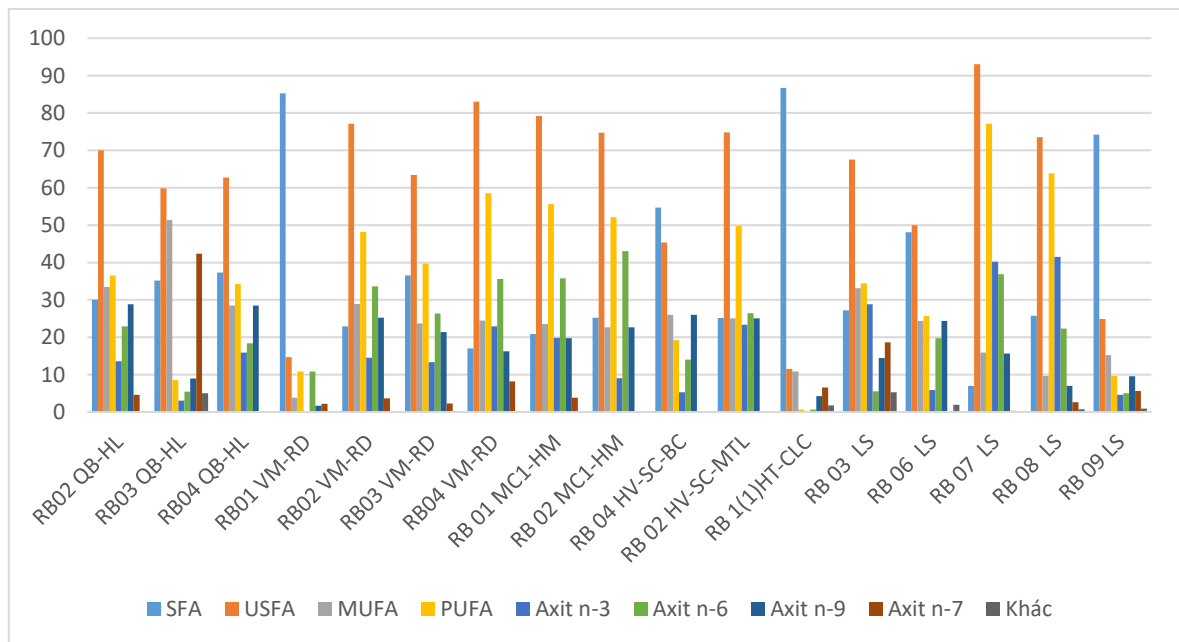
Nhận xét: Các mẫu chủ yếu có hàm lượng trên 0,5% chiếm hơn một nửa tổng số mẫu nghiên cứu. Có 5 mẫu rong Nâu có hàm lượng lipid tổng ở mức trung bình 0,5 – 1% và 3 mẫu ở mức cao tới 1 – 2% là *Dictyota dichotoma* (RB04 VM-RD); *Sargassum* sp. 2 (RB 03 LS); *Turbinaria turbinata* (RB 08 LS) với hàm lượng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

Trong các mẫu nghiên cứu, chi rong Mơ (*Sargassum*) được quan tâm nhất do được nuôi trồng và khai thác nhiều nhất trong các loài rong Mơ ở nước ta. Hàm lượng lipid của các mẫu rong Mơ trong nghiên cứu này là từ 0,17-2,11%. Các mẫu được thu thập ở độ sâu từ 8 tới 16m, nhiệt độ từ 27,3 đến 31,6 °C. Trong đó, mẫu *Sargassum* sp. 2 (RB 03 LS) có hàm lượng lipit cao nhất.

3.1.2.2. Kết quả khảo sát hàm lượng các axit béo

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

Hàm lượng các axit béo của các mẫu rong Nâu được thể hiện trong Hình 3.2 (số liệu chi tiết tại Phụ lục 2).

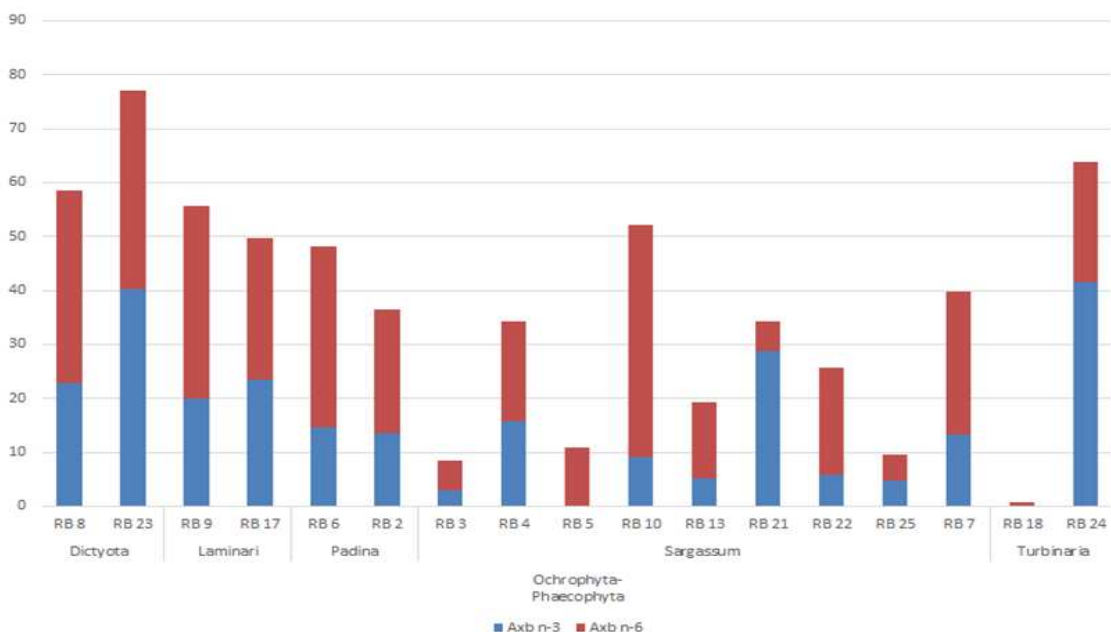


Hình 3.2. Hàm lượng axit béo trong các mẫu rong Nâu được khảo sát

Hàm lượng các axit béo không no (MUFA và PUFA): Trong khi hàm lượng MUFA được hình thành chủ yếu từ các axit béo C16 và C18 có một nối đôi

thì PUFA được hình thành chính từ các axit béo C20. Các axit béo nhóm PUFA này có hoạt tính tốt đối với sức khỏe, là dạng tiền chất cho nhiều hoạt chất sinh học khác trong cơ thể. Số liệu phân tích đã cho thấy hàm lượng MUFA trong các mẫu nghiên cứu đạt 1,87 - 51,32%, hàm lượng PUFA là 0,69 - 77,08%. Có tới 7 mẫu có hàm lượng PUFA đạt trên 50% tổng axit béo, đây là những con số rất có ý nghĩa trong việc nghiên cứu thành phần axit béo của Rong cỏ biển. Bởi các nghiên cứu trước đây chỉ cho thấy hàm lượng các axit béo PUFA trên 50% ở các loài động vật biển và vi sinh vật phân lập từ biển.

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



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

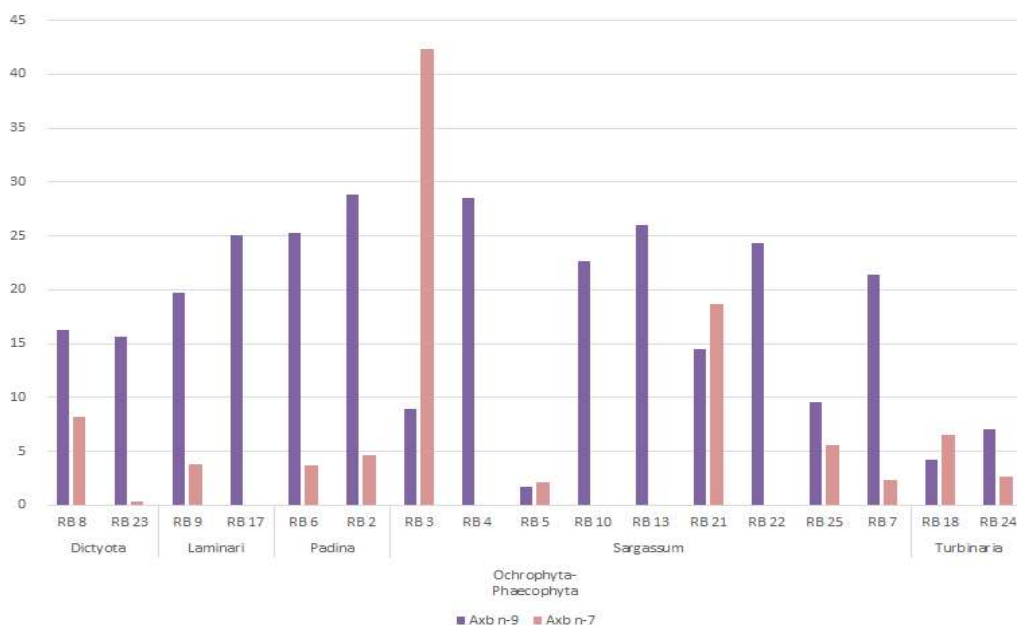
Trong đa số các mẫu Rong biển được nghiên cứu, hàm lượng n-6 cao hơn so với các axit béo n-3. Hàm lượng các n-6 chủ yếu do axit béo 18:2n-6/axit béo đặc trưng của nhóm thực vật và axit béo 20:4n-6 (AA) tạo thành. Đây là những tiền chất

quan trọng trong quá trình hình thành các dạng hormone có khả năng tác động lên hệ cơ phẳng, hệ bài tiết và hệ tuần hoàn trong cơ thể sống.

Trong các mẫu thuộc chi *Sargassum*, mẫu RB01 VM-RD *Sargassum* sp. chỉ có mặt axit béo n-6. Các mẫu còn lại có tổng hàm lượng axit béo n-3/n-6 dao động từ 8,5 đến 52,09% tổng axit béo. Ở hai mẫu thuộc chi *Turbinaria* có thành phần n-3/n-6 trái ngược nhau, mẫu RB 08 LS *Turbinaria turbinata* có tổng hàm lượng n-3 và n-6 rất cao, lên tới 63,86% còn ở mẫu *Turbinaria* sp. chỉ có 0,69% n-6, không có mặt các axit béo n-3.

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

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



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

Sự xuất hiện của các axit béo n-7 và n-9 trong thành phần lipid được đánh giá là rất quan trọng, bởi trong các nghiên cứu gần đây đang chỉ rõ ra vai trò của chúng ở một số quá trình sinh tổng hợp ở người. Chúng đóng vai trò như là các

hormone kìm hãm hoặc chuyển hóa các thành phần lipid xấu giúp con người cải thiện được những bệnh lý liên quan đến tim mạch, mỡ máu...

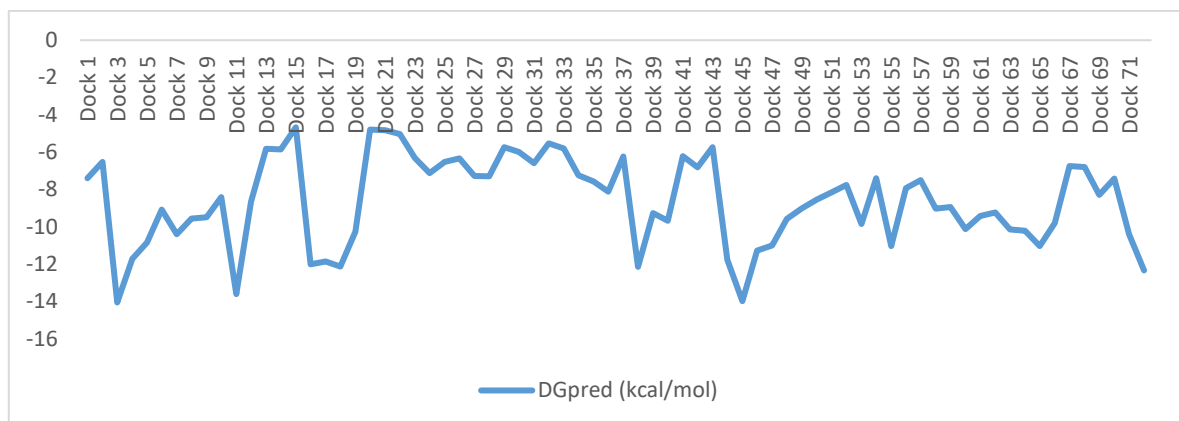
3.1.3. Nghiên cứu dự đoán khả năng ức chế enzyme tyrosinase của một số hợp chất phân lập từ rong Mơ

3.1.3.1. Kết quả chuẩn bị cấu trúc các hợp chất phân lập từ loài rong Mơ

Qua tổng hợp tài liệu, có 71 chất được tách chiết từ rong Mơ đã được các nhóm nghiên cứu và xác định cấu trúc, công thức và ký hiệu được biểu thị trong phụ lục 3. Công thức cấu tạo của các hợp chất được xây dựng trên phần mềm Chemdraw14 sau đó được chuyển sang dạng ba chiều bằng chem3D và tối ưu hóa năng lượng thông qua thuật toán MM2. Do bản chất của các hợp chất không phải là peptide, điện tích Gasteiger đã được bổ sung và sau đó gắn các hydrogens không phân cực. Việc xác định mạch chính của hợp chất được thực hiện tự động bởi phần mềm MGLTools. Các cấu trúc đã tối ưu năng lượng được chuyển sang dạng file pdbqt, là dạng file đầu vào cho docking phân tử. Có 9 loại nguyên tử xuất hiện trong cơ sở dữ liệu bao gồm: ['A', 'C', 'NA', 'OA', 'N', 'HD', 'SA', 'Cl', 'P'].

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

3.1.3.2. Kết quả mô phỏng lắp ghép phân tử và phân tích chỉ số được động học



Hình 3.5. Kết quả dự đoán năng lượng liên kết của các hợp chất với enzyme tyrosinase

Kết quả docking của 71 hợp chất với enzyme tyrosinase được trình bày trong Hình 3.5 (số liệu chi tiết tại Phụ lục 4). Theo thuật toán của AutoDock4, giá trị năng lượng tự do liên kết càng âm nhiều có nghĩa ái lực liên kết giữa phối tử và enzyme đích thụ thể càng mạnh. Từ bảng số liệu cho thấy chất chuẩn tropolone có điểm năng lượng liên kết với tyrosinase là -12,35 kcal/mol, do đó có thể coi đây là giá trị chuẩn

để so sánh, các hợp chất có điểm năng lượng tự do liên kết gần bằng hoặc âm nhiều hơn giá trị này có thể được giả thuyết là tiềm năng liên kết tốt với enzyme tyrosinase.

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

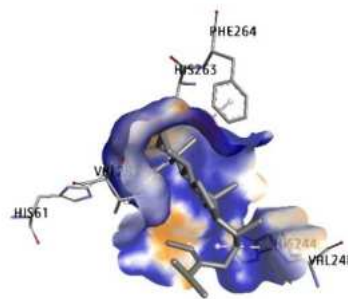
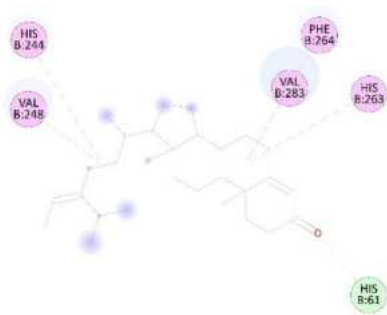
Phân tích tương tác tạo thành của ba hợp chất có ái lực liên kết mạnh nhất với đích sinh học mục tiêu, kết quả được trình bày trong bảng 3.5. Số liệu thu được cho thấy đa số các axit amin quan trọng hình thành nên vùng hoạt động của enzyme (His259, His263, Met280, Ser282, Ala286) có tham gia tạo liên kết với chất ức chế chuẩn tropolone.

Bảng 3.5. Kết quả mô phỏng docking phân tử các hợp chất tiềm năng

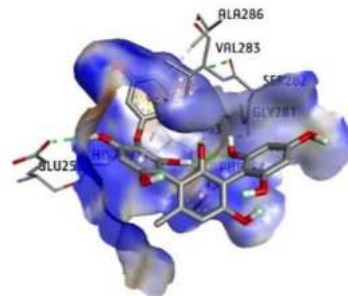
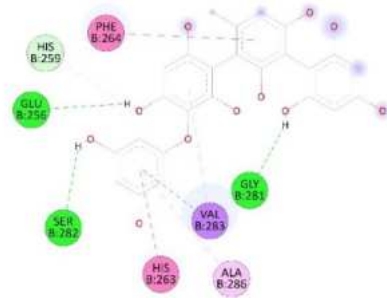
Hợp chất	Số lượng liên kết Hydro	Amino axit tham gia tạo tương tác Hydro	Amino axit tham gia tạo tương tác kỵ nước
Dock 3	0	-	His61, His244, Val248, His263, Phe264, Val283
Dock 11	3	Glu256, Gly281, Ser282	His259, His263, Phe264, Val283, Ala286
Dock 45	4	Asn260, Arg268, Met280, Val283	His263, Phe264, Pro284, Ala286
tropolone	2	Met280, Ser282	His263, Val283, Ala286

Hình ảnh tương tác không gian hai chiều và ba chiều của các hợp chất **3**, **11** và **45** được trình bày trong hình 3.6. Kết quả cho thấy, trong số ba hợp chất thể hiện ái lực liên kết mạnh với sEH, chỉ có hợp chất **11** và **45** có tiềm năng ức chế hoạt động của enzyme này thông qua các tương tác tạo thành trực tiếp với những amino axit quan trọng cấu thành nên vùng hoạt động của enzyme. Hợp chất **3** được quan sát không hình thành liên kết hydro với enzyme tyrosinase, các tương tác yếu tham gia vào tương tác giữa phối tử và enzyme gồm có His61, His244, Val248, His263, Phe264, Val283. Do đó, có thể định hướng rằng hợp chất **3** không phải là chất ức chế tiềm năng với đích thụ thể nghiên cứu.

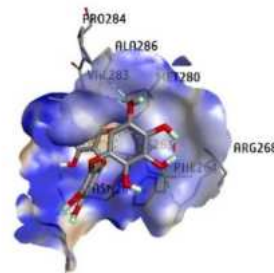
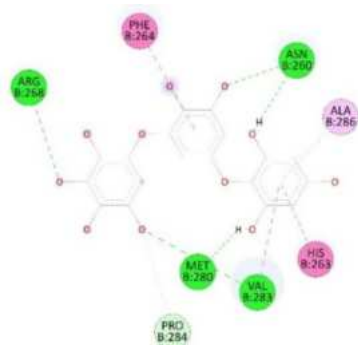
Phân tích cấu hình liên kết của hợp chất **11** cho thấy tạo ba liên kết hydro với các amino axit Glu256, Gly281, Ser282 và tương tác với enzyme được hỗ trợ bởi các liên kết kỵ nước với His259, His263, Phe264, Val283, Ala286. Những amino axit hình thành liên kết với hợp chất **11** này có sự tương đồng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



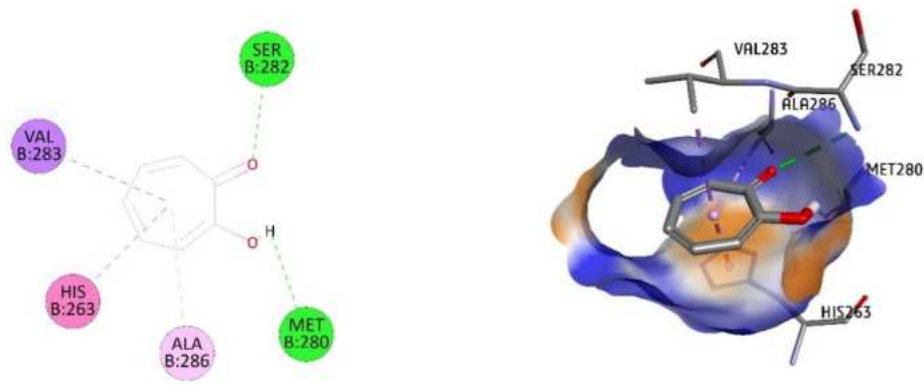
Dock 3



Dock 11














Dock 45



tropolone

Interactions

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

Hình 3.6. Cấu hình liên kết trong không gian hai chiều và ba chiều được dự đoán bởi phần mềm AutoDock4.2.6 của các hợp chất

Kết hợp dữ liệu từ bảng 3.5 và hình ảnh tương tác (Hình 3.6) đã chỉ ra hợp chất **45** gắn kết với đích thụ thể bằng việc hình thành bốn liên kết hydro với Asn260, Arg268, Met280 và Val283, trong đó, Met280 là một trong những axit amin cấu thành nên vùng chức năng của enzyme tyrosinase. Bên cạnh đó, các liên kết yếu hỗ trợ cho tương tác với các amino axit khác được quan sát gồm His263, Phe264, Pro284, Ala286. Như vậy, có thể giả thuyết rằng hợp chất **45** là chất ức chế tiềm năng của enzyme tyrosinase.

Bảng 3.6. Dự đoán độc tính của các chất ức chế tiềm năng

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

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

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

Các đặc tính giống thuốc của hai hợp chất ức chế tiềm năng **11** và **45** được sử dụng bộ quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski (Ro5) nhằm xác định hợp chất phù hợp cho các giai đoạn nghiên cứu phát triển thuốc tiếp theo. Bên cạnh đó, các hợp chất được đánh giá thêm về các đặc tính dược động học và dự đoán độc tính bằng cách sử dụng webserver Molinspiration và ProTox-II cheminformatic (Bảng 3.6).

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

Trong nghiên cứu ADMET, một trong những thách thức quan trọng nhất ảnh hưởng đến sinh khả dụng của thuốc là sự di chuyển qua hàng rào biểu mô ruột, điều này quyết định tốc độ và mức độ hấp thu thuốc của người. Theo phân tích giá trị HIA, hợp chất **11** và **45** có giá trị lần lượt là 0,9897 và 0,8692. Điều này cho thấy khả năng hấp thụ cao trong đường ruột, có thể nhận định hợp chất **11** có tiềm năng trong phát triển thuốc cao hơn so với hợp chất **45** nhờ vượt trội ở các chỉ số ADMET.

3.1.4. Lựa chọn rong nguyên liệu cho quy trình công nghệ

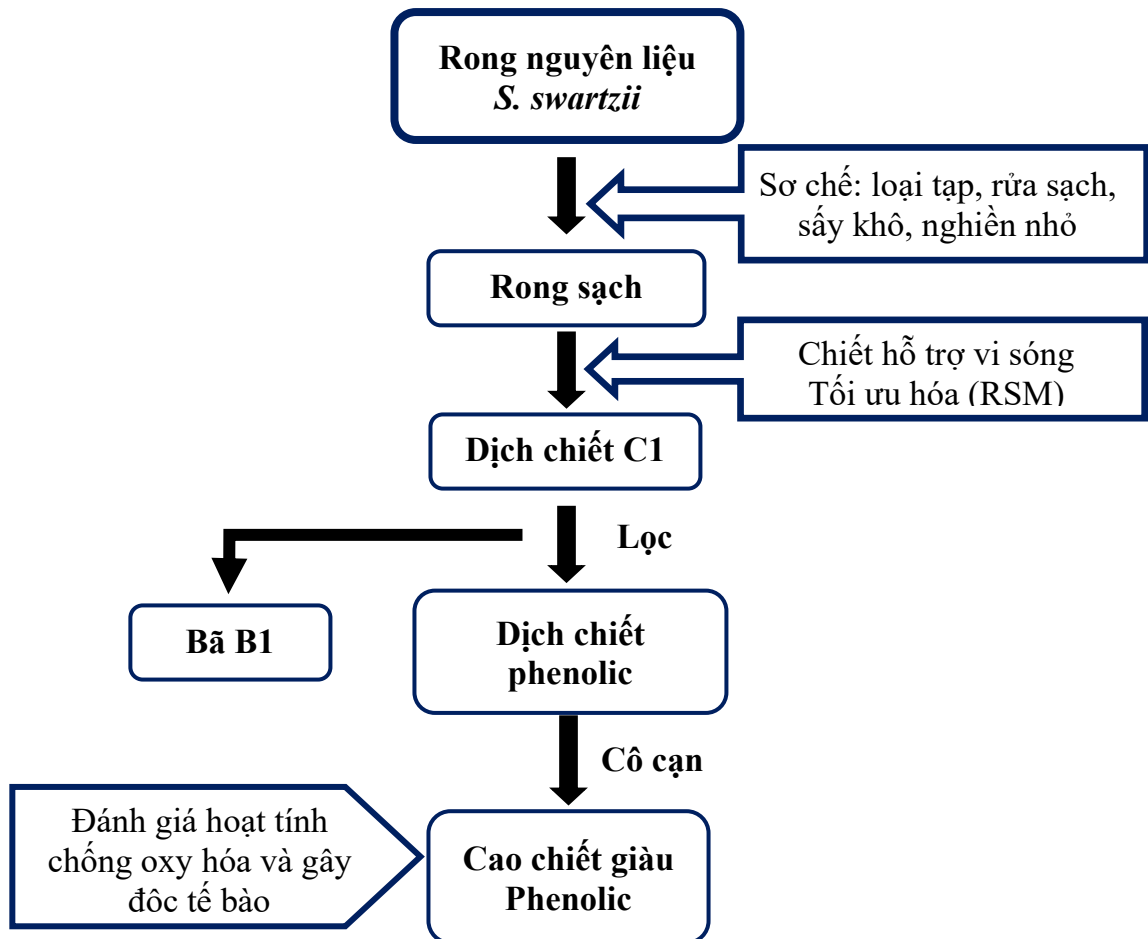
Qua kết quả nghiên cứu, khảo sát một số mẫu nguyên liệu rong Nâu, có thể nhận thấy: **(1)** Chi rong Mơ (*Sargassum*) thuộc ngành rong Nâu xuất hiện hầu hết tại các vùng biển Việt Nam, có hàm lượng alginate trung bình lên tới trên 30%, **(2)** Các mẫu rong Mơ có hàm lượng lipit tổng từ 0,07 tới 2,11%; đều có mặt các axit béo no, không no một nối đôi và đặc biệt là các axit béo không no đa nối đôi (PUFA); **(3)** Hợp chất số 11 (difucodiphloretol A) được phân lập từ chi rong Mơ có có tiềm năng trong phát triển thuốc ức chế enzyme tyrosinase.

Định hướng nghiên cứu tập trung vào việc chiết xuất alginate để tạo chế phẩm Canxi alginate, đồng thời hướng đến việc ứng dụng quy trình vào sản xuất ở quy mô công nghiệp (yêu cầu trữ lượng nguyên liệu lớn), do đó mẫu rong *S. swartzii* thuộc chi rong Mơ, ngành rong Nâu thu tại Cô Tô, Quảng Ninh (Quý II/2019) được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Kết quả nghiên cứu chiết xuất phenolic từ rong Mơ

3.2.1. Quy trình công nghệ chiết xuất phenolic từ rong Mơ

Quy trình chiết rong Mơ bằng dung môi etanol đã được nhiều nhóm nghiên cứu trong và ngoài nước công bố, do đó nghiên cứu này chỉ tập trung vào việc sử dụng kỹ thuật vi sóng và tối ưu hóa các điều kiện chiết xuất trên đối tượng rong Mơ nhằm nâng cao hiệu quả quá trình chiết xuất.



Hình 3.7. Sơ đồ chiết phenolic trong rong Mơ

Thuyết minh quy trình

Bước 1: Sơ chế nguyên liệu

Mẫu rong Mơ *S. swartzii* sau khi thu hoạch được làm sạch, loại bỏ rong lạ và sinh vật bám trên rong, rửa sạch bằng nước biển sau đó rửa sạch lại bằng nước ngọt, sấy khô, bảo quản bảo quản ở nhiệt độ 5 - 10 °C trước khi sử dụng

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

Rong Mơ sau sơ chế sạch nghiền nhỏ bằng máy nghiền chuyên dụng đến kích thước $< 0,1$ mm. Bổ sung etanol với tỷ lệ và nồng độ thích hợp sau đó tiến hành chiết xuất với sự hỗ trợ của vi sóng.

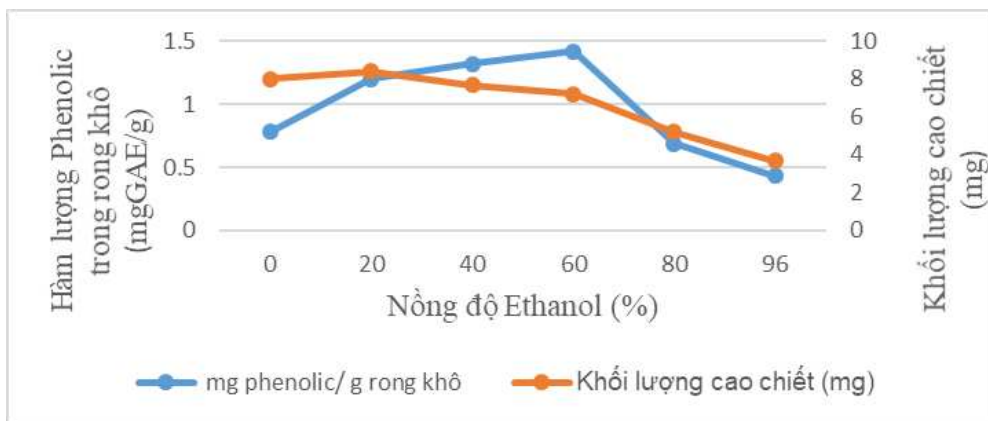
Bước 3: Lọc hỗn hợp sau chiết xuất thu được phần dịch lọc và phần bã rắn (B1). Dịch lọc thu được đem đuổi dung môi thu được phần cao rắn chứa các hợp chất có phân tử lượng nhỏ (phenolic) trong rong Mơ.

Xác định các yếu tố ảnh hưởng và tối ưu hóa quá trình chiết xuất theo hàm lượng phenolic trong dịch chiết và khối lượng cao chiết giàu phenolic thu được.

3.2.2. Kết quả nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết phenolic theo phương pháp chiết hỗ trợ vi sóng

3.2.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến quá trình chiết phenolic

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



Hình 3.8. Biểu đồ ảnh hưởng của nồng độ etanol đến quá trình chiết phenolic

Nhận xét: Từ biểu đồ Hình 3.8. cho thấy:

Về hàm lượng phenolic: Kết quả phân tích cho thấy nồng độ EtOH có ảnh hưởng tới hàm lượng phenolic thu được. Cụ thể hàm lượng phenolic tăng mạnh từ 0,78 mgGAE/g lên 1,42 mgGAE/g khi nồng độ dung môi tăng từ 0% - 60%. Chiết với dung môi nồng độ 60% thu được hàm lượng phenolic cao nhất 1,42 mgGAE/g. Nồng độ dung môi tiếp tục từ 60% - 96% nhưng hàm lượng phenolic giảm dần.

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

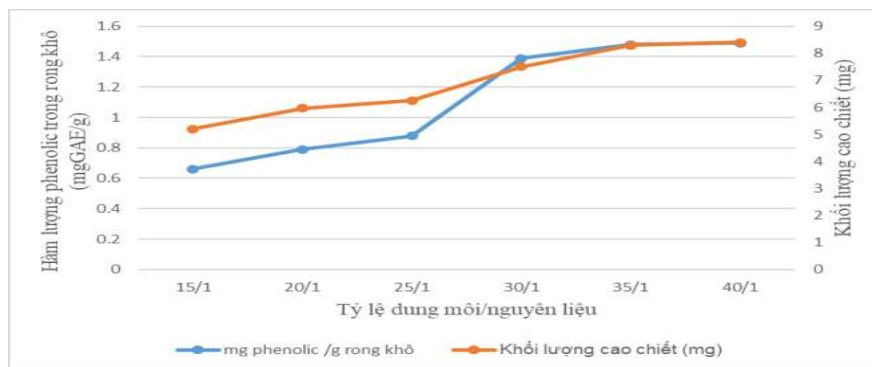
Có thể giải thích kết quả trên như sau:

Do hệ dung môi là một trong các yếu tố quan trọng để chiết tách polyphenol thực vật, việc lựa chọn dung môi sẽ ảnh hưởng đến cả thành phần và hàm lượng các hợp chất phenol chiết tách được. Vì vậy độ hòa tan của phenolic chịu ảnh hưởng lớn bởi độ phân cực của dung môi sử dụng. Trong rong Mơ, phenolic tồn tại trong màng tế bào thông qua liên kết cộng hóa trị với polysaccharide, protein. Do đó, khi chiết phenolic, các chất chiết đi kèm luôn lớn hơn phenolic rất nhiều. Vì vậy, khi khảo sát dung môi chiết một yếu tố quan trọng cần quan tâm là cặn chiết.

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

Kết luận: Chọn dung môi etanol 60% để chiết xuất phenolic. Dung môi etanol cũng đáp ứng tốt yêu cầu chiết xuất các chất hữu ích để sử dụng trong thực phẩm và mỹ phẩm.

3.2.2.2. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu đến quá trình chiết phenolic



Hình 3.9. Biểu đồ ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu đến quá trình chiết phenolic

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

Nhận xét:

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

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

Có thể giải thích kết quả trên như sau:

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

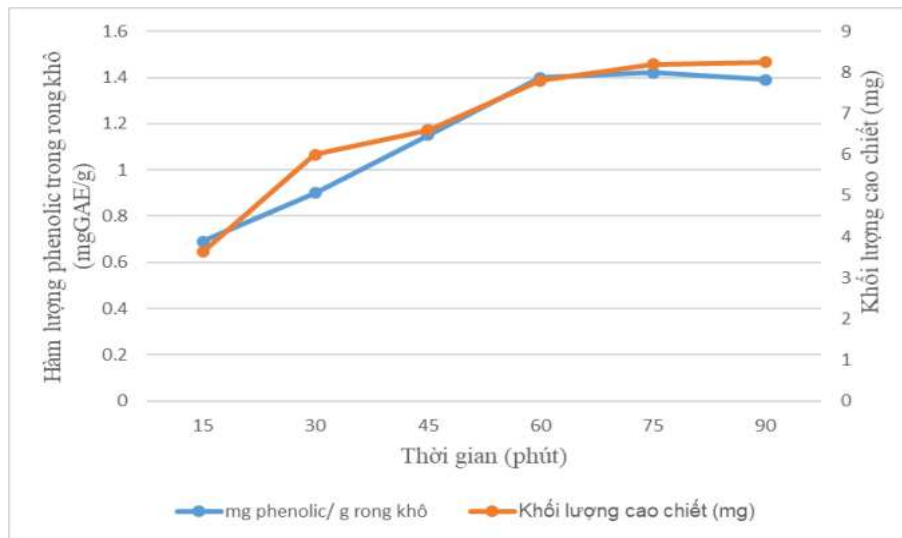
Từ tỉ lệ 35/1 - 40/1, tạo ra sự chênh lệch nồng độ lớn nhất, lượng phenolic dịch chuyển qua màng tế bào và thoát ra ngoài nhiều, vì vậy cho hàm lượng phenolic cao nhất. Khi tỉ lệ dung môi/nguyên liệu quá cao sẽ nhanh dẫn đến sự cân bằng pha. Trong dịch chiết còn có nhiều chất hoà tan khác. Do đó, lượng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

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

Kết luận: Chọn tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 35/1 để đảm bảo cân bằng giữa yếu tố hiệu suất và kinh tế.

3.2.2.3. Ảnh hưởng của thời gian vi sóng đến quá trình chiết phenolic

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



Hình 3.10. Biểu đồ ảnh hưởng của thời gian vi sóng đến quá trình chiết phenolic

Nhận xét:

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

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

Có thể giải thích kết quả trên như sau:

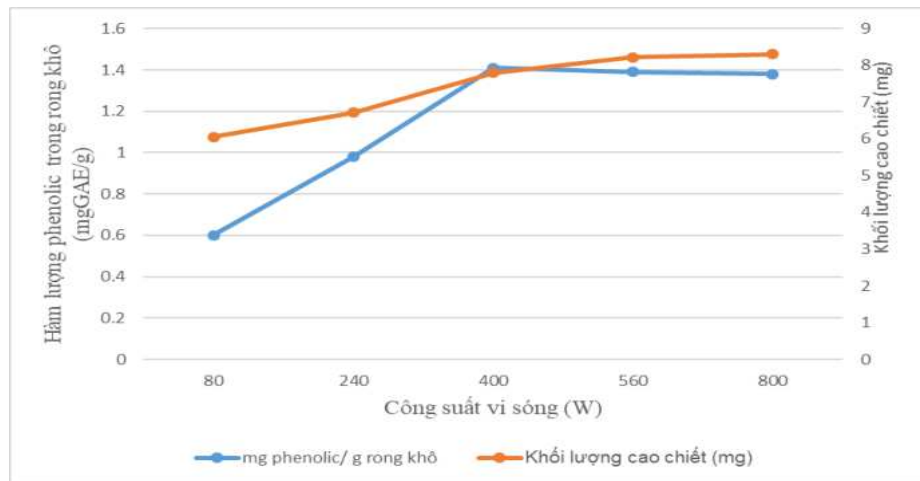
Các chất có phân tử nhỏ thường là hoạt chất hòa tan và khuếch tán vào môi trường nước trong thời gian đầu, sau đó mới là hỗn hợp phenol phân tử lớn. Do đó, khi thời gian chiết quá ngắn thì chưa chiết được hết phenolic. Lượng chất tan trong rong còn rất nhiều.

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

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

3.2.2.4. Ảnh hưởng của công suất vi sóng đến quá trình chiết phenolic

Tiến hành 5 mẫu thí nghiệm, mỗi mẫu lấy khoảng 5g rong đã xay nhỏ để nghiên cứu chiết rút phenolic ở trong lò vi sóng với công suất khác nhau lần lượt là: thấp (80W), trung bình thấp (240W), trung bình (400W), trung bình cao (560W), cao (800W), với tỉ lệ dung môi/nguyên liệu 35/1 (v/w), thời gian là 60 phút, nồng độ etanol là 60%. Tiến hành lọc thu dịch chiết để xác định hàm lượng phenolic, lấy khoảng 10 ml đi cô quay thu cặn chiết. Kết quả thu được thể hiện trong hình 3.11.



Hình 3.11. Biểu đồ ảnh hưởng của công suất vi sóng đến quá trình chiết phenolic

Nhận xét:

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

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

Có thể giải thích kết quả trên như sau:

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

Công suất lò vi sóng càng lớn (tăng đến mức 560W và 800W) thì dung môi nóng càng nhanh, dễ sôi và bay hơi. Tuy nhiên, nhiệt độ tăng cao sẽ xảy ra các phản ứng không mong muốn. Tốc độ biến tính và phân rã của thành tế bào rong lớn, do tác dụng của nhiệt độ làm đông tụ, chuyển góc của các lớp màng tế bào như glycoprotein, lipoprotein làm thay đổi cấu trúc tế bào. Phenolic dễ bị phân hủy bởi nhiệt độ nên khi nhiệt độ tăng cao thì hàm lượng phenolic càng giảm.

Kết luận: Chọn công suất chiết thích hợp là mức trung bình (400W).

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

Bảng 3.7. Các mức thí nghiệm của các biến công nghệ

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

Sau khi khảo sát từng yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thu nhận phenolic ở trên, em sử dụng mô hình tối ưu theo phương pháp Box-behnken cho 4 yếu tố công nghệ với các mức khảo sát được thể hiện như ở bảng 3.7.

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

Sử dụng phần mềm Design expert 7.0 để xây dựng ma trận kế hoạch thực nghiệm với 27 thí nghiệm theo mô hình của Box-Behnken (Bảng 3.8). Các hàm mục tiêu lần lượt là Y1 (mg GAE/g) Hàm lượng phenolic tổng và Y2 (mg) Khối lượng cao chiết tổng.

Bảng 3.8. Ma trận kế hoạch hóa thực nghiệm của quá trình chiết xuất

TT	Biến mã hóa				Hàm mục tiêu	
	A	B	C	D	Y1 (mg GAE/g)	Y2 (mg)
1	-1	-1	0	0	1,06	4,62
2	+1	-1	0	0	1,18	1,63
3	-1	+1	0	0	1,29	8,61
4	+1	+1	0	0	1,22	3,59
5	0	0	-1	-1	1,23	4,75
6	0	0	+1	-1	0,95	3,53
7	0	0	-1	+1	1,22	6,19
8	0	0	+1	+1	1,25	6,44
9	-1	0	0	-1	1,20	6,01
10	+1	0	0	-1	1,18	2,67
11	-1	0	0	+1	1,31	7,82
12	+1	0	0	+1	1,38	3,24
13	0	-1	-1	0	1,20	2,98
14	0	+1	-1	0	1,26	4,57
15	0	-1	+1	0	0,79	2,04
16	0	+1	+1	0	1,15	8,20
17	-1	0	-1	0	1,11	5,67
18	+1	0	-1	0	1,26	2,31
19	-1	0	+1	0	1,25	7,34
20	+1	0	+1	0	1,12	2,39
21	0	-1	0	-1	1,18	3,17
22	0	+1	0	-1	1,04	5,80
23	0	-1	0	+1	1,01	3,67

24	0	+1	0	+1	1,31	7,89
25	0	0	0	0	1,60	6,82
26	0	0	0	0	1,51	6,89
27	0	0	0	0	1,50	6,85

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

Bảng 3.9. Bảng kết quả phân tích ANOVA của 2 hàm mục tiêu

Nguồn	Y1 (mg GAE/g)		Y2 (mg)	
	F - Value	P - Value	F - Value	P - Value
Model	10,21	0,0001*	32,27	< 0,0001*
A	0,34	0,5724 ^{NS}	193,43	< 0,0001*
B	12,42	0,0042*	139,0	< 0,0001*
C	10,19	0,0077*	3,97	0,0697 ^{NS}
D	8,91	0,0114*	28,62	0,0002*
AB	1,86	0,1975 ^{NS}	4,03	0,0677 ^{NS}
AC	4,04	0,0674 ^{NS}	2,50	0,1399 ^{NS}
AD	0,25	0,6243 ^{NS}	1,52	0,2413 ^{NS}
BC	4,84	0,0492*	20,64	0,0007*
BD	9,98	0,0082*	2,50	0,1399 ^{NS}
CD	4,96	0,0459*	2,14	0,1696 ^{NS}
A ²	16,62	0,0015*	32,27	0,0001*
B ²	57,78	< 0,0001*	26,84	0,0002*
C ²	51,64	< 0,0001*	28,97	0,0002*
D ²	28,31	0,0002*	6,99	0,0214*
R ²	0,9225		0,9741	
Adj-R ²	0,8807		0,9439	
Adeq-Precision	12,637		19,905	

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

Bảng 3.9 biểu diễn các kết quả của ANOVA cho 2 mô hình hồi quy bậc hai (second order regression model) của phenolic chiết tách từ rong quạt với 4 tham số được phân tích. Giá trị p liên quan đến kiểm định F của 2 mô hình ở bảng 3.9 có giá trị nhỏ hơn 0,05 (< 0,0001) cho thấy độ tương thích của phương trình hồi quy với thực nghiệm từ đó cho thấy mô hình xây dựng là có ý nghĩa. Trong trường hợp này, các yếu

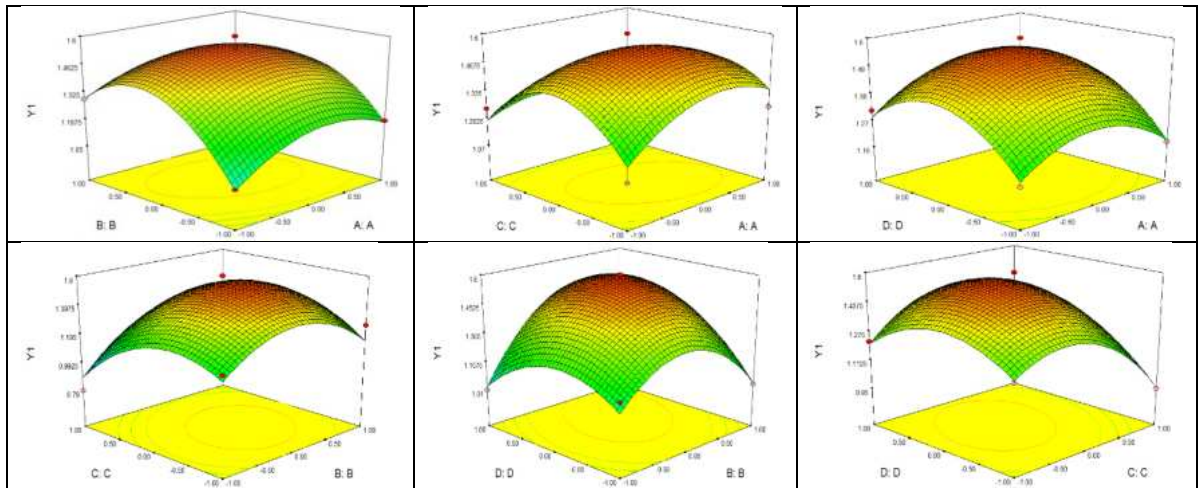
tổ A, B, C, D, AD, BC, B² đều có nghĩa ($p < 0,05$). Hệ số xác định R² của mô hình 1 cho biết 92,25% sự biến đổi của hàm lượng phenolic thu được là do ảnh hưởng của các biến độc lập như thời gian chiết, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, nồng độ dung môi, công suất vi sóng và ảnh hưởng giữa các biến thời gian với nồng độ etanol; tỉ lệ dung môi/nguyên liệu với công suất lò vi sóng, có 7,73% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được gây ra (sai số ngẫu nhiên). Tương tự, với mô hình 2 hệ số R² cho biết 97,41% sự biến đổi của hàm lượng phenolic thu được là do ảnh hưởng của các biến độc lập và ảnh hưởng giữa các biến thời gian với nồng độ etanol; tỉ lệ dung môi/nguyên liệu với công suất lò vi sóng, chỉ có 2,59% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được gây ra (sai số ngẫu nhiên). Giá trị R² của mô hình 1 bằng 0,9225 và mô hình 2 là 0,9741 cho thấy mô hình có tính hội tụ rất cao. Hệ số tương quan R² càng gần giá trị 1 thì sai số của thí nghiệm càng nhỏ và tính tương hợp của mô hình càng cao.

Bảng 3.10. Bảng kết quả các hàm mục tiêu Y1, Y2

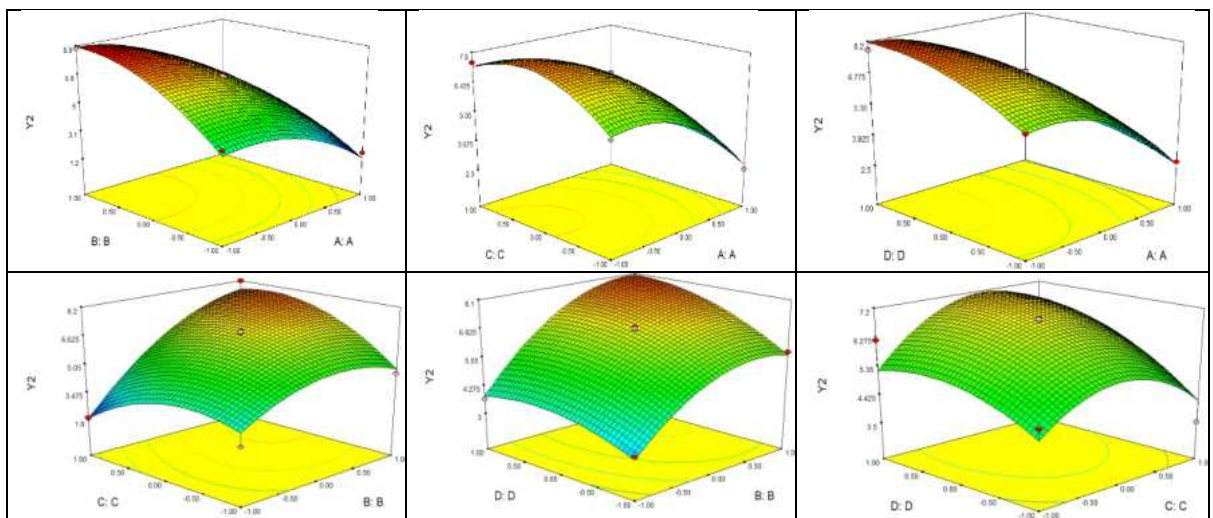
Hàm mục tiêu	Mô tả toán học
Y1	$Y1 = 1,54 + 0,071B - 0,064C + 0,06D + 0,075BC + 0,11BD + 0,077CD - 0,12A^2 - 0,23B^2 - 0,22C^2 - 0,16D^2$
Y2	$Y2 = 6,85 - 2,02A + 1,71B + 0,78D + 1,14BC - 1,24A^2 - 1,13B^2 - 1,17C^2 - 0,58D^2$

Phương trình hồi quy mô tả mô tả ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ ảnh hưởng đến hàm lượng phenolic tổng và khối lượng cao chiết được xác định sau khi loại bỏ các yếu tố không có ý nghĩa ($p > 0,05$) trong bảng phân tích ANOVA. Phương trình hồi quy của 2 hàm mục tiêu được thể hiện ở bảng 3.10.

Dựa trên mô hình đa thức bậc hai, dữ liệu thử nghiệm được phân tích bằng phần mềm Design Expert 7.0. Ảnh hưởng tương tác đôi của các cặp yếu tố công nghệ tác động lên hàm mục tiêu Y1 và Y2 được thể hiện thông qua các bề mặt đáp ứng như hình 3.12 và hình 3.13. Trong đó Các trục X và Y của bề mặt đáp ứng đại diện cho hai yếu tố tương tác, lần lượt là: nồng độ dung môi với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu; nồng độ dung môi với thời gian chiết xuất; nồng độ dung môi với công suất vi sóng; tỉ lệ dung môi/nguyên liệu với thời gian chiết; tỉ lệ dung môi/nguyên liệu với công suất vi sóng; thời gian vi sóng với công suất vi sóng. Các trục Z đại diện cho hàm mục tiêu (hàm lượng phenolic; khối lượng cao chiết thu được).



Hình 3.12. Mô hình bề mặt đáp ứng của hàm mục tiêu Y1



Hình 3.13. Mô hình bề mặt đáp ứng của hàm mục tiêu Y2

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

3.2.3.2. Tối ưu hóa hàm mục tiêu

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

Bảng 3.11. Giá trị biến mã hóa và biến thực tại điều kiện tối ưu

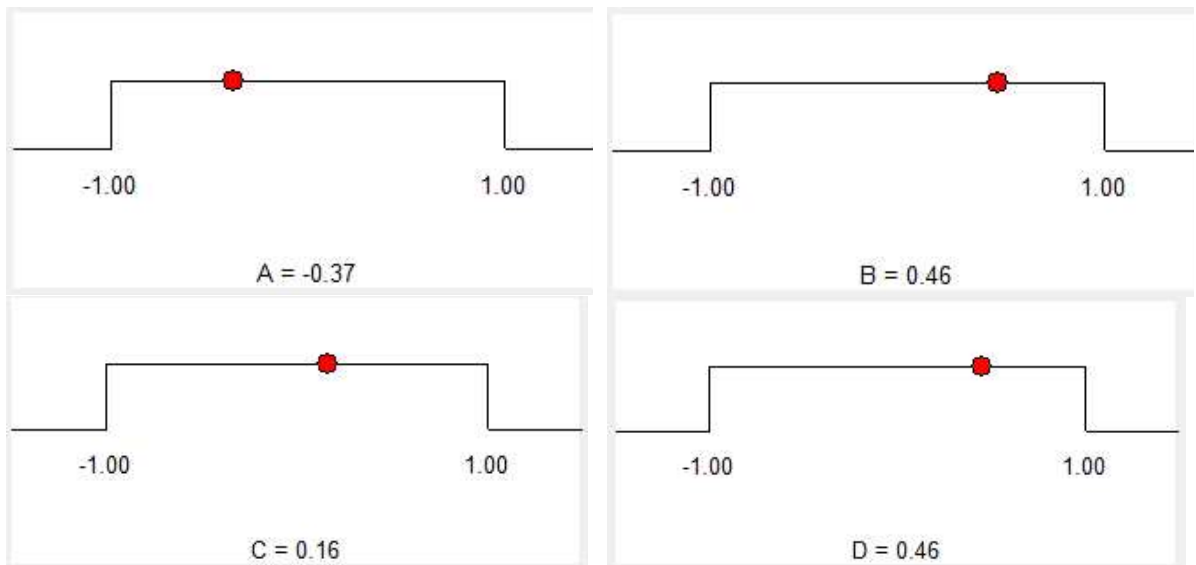
Biến mã hóa				Biến thực			
A	B	C	D	Nồng độ etanol (%)	Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (v/w)	Thời gian (phút)	Công suất vi sóng (W)
-0,37	0,46	0,16	0,46	54,5	34,6	64,8	473,6

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

Tiến hành thực hiện lại 3 thí nghiệm tại điều kiện tối ưu vừa tìm được. Ta thu được các giá trị thực nghiệm của hàm mục tiêu như ở bảng 3.12.

Bảng 3.12. Giá trị các hàm mục tiêu tại điều kiện tối ưu

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





Hình 3.14. Điều kiện tối ưu và kết quả hàm mục tiêu

Kết quả bảng 3.12 và hình 3.14 cho thấy lượng phenolic tối ưu của dịch chiết được dự đoán là 1,52 mgGAE/g, khối lượng cao chiết tối ưu dự đoán là 8,6 mg. Thông số tối ưu của quá trình chiết được dự đoán là: Nồng độ etanol 54,5%; tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu là 34,6; thời gian chiết 64,28 phút và công suất máy vi sóng là 473,6W. Thực nghiệm chiết xuất ở điều kiện nồng độ etanol 55%, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu = 35; thời gian chiết 65 phút và công suất lò vi sóng là 475W; Kết quả cho thấy: Hàm lượng phlorotannin thu được là $1,50 \pm 0,12$ mgGAE/g; khối lượng cao chiết là $8,52 \pm 0,11$ mg, chênh lệch không đáng kể so với dự đoán. Như vậy, thực nghiệm cho thấy kết quả thực nghiệm hoàn toàn phù hợp với những phân tích dự đoán từ phần mềm Design expert 7.0.

3.2.4. Đánh giá hoạt chất cao chiết phenolic

02 mẫu cao chiết phenolic (bằng phương pháp chiết vi sóng và siêu âm) đã được đánh giá hoạt tính sinh học bao gồm:

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

Bảng 3.13. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của mẫu cao chiết phenolic

TT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ ức chế 50% tế bào (IC ₅₀ , µg/mL)		
		MCF-7	HeLa	PC3
1	Paclitaxel	0,38	0,55	0,34
2	Mẫu siêu âm	12,80	27,83	57,40
3	Mẫu vi sóng	12,78	42,68	67,25

Bảng 3.13 cho thấy, 02 mẫu thử nghiệm đều có khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư MCF-7, HeLa và PC3 với giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng 12,78 đến 67,25 µg/ml. Tuy nhiên, hoạt tính của các mẫu thử nghiệm đều thấp hơn nhiều so với chất đối chứng Paclitaxel. Trong số 2 mẫu thử nghiệm, cao chiết rong có siêu

âm cho thấy hoạt tính ức chế 2 dòng tế bào HeLa và PC3 tốt hơn mẫu rong được hỗ trợ vi sóng do có IC₅₀ thấp hơn, cụ thể: tế bào HeLa với 27,83 µg/ml (siêu âm) thấp hơn 42,68 µg/ml (vi sóng); tế bào PC3 cũng tương tự 57,40 µg/ml (siêu âm) thấp hơn 67,25 µg/ml (vi sóng). Đối với dòng tế bào ung thư vú MCF-7, 2 mẫu có hoạt tính tương đương nhau.

Bảng 3.14. Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của mẫu cao chiết phenolic

TT	Mẫu	SC ₅₀ (µg/mL)
1	Chứng (+) [ascorbic axit]	12,6
2	Chứng (-) [DPPH/EtOH+ DMSO]	-
3	Mẫu vi sóng	683
4	Mẫu siêu âm	590

Bảng 3.14. cho thấy, hoạt tính chống oxy hóa của mẫu thử nghiệm với khả năng trung hòa 50% gốc tự do DPPH (SC₅₀) trong khoảng 590 µg/ml đến 683 µg/ml. So với mẫu kiểm chứng dương (ascorbic axit) thì các giá trị này đều lớn hơn (kiểm chứng dương là 12,6 µg/ml) cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của mẫu thử nghiệm kém hơn axit ascorbic. Giá trị SC₅₀ của mẫu siêu âm xác định được là 590 µg/ml thấp hơn (đồng nghĩa hoạt tính cao hơn) so với mẫu vi sóng (683 µg/ml).

3.3. Nghiên cứu quy trình chiết xuất fucoidan từ bã rong

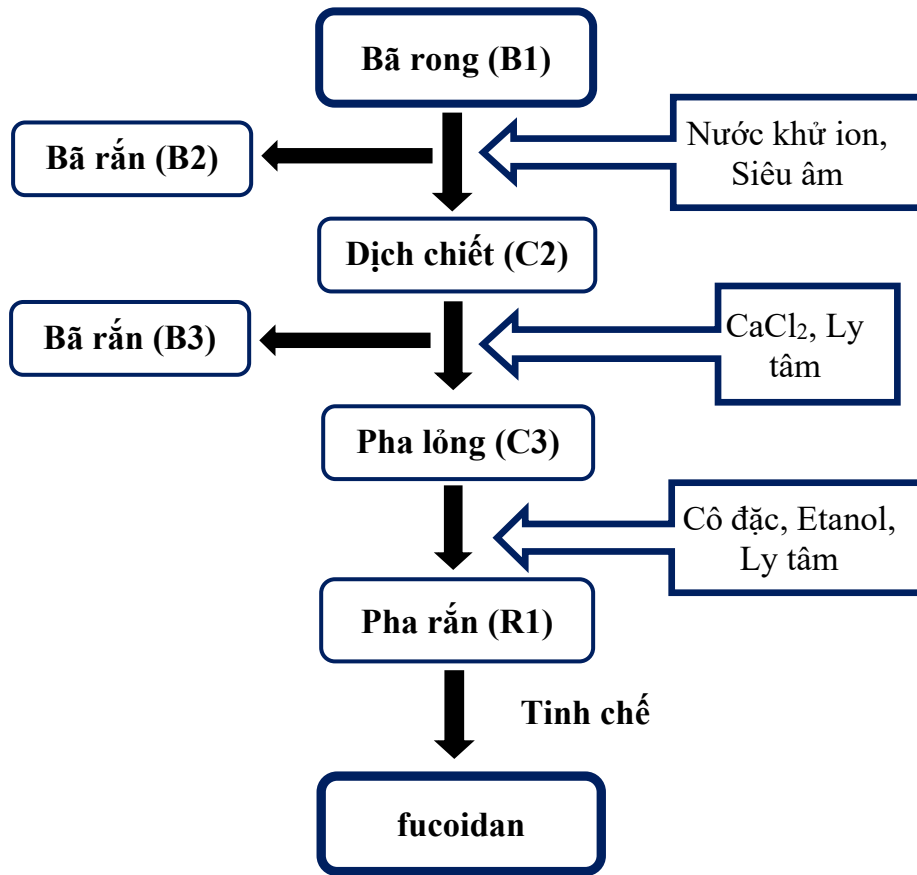
3.3.1. Quy trình công nghệ chiết xuất fucoidan từ bã rong

Tiến hành xác định một số thành phần hóa học của rong Mơ và bã thải rong Mơ sau khi chiết phenolic để đánh giá chất lượng của bã thải rong Mơ.

Bảng 3.15. Thành phần hóa học của rong Mơ và bã rong Mơ sau chiết phenolic

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

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



Hình 3.15. Sơ đồ chiết fucoidan từ bã rong Mơ

Thuyết minh quy trình

Phần bã rắn B1 (thu được sau khi chiết phenolic) sẽ được xử lý để chiết thu hồi fucoidan.

Bước 1: Hỗn hợp chất rắn B1 được bổ sung nước khử ion theo tỉ lệ xác định, khuấy đều sau đó siêu âm ở các giá trị công suất, thời gian và nhiệt độ khác nhau, lọc thu dung dịch, thu được dịch lọc C2 và phần chất rắn B2.

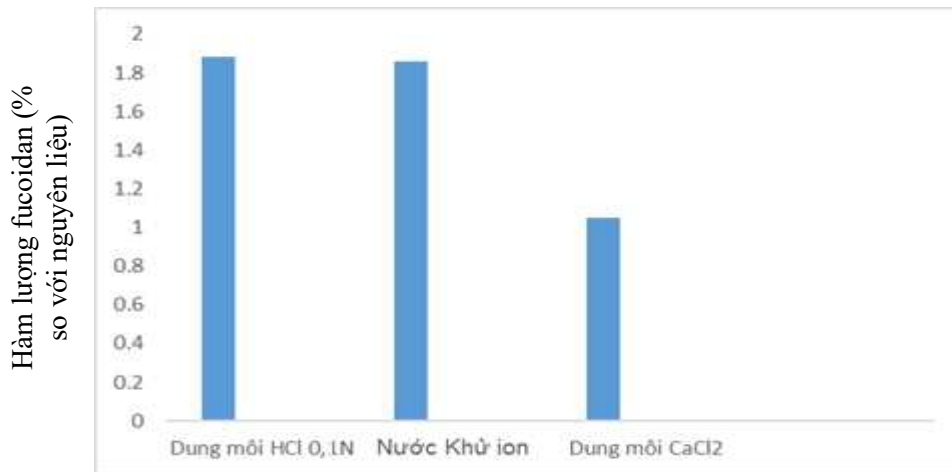
Bước 2: Phần dịch lọc C2 được bổ sung CaCl₂, ly tâm được phần chất rắn B3 và pha lỏng C3.

Bước 3: Phần chất lỏng C3 được cô cạn dưới áp suất giảm. Bổ sung etanol 96⁰ theo tỉ lệ xác định, ly tâm ở tốc độ cao thu được Pha rắn R1. Phần chất rắn này được tinh chế để thu nhận fucoidan.

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

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

Tiến hành thí nghiệm khảo sát với: Dung môi HCl 0,1N (pH 2-3); dung môi là nước khử ion và dung môi CaCl₂ (0,55 kg CaCl₂/20 lít).



Hình 3.16. Ảnh hưởng của loại dung môi đến hàm lượng fucoidan của dịch chiết

Kết quả cho thấy: Chiết xuất bằng các dung môi khác nhau cho hàm lượng fucoidan thu được khác nhau. Cụ thể, nếu chiết xuất fucoidan từ rong bằng HCl 0,1N thì cho hiệu suất cao nhất ($1,88 \pm 0,06\%$ fucoidan so với nguyên liệu), sau đó là nước khử ion ($1,85 \pm 0,05\%$ fucoidan) và cuối cùng là dung môi CaCl_2 ($1,06 \pm 0,07\%$ fucoidan). Thực nghiệm cũng cho thấy khi chiết tách bằng môi CaCl_2 thì thu được dịch chiết tách trong và dễ lọc, để làm sạch, dịch chiết tách phần lớn là fucoidan, còn axit alginic của nguyên liệu đã chuyển thành Canxi alginate kết tủa. Tuy nhiên khi alginate bị kết tủa trong màng tế bào làm ngăn cản quá trình khuếch tán fucoidan. Chính vì vậy, hàm lượng fucoidan thu được không cao, đồng nghĩa với hiệu suất chiết tách fucoidan của dung môi CaCl_2 sẽ thấp.

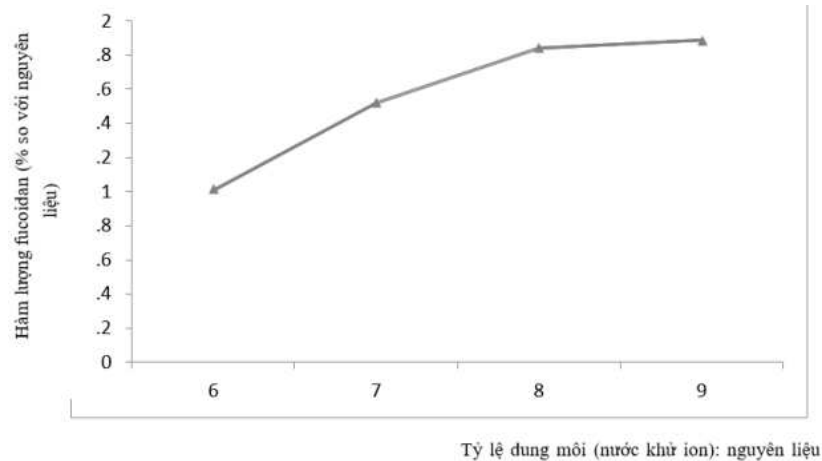
Kết quả thực nghiệm cho thấy dung môi HCl 0,1N và nước khử ion cho hàm lượng fucoidan của dịch chiết tách lệch nhau không nhiều, trong khi đó nước khử ion dễ sản xuất, không độc hại, chi phí thấp.

Kết luận: Chọn nước khử ion làm dung môi để chiết tách fucoidan từ bã rong bằng phương pháp siêu âm.

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

Việc tìm ra tỷ lệ hỗn hợp dung môi là rất cần thiết vì lượng hỗn hợp dung môi sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả chiết tách các chất trong nguyên liệu. Kết quả thu được sau khi khảo sát các tỷ lệ dung môi/nguyên liệu ở các tỷ lệ khác được trình bày ở Hình 3.16. Tỷ lệ dung môi nước khử ion/nguyên liệu càng lớn thì hiệu quả chiết tách càng tăng. Có thể thấy với tỷ lệ dung môi tỷ lệ dung môi (nước khử ion)/ nguyên liệu là 6/1 (ml/g) thì hàm lượng đạt hiệu quả thấp nhất là $1,01 \pm 0,09\%$

fucoidan so với nguyên liệu. Ở tỷ lệ dung môi nước khử ion: nguyên liệu là 7/1 (ml/g) thì hàm lượng có sự tăng lên rõ rệt đạt hiệu quả tương đối cao là $1,52 \pm 0,07\%$ fucoidan so với nguyên liệu. Hiệu quả cao nhất ở tỷ lệ nước khử ion/ nguyên liệu là 8/1 (ml/g) và 9/1 (ml/g) tương ứng là $1,84 \pm 0,06\%$ và $1,89 \pm 0,05\%$ fucoidan so với nguyên liệu. Ở 2 tỷ lệ này cho kết quả thu nhận fucoidan không có nhiều biệt.

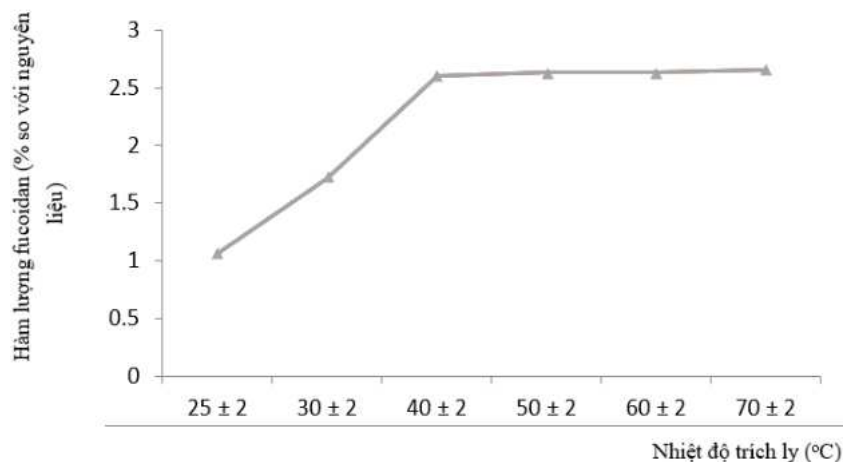


Hình 3.17. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu đến hàm lượng fucoidan

Kết luận: Chọn tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 8/1 (ml/g) để chiết xuất fucoidan từ bã rong Mơ bằng sóng siêu âm là phù hợp, giúp đảm bảo hiệu suất quy trình cũng như tối ưu hiệu quả kinh tế (giảm chi phí nguyên liệu, năng lượng...).

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

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết tách fucoidan ở các mức 25, 30, 40, 50, 60 và 70°C. Kết quả được thể hiện ở hình 3.18.



Hình 3.18. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tách đến hàm lượng fucoidan

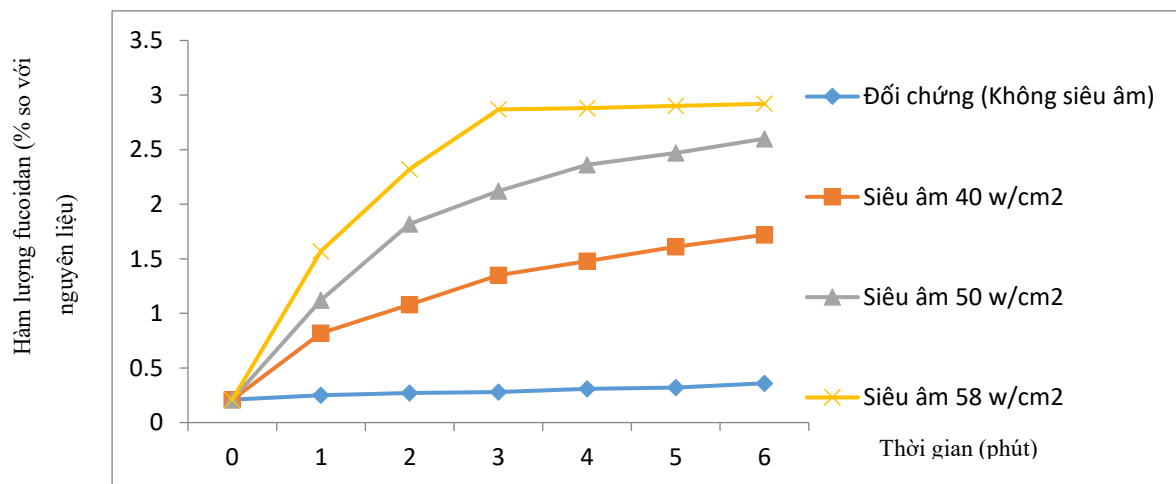
Kết quả phân tích cho thấy khi nhiệt độ tăng, hàm lượng fucoidan thu được ở dịch chiết tăng. Ở các nhiệt độ khảo sát cho hàm lượng fucoidan thu được lần lượt là:

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

Kết luận: Nhiệt độ 40°C là thích hợp cho chiết tách fucoidan từ bã rong bằng sóng siêu âm.

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

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



Hình 3.19. Ảnh hưởng của thời gian và cường độ sóng siêu âm đến hàm lượng fucoidan

Kết quả trình bày ở Hình 3.19. cho thấy:

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

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

+ Cường độ 40 w/cm², fucoidan tăng lần lượt tương ứng là: 0,21 ± 0,04%; 0,82 ± 0,05%; 1,08 ± 0,06%; 1,35 ± 0,07%; 1,48 ± 0,04%; 1,61 ± 0,05% và 1,72 ± 0,06% fucoidan trong dịch chiết tách so với nguyên liệu.

+ Cường độ 50 w/cm², fucoidan tăng lần lượt tương ứng là: 0,21 ± 0,04%; 1,12 ± 0,06%; 1,82 ± 0,04%; 2,12 ± 0,05%; 2,36 ± 0,04%; 2,47 ± 0,07% và 2,60 ± 0,04% fucoidan trong dịch chiết tách so với nguyên liệu .

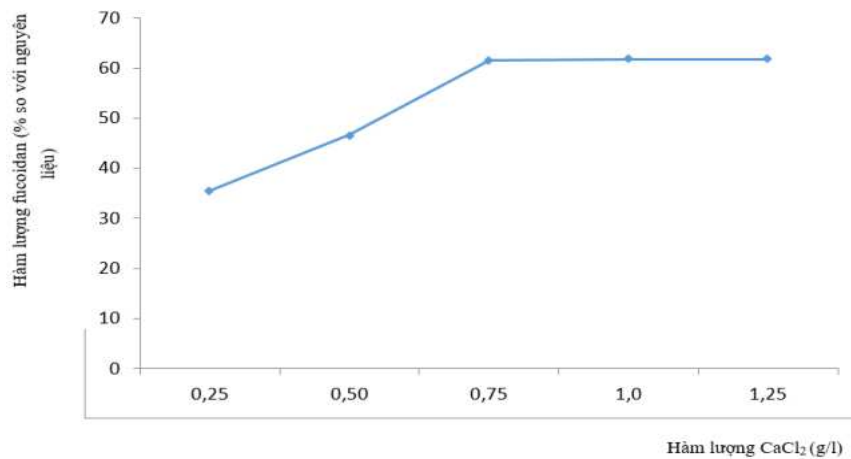
+ Cường độ 58 w/cm², thời gian siêu âm 0, 1, 2 và 3 phút, siêu âm cho fucoidan tăng tương ứng là 0,21 ± 0,04%; 1,57 ± 0,05%; 2,32 ± 0,05% và 2,87 ± 0,04% fucoidan, sau 4, 5 và 6 phút siêu âm chiết tách cho thấy fucoidan vẫn tăng, nhưng tăng không đáng kể, tương ứng là 2,88 ± 0,05%; 2,90 ± 0,03% và 2,92 ± 0,06% fucoidan trong dịch chiết tách so với nguyên liệu.

Phân tích các kết quả cho thấy: Khi cường độ và thời gian siêu âm tăng thì khả năng chiết tách fucoidan tăng cao (fucoidan ở dịch chiết tách không sử dụng sóng siêu âm là thấp nhất). Kết quả ở cùng thời gian chiết tách cho thấy cường độ siêu âm là 58 w/cm² đạt hiệu suất chiết fucoidan cao nhất. Cùng thời gian 3 phút ở cường độ siêu âm 0, 40, 50 và 58 w/cm² cho kết quả chiết là 0,28 ± 0,06%; 2,12 ± 0,05% và 2,87 ± 0,04% fucoidan. Có thể giải thích là do cường độ siêu âm càng cao sẽ càng tăng hiện tượng sủi bọt tạo lực phá vỡ cao, làm tăng tốc độ truyền khối của chất chiết tách, tạo sự khuấy trộn giúp cho khuếch tán chất bên trong nguyên liệu ra ngoài dễ dàng hơn. Tuy nhiên, kéo dài thời gian chiết cũng làm tăng các tạp chất hòa tan vào dung môi chiết tách.

Kết luận: Cường độ siêu âm 58 w/cm², thời gian 3 phút là phù hợp nhất để chiết tách fucoidan từ bã rong.

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

Dịch chiết tách fucoidan còn có một lượng axit alginic. Vì vậy, để làm sạch fucoidan ở đây tiến hành khảo sát hàm lượng CaCl₂ tủa loại bỏ axit alginic ra khỏi dịch chiết tách. Thực nghiệm khảo sát ở các hàm lượng 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 và 1,25g CaCl₂/lít dịch chiết fucoidan. Kết quả được thể hiện qua Hình 3.20.



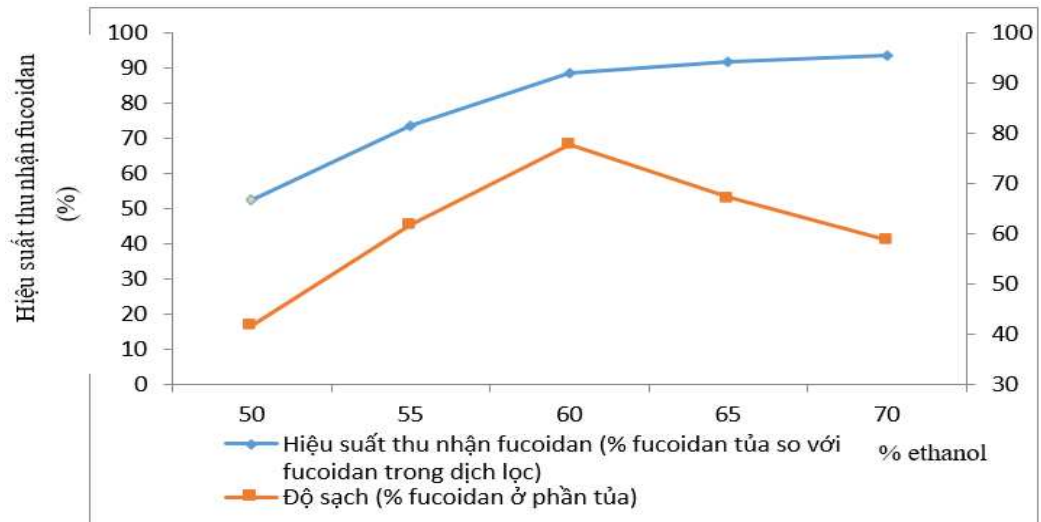
Hình 3.20. Ảnh hưởng của hàm lượng CaCl₂ tủa axit alginic trong dịch chiết tách đến độ sạch fucoidan thu nhận được

Kết quả ở Hình 3.20 cho thấy hàm lượng CaCl₂ càng cao thì cho fucoidan thu được có độ sạch tăng. Ở nồng độ 0,25; 0,5 và 0,75g CaCl₂/lít dịch chiết tách cho kết quả lần lượt là 35,6 ± 2,3%; 46,7 ± 3,5% và 61,6 ± 2,7% fucoidan của chất khô hòa tan. Ở nồng độ 1,00 và 1,25g CaCl₂/lít dịch chiết tách, hàm lượng fucoidan tăng không đáng kể, lần lượt là 61,8 ± 3,8% và 61,7 ± 4,1% fucoidan của chất khô hòa tan thu được. Điều này cho thấy ở hàm lượng 0,75 g CaCl₂/lít dịch chiết tách đã kết tủa axit alginic trong dịch chiết tách được loại ra là lớn nhất.

Kết luận: Chọn hàm lượng CaCl₂ để tủa axit alginic trong dịch chiết tách là 0,75 g CaCl₂/lít dịch chiết tách.

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

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



Hình 3.21. Ảnh hưởng của nồng độ etanol đến độ sạch và hiệu suất thu nhận fucoidan

Kết quả ở Hình 3.21 cho thấy nồng độ dung môi càng cao thì hiệu suất thu nhận fucoidan ở phần tủa càng lớn, nồng độ etanol tăng từ 50; 55; 60; 65 và 70% cho hiệu suất thu nhận fucoidan (% fucoidan tủa so với fucoidan trong dịch lọc) tăng tương ứng lần lượt là: $52,7 \pm 3,4\%$; $73,7 \pm 2,8\%$; $88,7 \pm 1,7\%$; $91,7 \pm 2,9\%$ và $93,8 \pm 3,1\%$ fucoidan tủa so với fucoidan trong dịch lọc. Trong khi độ sạch ở phần tủa tăng từ nồng độ 60; 65 và 70% etanol tương ứng theo thứ tự là $41,8 \pm 4,8\%$; $61,8 \pm 3,5\%$ và $77,8 \pm 2,7\%$ fucoidan ở phần tủa, khi nồng độ etanol tiếp tục tăng từ 60 lên 65 và 70% etanol thì độ sạch giảm dần tương ứng là $77,8 \pm 2,7\%$; $67,2 \pm 4,1\%$ và $58,8 \pm 3,8\%$ fucoidan ở phần tủa, cũng cho thấy hiệu suất thu nhận fucoidan ở nồng độ 60% etanol so với ở nồng độ 65 và 70% etanol tăng không đáng kể.

Kết luận: Chọn nồng độ 60% etanol để thu hồi fucoidan từ dịch lọc.

3.4. Kết quả nghiên cứu chiết xuất alginate

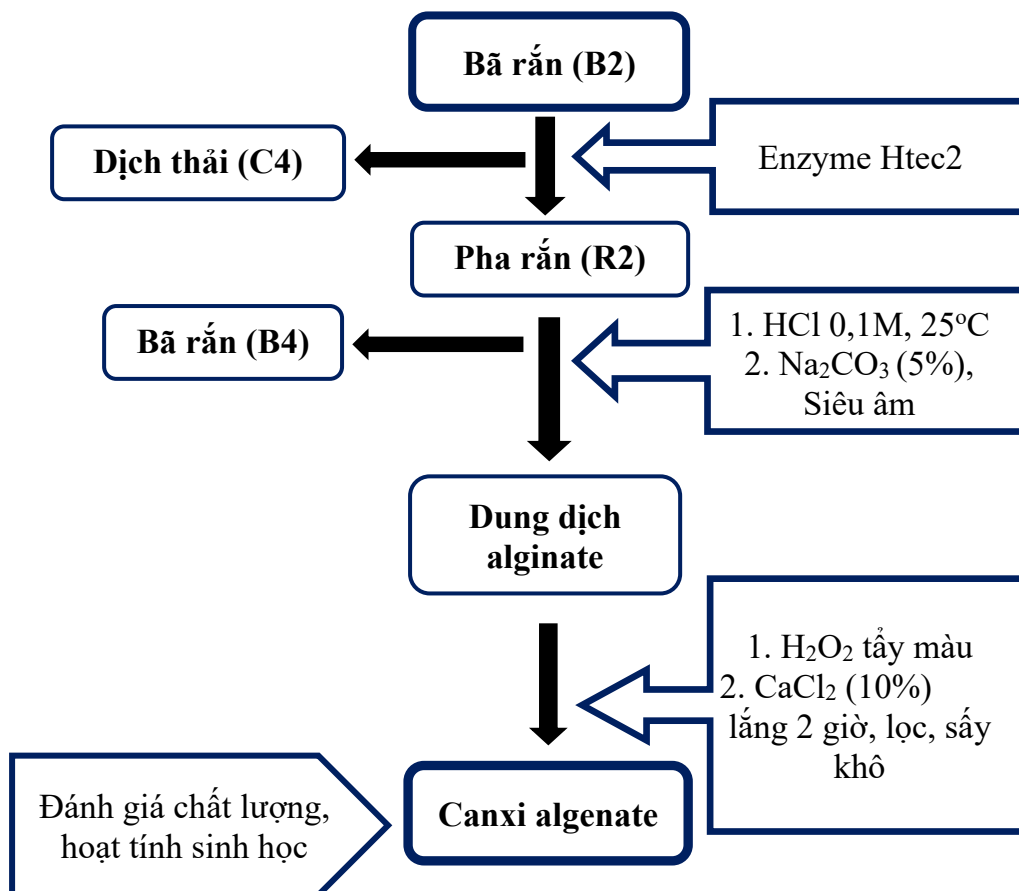
3.4.1. Quy trình công nghệ chiết xuất alginate

Sau khi chiết fucoidan, hàm lượng alginate trong bã rong giảm không đáng kể, vì vậy có thể sử dụng bã rong này để chiết lấy alginate.

Bảng 3.16. Thành phần hóa học của rong Mơ và bã thải rong Mơ sau chiết fucoidan

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

Nguyên liệu bã thải rong sau chiết fucoidan đã được loại bỏ fucoxanthin, lipid, phlorotanin, chất màu, fucoidan, một số ion kim loại... Vì vậy, màng cellulose của nguyên liệu đã bị bào mòn và các liên kết màng tế bào chứa alginate cũng như tế bào bên ngoài rong bị phá vỡ. Trên cơ sở số liệu thành phần bã rong Mơ ở Bảng 3.16, để tăng hiệu quả chiết tách alginate cần phải lấy toàn bộ các ion kim loại hóa trị hai và đa hóa trị. Do đó, thí nghiệm tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ HCl đến hiệu suất chiết tách, vì nếu nồng độ HCl không đủ để tách các ion kim loại thì quá trình chiết tách với Na_2CO_3 chỉ hòa tan các axit alginic còn các alginate kim loại chưa chuyển hóa vẫn nằm lại làm quá trình chiết tách không triệt để.



Hình 3.22. Sơ đồ chiết alginate từ bã rong Mơ

Thuyết minh quy trình

Bã rắn B2 thu được sau khi chiết fucoidan sẽ được sử dụng để chiết alginate.

Bước 1: Phần bã rắn B2 được bổ sung enzyme Htec2 theo tỉ lệ xác định (enzyme/ cơ chất) tại pH=5, tiến hành trong thời gian và nhiệt độ xác định, sau đó hạ nhiệt độ hỗn hợp về nhiệt độ phòng. Sau quá trình xử lý enzyme, ta thu được pha rắn R2 và dịch thải (C4).

Bước 2: Bã rắn R2 được ngâm trong dung dịch HCl 0,1M ở 25°C, lọc hỗn hợp thu lấy phần chất rắn, đem rửa bằng nước sạch rồi bổ sung NaCl 5% và siêu âm. Hỗn hợp thu được để nguội đến nhiệt độ phòng, sau đó tiến hành lọc thu dung dịch alginate thô và bã rắn B4.

Bước 3: Dung dịch alginate thô được bổ sung từ từ dung dịch H₂O₂ 5%, khuấy đều trong 15 phút rồi bổ sung từ từ CaCl₂ 10%, để lắng trong 2 giờ rồi tiến hành lọc và sấy khô thu được chế phẩm canxi alginate.

3.4.2. Kết quả nghiên cứu quá trình thủy phân nguyên liệu bởi enzyme

3.4.2.1. Tác động của việc xử lý nguyên liệu với enzyme lên hiệu suất thu hồi và độ nhớt của alginate

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

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

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

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

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

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

- Hàm lượng đường khử trong nguyên liệu sau khi xử lý enzyme (µg/ml).
- Hàm lượng alginate thu được% tính trên khối lượng nguyên liệu khô tuyệt đối.
- Độ nhớt alginate thu được

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

Các kết quả thu được về tác động của việc xử lý nguyên liệu với enzyme lên hiệu suất thu hồi alginate được trình bày trên Bảng 3.17.

Bảng 3.17. Khảo sát tác động của việc xử lý nguyên liệu với enzyme

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

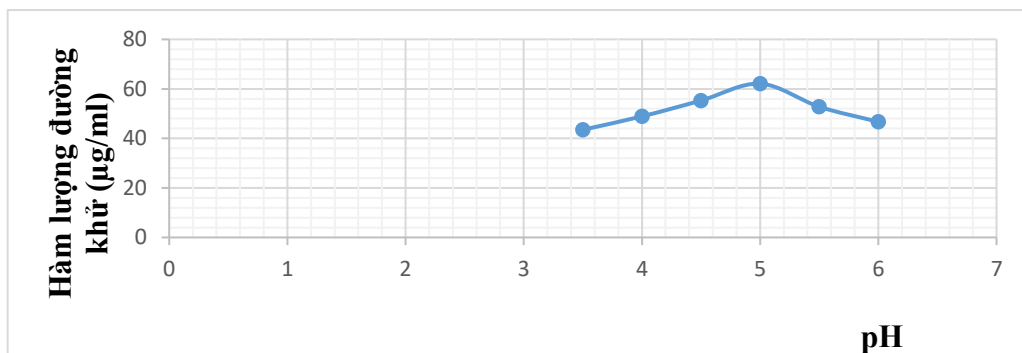
Các kết quả nêu trên cho thấy quá trình tiền xử lý nguyên liệu bằng enzyme đã làm tăng đáng kể hiệu suất thu hồi alginate. Sự gia tăng của hiệu suất có tương quan tỉ lệ thuận với sự gia tăng của hàm lượng đường khử (khi sử dụng enzyme). Mặt khác, quá trình chiết xuất các hợp chất thứ cấp bằng etanol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

Kết luận: Xử lý nguyên liệu bằng enzyme Htec2 giúp nâng cao hiệu suất chiết thu hồi alginate từ bã rong.

3.4.2.2. Khảo sát yếu tố tác động tới quá trình thủy phân rong Mơ bằng enzyme

a. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH

Thực hiện khảo sát trong vùng pH từ 3 - 8 sử dụng hệ đệm thích hợp, giữ cố định các điều kiện khác như tỷ lệ nguyên liệu/nước 1:5 (g/ml), nhiệt độ 45°C, thời gian thủy phân 6 giờ. Các kết quả thu được thể hiện trong Hình 3.23.



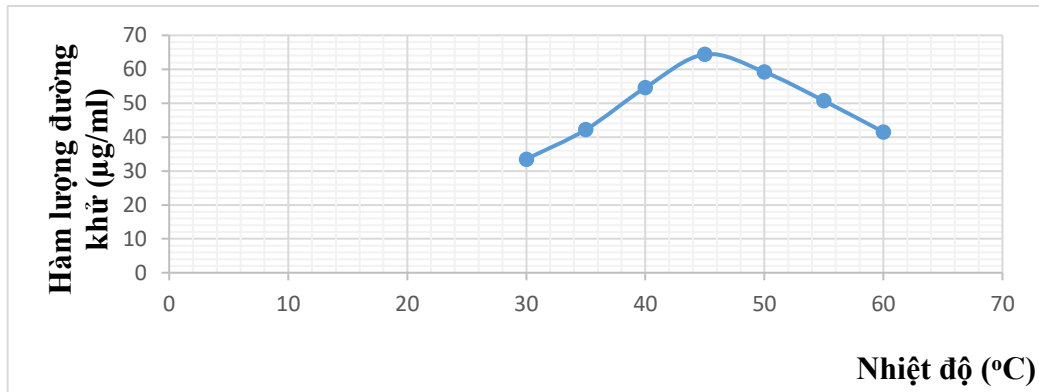
Hình 3.23. Ảnh hưởng của pH lên hàm lượng đường khử

Độ pH của môi trường phản ứng là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme trong quá trình thủy phân, mỗi enzyme có một khoảng hoạt động tối thích riêng. Enzyme Htec2 theo khuyến cáo của nhà sản xuất

hoạt động tốt nhất trong khoảng pH 4,5 - 5,5. Trong các thí nghiệm khảo sát này, pH được xác định tối ưu ở 5.

b. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ

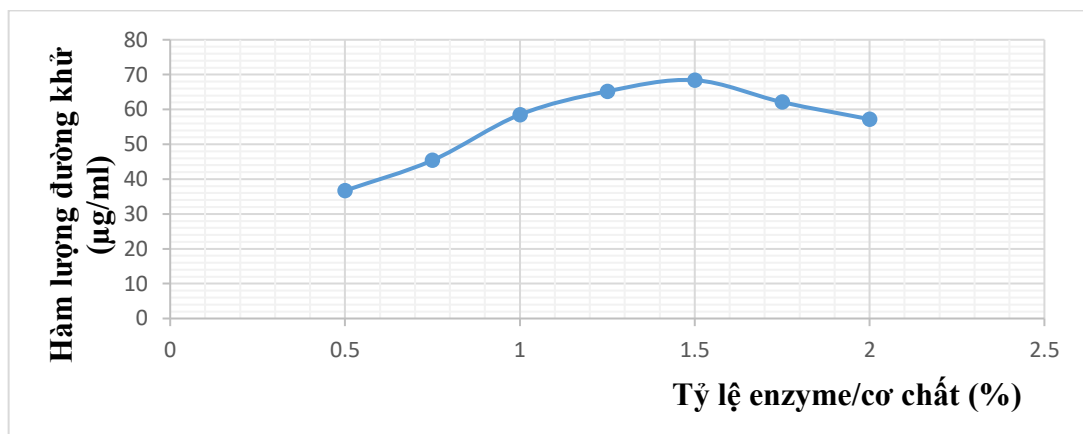
Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân thể hiện trong Hình 3.23 cho thấy, nhiệt độ càng tăng hiệu quả thủy phân càng cao và đạt cực đại ở 45°C, nếu tiếp tục tăng nhiệt độ đến 50 - 55°C thì hiệu quả thủy phân có xu hướng giảm.



Hình 3.24. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hàm lượng đường khử

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

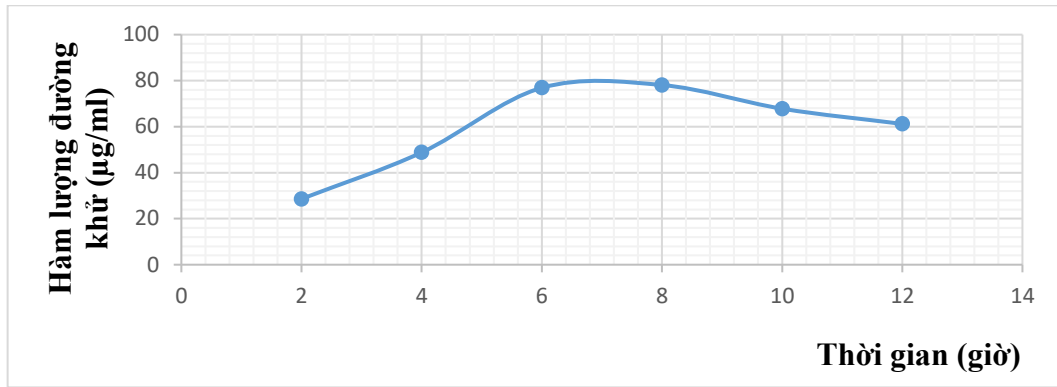
Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme /cơ chất cho thấy khi nồng độ enzyme càng tăng hiệu quả thủy phân càng cao, có nghĩa là lượng đường khử tạo thành càng nhiều và đạt cực đại tại nồng độ Htec2/cơ chất là 1,5%.



Hình 3.25. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme/cơ chất lên hàm lượng đường khử

d. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian xử lý enzyme

Có thể nhận thấy, khi tăng thời gian thủy phân từ 2 đến 6 giờ, hàm lượng đường khử có sự tăng mạnh chứng tỏ quá trình thủy phân diễn ra mạnh mẽ; trong khoảng từ 6 đến 8 giờ, quá trình thủy phân có sự gia tăng không đáng kể hàm lượng đường khử; kéo dài thời gian lại làm cho quá trình thủy phân có xu hướng giảm.



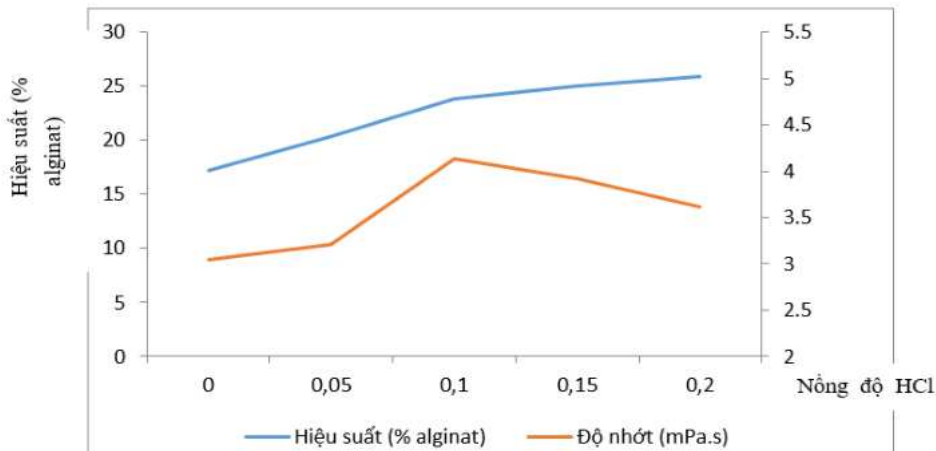
Hình 3.26. Ảnh hưởng của thời gian xử lý enzyme lên hàm lượng đường khử

Kết luận: Các kết quả nêu trên cho thấy các điều kiện sau đây là tốt nhất cho quá trình phân giải cellulose thành tế bào bằng enzyme Htec2: pH = 4,5 - 5,0; Nhiệt độ thủy phân là 45°C; Nồng độ Htec2/nguyên liệu là 1,5%; Thời gian thủy phân từ 6 đến 8 giờ.

3.4.3. Nghiên cứu quá trình chiết xuất alginate và thu nhận Canxi alginate

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

a. Ảnh hưởng của nồng độ HCl xử lý bã rong đến quá trình chiết tách alginate



Hình 3.27. Ảnh hưởng của nồng độ HCl xử lý bã rong tới hiệu suất và độ nhớt alginate chiết tách từ bã rong

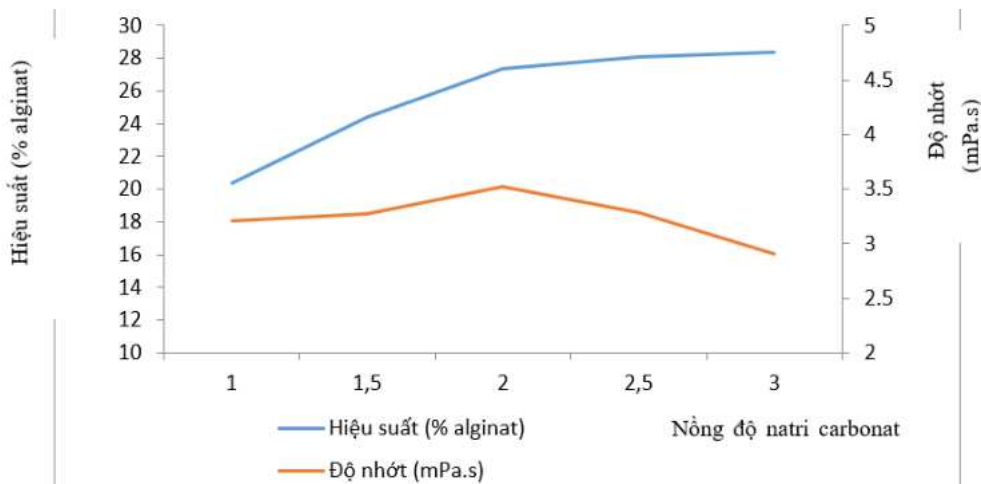
Kết quả ở Hình 3.27 cho thấy, khi tăng nồng độ HCl từ 0,0 (đối chứng) lên lần lượt là 0,05M; 0,1M; 0,15M và 0,2M thì hiệu suất chiết tách alginate tương ứng tăng từ 17,21 ± 1,37%; 20,34 ± 1,38%; 23,87 ± 0,94%; 25,01 ± 1,09% và 25,94 ± 1,22%. Nguyên nhân do bã rong được xử lý bằng HCl thì phản ứng trao đổi ion xảy ra, chuyển alginate từ dạng muối không tan (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} ...) sang dạng axit alginic sẽ giúp thuận lợi cho việc chiết tách trong dung dịch kiềm chuyển thành

muối alginate dạng tan được trong nước. Với rong đã xử lý qua axit, khi chiết xuất bằng kiềm với một tỷ lệ thích hợp, phản ứng trao đổi ion xảy ra gần như hoàn toàn.

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

Kết luận: Nồng độ HCl 0,1M được chọn để xử lý bã rong ở 25°C.

b. Ảnh hưởng của nồng độ Na_2CO_3 đến quá trình chiết tách alginate từ bã rong bằng sóng siêu âm



Hình 3.28. Ảnh hưởng của nồng độ Na_2CO_3 tới hiệu suất và độ nhớt alginate chiết tách từ bã rong

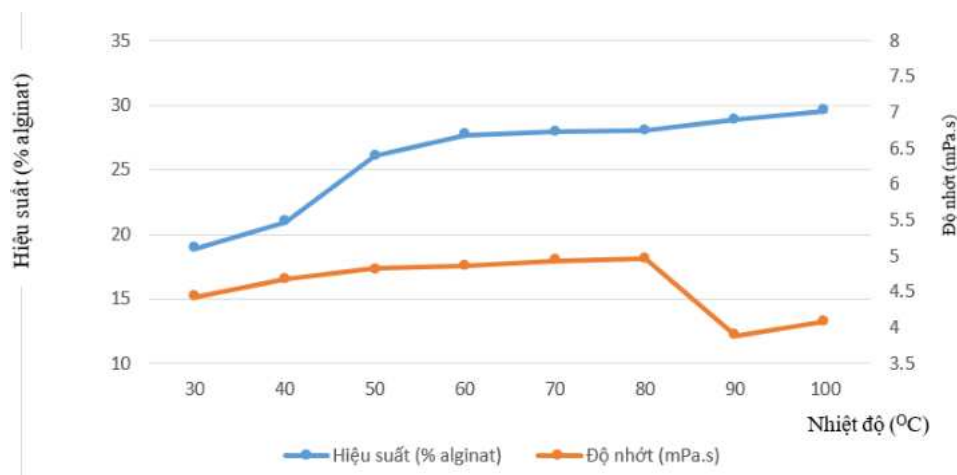
Kết quả ở Hình 3.28 cho thấy khi tăng nồng độ Na_2CO_3 từ 1; 1,5; 2,0; 2,5 lên đến 3,0%, hiệu suất chiết tách alginate tăng tương ứng từ $20,34 \pm 1,82$; $24,41 \pm 1,49$; $27,36 \pm 1,07$; $28,12 \pm 0,87$ và $28,36 \pm 1,02\%$ và tại nồng độ kiềm 3,0%, hiệu suất thu được là cao nhất. Nguyên nhân do quá trình chiết xuất trong môi trường kiềm xảy ra phản ứng trao đổi ion, chuyển alginate từ dạng muối không tan (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} ...) sang dạng muối natri alginate tan được trong nước. Với rong đã xử lý qua axit, khi chiết xuất bằng kiềm với một tỷ lệ thích hợp, phản ứng trao đổi ion xảy ra gần như hoàn toàn, nồng độ kiềm tăng lên, phản ứng trao đổi ion tăng lên, tạo ra được nhiều natri alginate hơn. Khi tăng nồng độ kiềm, độ nhớt cũng tăng lên, nguyên nhân do lúc đầu kiềm thấp, thành tế bào rong vẫn còn rắn chắc chỉ có một phần alginate phân tử nhỏ

khuếch tán ra nên độ nhớt thấp. Với nồng độ Na_2CO_3 là 1,0%, độ nhớt thu được là $3,21 \pm 0,03$ mPa.s. Khi tăng nồng độ kiềm là 1,5% và 2,0% , phản ứng xảy ra triệt để hơn, nồng độ alginate chiết được cao hơn, độ nhớt tăng lên tương ứng là $3,27 \pm 0,06$ mPa.s và $3,52 \pm 0,03$ mPa.s. Tuy nhiên khi lượng kiềm là 2,5% và 3,0%, liên kết glucosid bị phá hủy, alginate phân tử lớn bị cắt mạch nhiều làm độ nhớt của dung dịch đo được giảm, chỉ còn tương ứng là $3,29 \pm 0,07$ mPa.s và $2,91 \pm 0,06$ mPa.s...

Kết luận: Chọn được nồng độ Na_2CO_3 2% cho chiết tách alginate từ bã rong bằng sóng siêu âm.

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

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



Hình 3.29. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu suất và độ nhớt alginate chiết từ bã rong

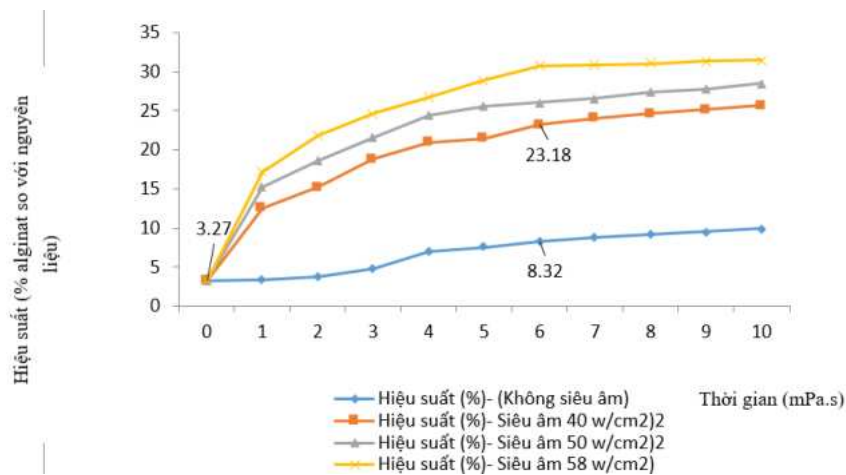
Kết quả khảo sát cho thấy khi nhiệt độ tăng từ 50°C tới 100°C, hiệu suất thu được tăng lần lượt là $18,92 \pm 1,67\%$; $20,92 \pm 0,87\%$; $26,06 \pm 1,07\%$; $27,67 \pm 1,12\%$; $27,94 \pm 0,97\%$; $28,07 \pm 1,02\%$; $28,91 \pm 1,48\%$ và $29,57 \pm 2,27\%$.

Có thể giải thích như sau: Khi nhiệt độ tăng, phản ứng xảy ra với tốc độ nhanh hơn, đồng thời cũng tạo điều kiện cho sự khuếch tán ra của các phân tử alginate. Chiết tách cho hiệu suất alginate tăng cao ở nhiệt độ 60 – 80°C, hiệu suất alginate thu được cũng cao tương ứng từ $27,67 \pm 1,12\%$ lên $28,07 \pm 1,02\%$ alginate, tăng cao nhất ở nhiệt độ 90°C và 100°C tương ứng với lượng alginate là $28,91 \pm 1,48\%$ và $29,57 \pm 2,27\%$.

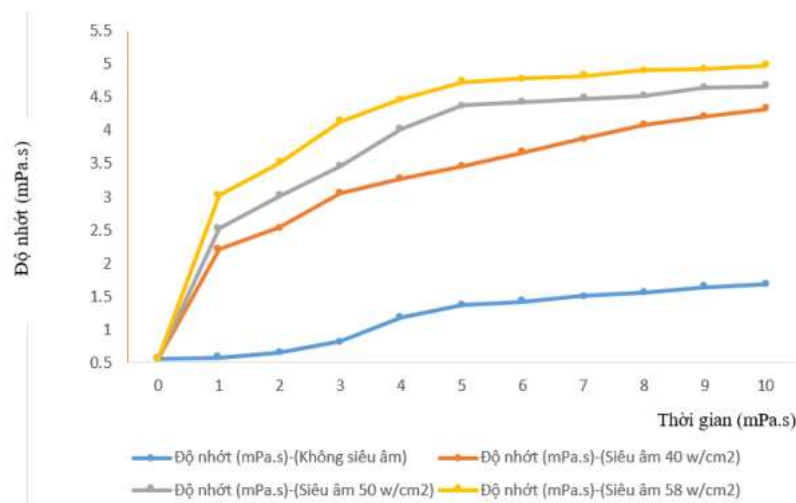
Tuy nhiên, nhiệt độ cao cũng làm giảm độ nhớt đáng kể. Cùng chiết xuất ở Na_2CO_3 2%, thời gian 5 phút tại nhiệt độ 90 và 100°C, độ nhớt thu được giảm thấp nhất, tương ứng là $4,08 \pm 0,04$ và $3,89 \pm 0,07$ mPa.s. Ở nhiệt độ 30, 40 và 50°C, độ nhớt thu được tăng tương ứng là $4,42 \pm 0,07$; $4,67 \pm 0,05$ và $4,82 \pm 0,06$ mPa.s. Nhiệt độ tăng từ 60, 70 lên 80°C, độ nhớt thu được tăng không có sai khác nhiều, tương ứng là $4,86 \pm 0,08$; $4,93 \pm 0,06$ và $4,96 \pm 0,09$ mPa.s, hiệu suất alginate cũng chênh lệch không đáng kể.

Kết luận: Nhiệt độ 60°C là thích hợp nhất để thu hồi alginate (đáp ứng được cả yêu cầu về hiệu suất và độ nhớt).

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



Hình 3.30. Ảnh hưởng của thời gian và cường độ sóng siêu âm đến hiệu suất alginate chiết tách từ bã rong



Hình 3.31. Ảnh hưởng của thời gian và cường độ sóng siêu âm đến độ nhớt alginate chiết tách từ bã rong

Kết quả ở Hình 3.30 và 3.31 cho thấy:

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

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

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

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

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

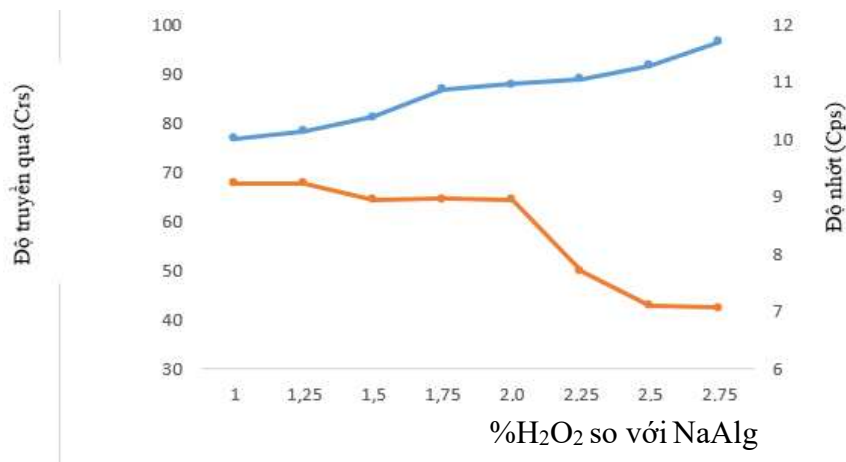
Như vậy, khi cường độ và thời gian siêu âm tăng sẽ tăng khả năng chiết tách alginate, tăng độ nhớt so với đối chứng (không sử dụng sóng siêu âm). Chiết tách ở cường độ 58 w/cm² cho hiệu suất thu nhận alginate và độ nhớt là cao nhất. Ở cường độ siêu âm là 58 w/cm², với thời gian siêu âm chiết tách tăng từ 0 - 6 phút, hiệu suất chiết tách alginate và độ nhớt tăng mạnh. Khi tăng thời gian lên từ 6 đến 10 phút, sự tăng chênh lệch về hiệu suất chiết tách và độ nhớt là không đáng kể.

Kết luận: Để đảm bảo yếu tố kinh tế, ta lựa chọn cường độ siêu âm là 58 w/cm², thời gian 6 phút để chiết tách alginate từ bã rong.

3.4.3.2. Nghiên cứu quá trình thu nhận sản phẩm Canxi alginate

a. Ảnh hưởng của hàm lượng H₂O₂ đến quá trình tẩy trắng alginate

Hiện nay, H₂O₂ thường sử dụng để loại màu sản phẩm trung gian là axit alginic hoặc canxi alginate trong quy trình sản xuất alginate, mặc dù H₂O₂ gây ra depolyme mạch alginate làm giảm chất lượng sản phẩm. Ngoài ra, sự có mặt có ion Ca⁺ có thể làm giảm hàm lượng Na²⁺, tạo ra sự mất ổn định của sản phẩm.



Hình 3.32. Ảnh hưởng của hàm lượng H₂O₂ (dung dịch H₂O₂ 5%) lên độ nhớt và độ truyền qua của sản phẩm alginate

Tùy theo nguyên liệu khác nhau mà hàm lượng H₂O₂ sử dụng khác nhau. Do đó, nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của nồng độ H₂O₂ bằng dung dịch 5% H₂O₂ tương ứng với tỷ lệ% hàm lượng H₂O₂ so với NaAlg là: 0,5; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50 và 2,75% lên màu và độ nhớt của alginate.

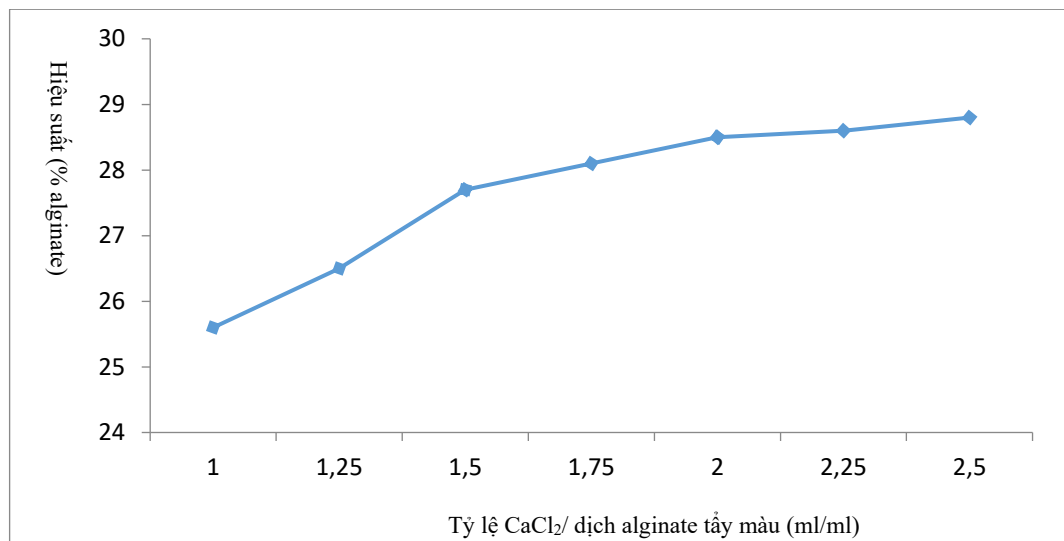
Kết quả ở hình 3.31 cho thấy nồng độ H₂O₂ càng tăng từ 0,5; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50 lên đến 2,75% H₂O₂ cho độ truyền qua càng tăng tương ứng 73,2 ± 2,1; 76,7 ± 3,2; 78,2 ± 1,9; 81,3 ± 2,6; 86,8 ± 1,8; 87,9 ± 1,5; 88,7 ± 2,2; 91,4 ± 1,7 và 96,2 ± 1,7 Crs, độ trắng của sản phẩm tăng lên và ngược lại cho độ nhớt giảm xuống. Khi tăng nồng độ H₂O₂ từ 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 và lên đến 2,00% H₂O₂ so với tủa Ca(Alg)₂ cho thấy độ nhớt tương đối ổn định, tương ứng là 9,21 ± 0,04; 9,22 ± 0,06; 9,22 ± 0,05; 8,94 ± 0,03; 8,95 ± 0,04 và 8,94 ± 0,06 Cps (giảm không đáng kể), còn khi nồng độ H₂O₂ tiếp tục tăng từ 2,25; 2,50 và lên đến 2,75% H₂O₂ so với NaAlg, cho thấy độ nhớt giảm mạnh tương ứng: 7,70 ± 0,07; 7,10 ± 0,06 và 7,07 ± 0,08 Cps. Như vậy, để thu được sản phẩm đạt chất lượng về

màu, độ nhớt có thể sử dụng cho thực phẩm, chúng tôi chọn hàm lượng H_2O_2 5% tối ưu nằm trong vùng 1,75 -2,00% $\text{H}_2\text{O}_2/100\text{ml}$ NaAlg khi đó sản phẩm có màu vàng nhạt đến trắng ngà.

Kết luận: Tẩy trắng sản phẩm $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ bằng dung dịch H_2O_2 5% với lượng tương ứng 2% H_2O_2 so với NaAlg là phù hợp.

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

Sau khi chiết natri alginate, giai đoạn tiếp theo đó là thực hiện sự chuyển hóa chúng sang dạng canxi alginate ($\text{Ca}(\text{Alg})_2$) theo phản ứng: $\text{NaAlg} + \text{CaCl}_2 \rightarrow \text{Ca}(\text{Alg})_2 + 2\text{NaCl}$. Khả năng thu rửa $\text{Ca}(\text{Alg})_2$, phụ thuộc vào lượng CaCl_2 tham gia phản ứng. Do đó, ta thực hiện khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ CaCl_2 /dịch alginate tẩy màu lên hiệu suất thu nhận $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ để tìm tỷ lệ thích hợp.



Hình 3.33. Ảnh hưởng của tỷ lệ CaCl_2 tới hiệu suất thu rửa $\text{Ca}(\text{Alg})_2$

Kết quả Hình 3.32 cho thấy tỷ lệ CaCl_2 / dịch alginate tẩy màu tăng lần lượt là: 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,25 lên 2,50 (ml/ml) cho hiệu suất thu nhận alginate tăng tương ứng lần lượt là: $25,6 \pm 1,06$; $26,5 \pm 0,96$; $27,7 \pm 1,16$; $28,1 \pm 0,87$; $28,5 \pm 1,21$; $28,6 \pm 1,12$ và $28,8 \pm 1,25\%$. Ở tỷ lệ CaCl_2 / dịch alginate tẩy màu là: 2,00; 2,25 và 2,50 (ml/ml) cho hiệu suất cao nhất nhưng mức tăng không đáng kể. Vì vậy, dung dịch CaCl_2 10% để rửa thu hồi $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ với tỷ lệ tương ứng CaCl_2 / dịch alginate tẩy màu = 2/1 (ml/ml) là thích hợp để rửa thu hồi $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ từ NaAlg.

Kết luận: Bổ sung nồng độ CaCl_2 10% với tỷ lệ tương ứng CaCl_2 / dịch alginate tẩy màu = 2/1 (ml/ml) để rửa thu hồi $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ từ NaAlg.

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

3.5.1. Đánh giá chất lượng Canxi alginate

Sản phẩm Canxi alginate được đánh giá chất lượng qua phân tích các chỉ tiêu sinh hóa bao gồm các chỉ tiêu về độ ẩm, hàm lượng tro, hàm lượng canxi, hàm lượng alginate, độ pH; chỉ tiêu vi sinh vật; hàm lượng kim loại nặng. Kết quả phân tích được trình bày trên các Bảng 3.18, Bảng 3.19 và 3.20.

Bảng 3.18. Xác định chỉ tiêu chất lượng chính

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức chất lượng
1	Độ ẩm	%	6,82%
2	Hàm lượng tro tổng	%	31,08%
3	Hàm lượng canxi	%	7-10%
4	Hàm lượng alginic	%	20,67%
5	pH		6,0-7,5
6	Độ nhớt (dd 1%)	(mPa.S)	235

Kết quả phân tích ở bảng 3.18 cho thấy, mẫu nghiên cứu có độ ẩm đạt giá trị 6,82%; hàm lượng tro đạt 31,08% và hàm lượng alginic đạt 20,67%. Bên cạnh đó, hàm lượng canxi trong bột Canxi alginate rất cao từ 7-10%, cho thấy bột Canxi alginate rất tốt cho xương khớp. Đây là cơ sở khoa học để tiến hành thử nghiệm hoạt tính chống loãng xương của mẫu nghiên cứu này.

Bảng 3.19. Kết quả phân tích chỉ tiêu vi sinh vật

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

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

Kết quả phân tích chỉ tiêu vi sinh vật ở bảng 3.19 cho thấy trong mẫu nghiên cứu có mặt các loại vi khuẩn *Coliform*, *S. Aureus*, *C. Perfringens*, *B. Cereus* với hàm lượng $\leq 10\text{CFU/g}$ và không có mặt của hai loại khuẩn gây bệnh là *E. Coli* và *Salmonella*. Kết quả này đáp ứng được tiêu chuẩn an toàn thực phẩm do Bộ Y tế ban hành.

Theo kết quả phân tích được trình bày trên Bảng 3.20, hàm lượng Cu, Zn có các giá trị ≤ 10 ppm; hàm lượng các kim loại nặng Pb, Cd, Hg thấp hơn rất nhiều. Các giá trị về hàm lượng các kim loại nặng đều nằm trong ngưỡng cho phép theo quy định an toàn thực phẩm của Bộ Y tế.

Bảng 3.20. Chỉ tiêu hàm lượng kim loại nặng

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị tính	Mức chất lượng	Mức chất lượng theo QCVN* [11,13]
1	Hàm lượng Pb	ppm	$\leq 3,0$	$\leq 5,0$
2	Hàm lượng Cd	ppm	$\leq 0,1$	$\leq 3,0$
3	Hàm lượng Hg	ppm	$\leq 1,0$	$\leq 1,0$
4	Hàm lượng Đồng	ppm	≤ 10	
5	Hàm lượng kẽm	ppm	≤ 10	

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

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

Tế bào tiền nguyên bào xương MC3T3-E1 là loại tế bào có khả năng biệt hóa thành các tế bào tạo xương. Trong quá trình biệt hóa, tế bào MC3T3-E1 thể hiện những đặc điểm đặc trưng của nguyên bào xương như sản xuất alkaline phosphatase (ALP), tăng cường tổng hợp collagen chất nền ngoại bào từ procollagen và cuối cùng là lắng đọng khoáng trên chất nền ngoại bào. Vì vậy dòng tế bào này được sử dụng để đánh giá khả năng chống loãng xương của các mẫu nghiên cứu. Các chỉ tiêu như khả năng kích thích tạo ALP, khả năng tăng cường tổng hợp collagen và khả năng tăng cường tạo khoáng là các dấu hiệu đặc trưng cho khả năng chống loãng xương. Kết quả đánh giá hoạt tính chống loãng xương của sản phẩm Canxi alginate được trình bày trên bảng 3.21.

Bảng 3.21. Kết quả đánh giá hoạt tính chống loãng xương của Canxi alginate

Nồng độ (µg/ml)	Ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào		Tác động đến sự hoạt động của enzyme ALP		Tác động đến sự tổng hợp collagen		Khả năng kích thích tạo khoáng	
	% TB sống	Sai số	% kích thích	Sai số	% tổng hợp	Sai số	% tổng hợp	Sai số
100	78,44	3,16	90,67	5,21	109,64	6,42	105,66	7,93
20	86,71	4,63	124,41*	3,56	111,10*	2,83	103,05	8,62
4	88,95	0,34	118,16*	5,60	101,23	2,12	115,42*	2,23
0,8	90,21	3,42	62,66	0,39	99,58	1,56	99,13	2,44
ĐC	100	1,77	100	3,51	100	0,21	100	2,68

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

Kết quả ở bảng trên cho thấy, đối với thử nghiệm ảnh hưởng lên sự phát triển của tế bào MC3T3 – E1, mẫu nghiên cứu ở các nồng độ thử nghiệm khác nhau đều gây ức chế sự phát triển của tế bào so với đối chứng không ủ mẫu với % tế bào sống từ 78,44 – 90,21% ($p < 0,05$). Trong đó, ở nồng độ 100 µg/ml, % tế bào sống thấp nhất là 78,44%. Khi nồng độ mẫu thử giảm xuống 20 µg/ml đến 0,8 µg/ml, tế bào bị ảnh hưởng ít hơn, % tế bào sống đều cao với các giá trị lần lượt là 86,71, 88,95 và 99,21%.

Đối với thử nghiệm đánh giá tác động đến sự hoạt động của enzyme ALP, Canxi alginate thể hiện khả năng tăng cường hoạt động của enzyme này ở mức có ý nghĩa thống kê ở nồng độ 20 µg/ml và 4 µg/ml với % kích thích ALP là 124,41% và 118,16% khi so sánh với đối chứng âm (100%). Ở các nồng độ 100 µg/ml và 0,8 µg/ml, mẫu thử nghiệm không thể hiện rõ khả năng kích thích ALP.

Canxi alginate ở nồng độ 20 µg/ml thể hiện khả năng tăng cường tổng hợp collagen so với đối chứng âm, % collagen được tổng hợp là 111,10%. Ở nồng độ 4 µg/ml, mẫu thử nghiệm có khả năng kích thích tạo khoáng nhẹ so với đối chứng âm, % khoáng được tổng hợp là 115,42% ($p < 0,05$).

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

3.5.3.1. Kết quả về độc tính cấp

a. Kết quả theo dõi về biểu hiện của chuột

Chuột trắng được cho dùng chế phẩm Canxi alginate với liều lượng tăng dần từ 02 đến 2,5 g/kg thể trọng.

Bảng 3.22. Số lượng chuột chết, biểu hiện bên ngoài sau khi uống Canxi alginate

Lô thí nghiệm	Liều lượng Canxi alginate (g/kg)	Số chuột chết trong 72 giờ (con)	Biểu hiện bên ngoài trong khoảng thời gian từ 0-72 giờ
1	ĐC	0	Sau khi uống mẫu, chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt
2	0,2	0	Sau khi uống mẫu, chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt
3	0,5	0	Sau khi uống mẫu, chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt
4	1,0	0	Sau khi uống mẫu, chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt
5	1,5	0	Sau khi uống mẫu, chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt
6	2,0	0	Sau khi uống mẫu, chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt
7	2,5	0	Sau khi uống mẫu, chuột di chuyển và ăn uống bình thường, phản xạ ánh sáng và âm thanh tốt

Kết quả cho thấy chế phẩm không gây chết động vật thí nghiệm theo đường uống trong thí nghiệm này.



Hình 3.34. Ảnh chuột sau khi thí nghiệm độc cấp tính

Như vậy, Canxi alginate không gây độc cấp trên chuột nhắt trắng theo đường uống với liều thử cao nhất là 2,5 g/kg. Đối với các mức liều thử cao hơn, do

sự trương nở của sản phẩm ở dạng thạch mềm nên không thể cho chuột sử dụng ở các mức liều cao hơn. Vì vậy, không ghi nhận được độc tính cấp của sản phẩm ở các mức liều cao hơn.

b. Khối lượng cơ thể chuột

Kết quả theo dõi khối lượng cơ thể chuột ở nhóm chứng và nhóm thử được thể hiện trong các bảng 3.23.

Bảng 3.23. Kết quả theo dõi khối lượng của chuột ở các lô

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

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

Kết quả theo dõi khối lượng trung bình của chuột trong quá trình thử nghiệm 7 ngày cho thấy:

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

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

c. Tiêu thụ thức ăn và nước uống của chuột

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

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

d. Quan sát dấu hiệu ngộ độc

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

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

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

3.5.3.2. Kết quả thử độc tính bán trường diễn

a. Kết quả theo dõi biểu hiện bên ngoài

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

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

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

Bảng 3.24. Sự thay đổi trọng lượng chuột khi cho uống Canxi alginate (gram/con)

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

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

Không chỉ có theo dõi biểu hiện bên ngoài của chuột thí nghiệm, chúng tôi còn theo dõi sự thay đổi trọng lượng của chuột trong quá trình thí nghiệm. Trọng lượng của chuột thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.24.

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

c. Kết quả kiểm tra một số chỉ tiêu huyết học

Bảng 3.25. Các chỉ tiêu huyết học khi cho chuột uống Canxi alginate

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

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

Đánh giá ảnh hưởng trong thời gian 28 ngày, sau thời gian thí nghiệm, chuột ở các lô được lấy máu, thu huyết thanh, xác định một số chỉ tiêu huyết học và hóa sinh máu. Kết quả về số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hemoglobin, hoạt độ các enzym *creatinphosphokinase* (CPK), serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), serum glutamic purivic transaminase (SGPT) được trình bày ở bảng 3.25.

Bảng 3.25. cho thấy:

- Số lượng hồng cầu, lượng huyết sắc tố (HGB), Hematocrit (HCT), thể tích trung bình hồng cầu (MCV), nồng độ Hb trung bình hồng cầu (MCHC) hay độ phân

bộ hồng cầu (RDW) giữa lô được uống Canxi alginate liều 500 mg/kg không có sự sai khác so với đối chứng ($p>0,05$).

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

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

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

d. Kết quả kiểm tra một số chỉ tiêu hóa sinh máu

Bảng 3.26. Một số chỉ tiêu hóa sinh khi uống Canxi alginate

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

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

Bảng 3.26. cho thấy:

Sau 4 tuần uống mẫu liên tục, các chỉ số đánh giá hoạt độ ALT ở lô uống chế phẩm liều 1000 mg/kg/ngày và 500 mg/kg/ngày cao hơn so với đối chứng, tuy nhiên sự thay đổi này chưa thể hiện ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.27. Ảnh hưởng của Canxi alginate đến nồng độ creatinin trong máu chuột

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

Kết quả ở bảng 3.27 cho thấy: sau 4 tuần uống mẫu Canxi alginate liên tục, hàm lượng creatinin trong máu chuột giảm nhẹ so với đối chứng. Tuy nhiên sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

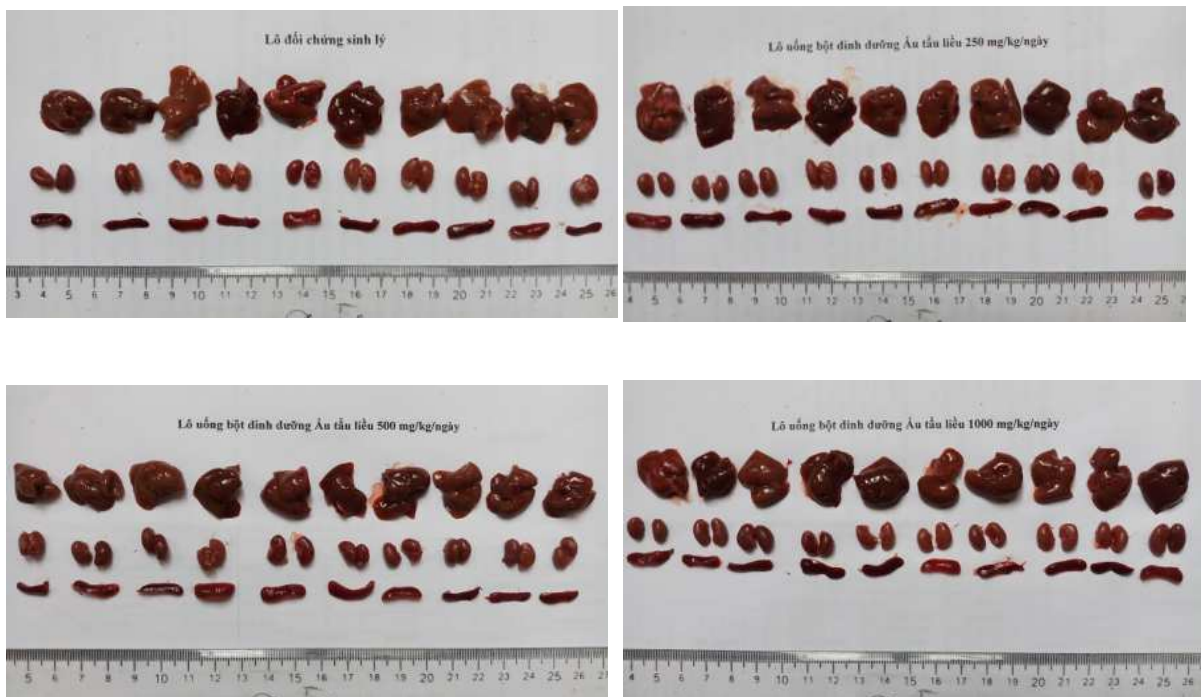
e. Kết quả nghiên cứu trực quan gan, thận, lách động vật thí nghiệm

Sau thời gian cho uống bán trường diễn, động vật ở tất cả các lô được mổ, quan sát trực quan đối với các nội tạng là gan, thận, lách, phổi. Sau đó, cân khối lượng để đánh giá ảnh hưởng. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.28.

Bảng 3.28. Kết quả mổ giải phẫu cơ quan nội tạng khi uống Canxi alginate

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

Kết quả ở Hình 3.35. cho thấy gan, thận, lách ở các lô được uống Canxi alginate về màu sắc là không có sự bất thường so với lô đối chứng.



Hình 3.35. Ảnh gan, thận, lách chuột sau khi thí nghiệm độc bán trường diễn

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

Kết quả cân trọng lượng các nội quan này được trình bày ở bảng 3.33 cho thấy: Trọng lượng gan, thận và lách trên 10 gram thể trọng ở lô uống Canxi alginate liều 500mg/kg/ngày và liều 1000 mg/kg/ngày so với đối chứng đều không có sự sai khác thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.29. Trọng lượng của một số nội quan (gram/10 gram thể trọng)

Lô thí nghiệm	Trọng lượng của một số nội quan (gram/10 gram thể trọng)		
	Gan	Thận	Lách
Đối chứng	0,413 ± 0,014	0,118 ± 0,006	0,043 ± 0,005
Canxi alginate liều 500 mg/kg/ngày	0,414 ± 0,017	0,119 ± 0,005	0,043 ± 0,006
Canxi alginate liều 1000 mg/kg/ngày	0,415 ± 0,016	0,118 ± 0,003	0,044 ± 0,005

Như vậy:

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

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

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

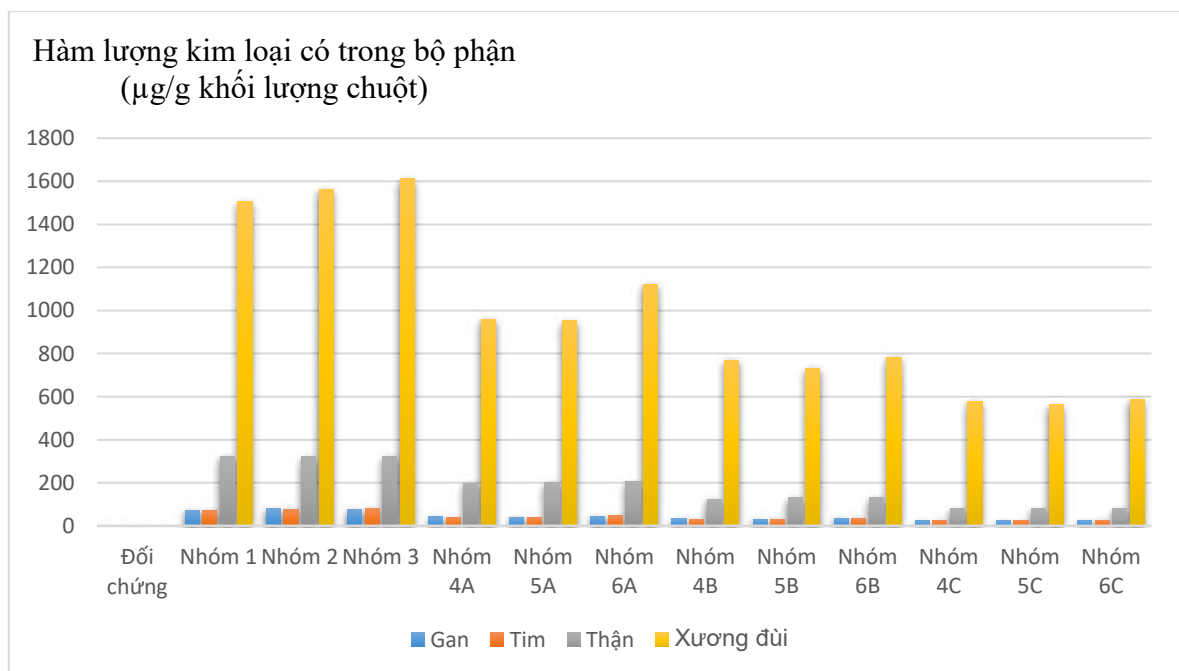
3.5.4. Đánh giá tác dụng đào thải kim loại nặng của Canxi alginate

Tiến hành thí nghiệm đánh giá tác dụng đào thải kim loại nặng của Canxi alginate trên các chuột nhất trắng theo phương án mô tả trong Bảng 3.30.

Bảng 3.30. Phương án thử nghiệm đánh giá tác dụng đào thải kim loại nặng

Nhóm thử nghiệm	Phương án gây độc		
	Tuần 1-3	Tuần 4-6	Tuần 7-9
Đối chứng	-	-	-
Nhóm 1	Gây độc chì	-	-
Nhóm 2	Gây độc Cadimi	-	-
Nhóm 3	Gây độc thủy ngân	-	-
Nhóm 4	A. Gây độc chì; Uống Canxi alginate	B. Dừng gây độc; Uống Canxi alginate	C. Dừng gây độc; Uống Canxi alginate
Nhóm 5	A. Gây độc Cadimi; Uống Canxi alginate	B. Dừng gây độc; Uống Canxi alginate	C. Dừng gây độc; Uống Canxi alginate
Nhóm 6	A. Gây độc thủy ngân; Uống Canxi alginate	B. Dừng gây độc; Uống Canxi alginate	C. Dừng gây độc; Uống Canxi alginate

Kết quả thử nghiệm đánh giá tác dụng đào thải kim loại nặng được trình bày tại Hình 3.36 (số liệu chi tiết được trình bày tại Phụ lục 5).



Hình 3.36. Kết quả thử nghiệm tác dụng đào thải kim loại nặng của Canxi alginate

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

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

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

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

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

loại nặng tích lũy trong xương vẫn là lớn nhất, dao động trong khoảng 561 – 588 ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột).

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

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

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

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

3.6.1. Thành phần cơ bản của bã rong Mơ sau khi chiết alginate

Bảng 3.31. Thành phần cơ bản trong bã rong Mơ sau khi chiết alginate

TT	Thành phần	Hàm lượng (%)
1	Độ ẩm	10,32
2	Độ tro	15,76
3	C_{TS}	67,23
4	N_{TS}	1,34
7	pH	8,7

Khảo sát sơ bộ thành phần cơ bản của bã rong Mơ sau khi chiết alginate cho thấy phần lớn là carbohydrat với C_{TS} 67,23%, trong đó chủ yếu là các cellulose không tan. Hàm lượng tro là 15,76%, cho thấy trong bã rong chứa rất nhiều khoáng chất, có vai trò quan trọng trong việc bổ sung khoáng cho cây trồng khi chuyển hóa bã rong thành phân hữu cơ. Ngoài ra là một số tạp chất khác, protein không đáng kể, N_{TS} 1,34%.

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

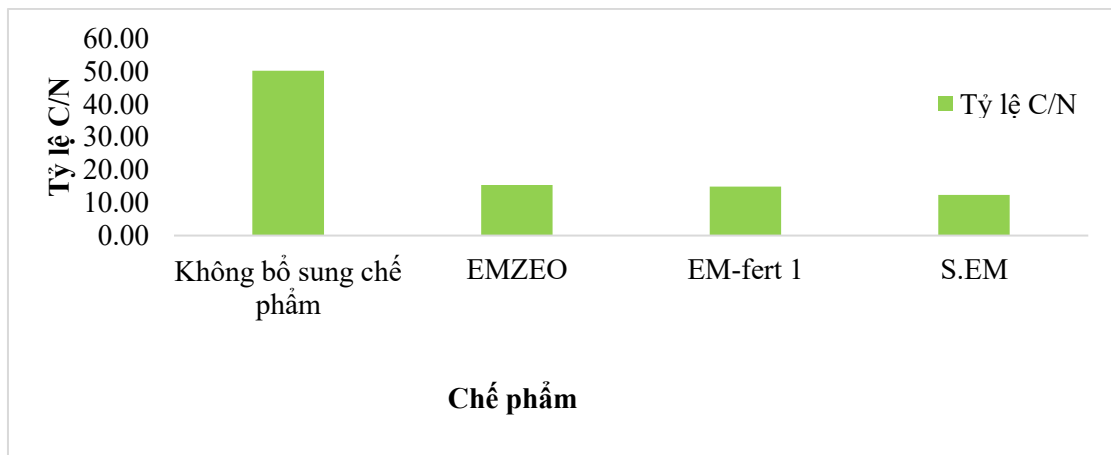
3.6.2. Nghiên cứu lựa chọn chế phẩm vi sinh có khả năng phân giải bã rong Mơ sau chiết alginate

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

Bảng 3.32. Ảnh hưởng của loại chế phẩm đến tỷ lệ C/N của khối ủ

TT	Chế phẩm	C _{TS}	N _{TS}	Tỷ lệ C/N
1	Không bổ sung chế phẩm	67,23	1,34	50,17
2	Chế phẩm EMZEO	39,54	2,56	15,45
3	Chế phẩm EM-fert 1	39,77	2,67	14,90
4	Chế phẩm S.EM	37,12	3,01	12,33

Kết quả cho thấy, ba chế phẩm vi sinh lựa chọn đều hiệu quả trong việc xử lý các hợp chất hữu cơ từ bã rong Mơ sau khi chiết alginate. Nhóm phân giải cellulose hoạt động để đồng hóa cơ chất và tạo điều kiện cho hoạt động của các vi sinh vật khác.



Hình 3.37. Ảnh hưởng của loại chế phẩm đến tỷ lệ C/N của khối ủ

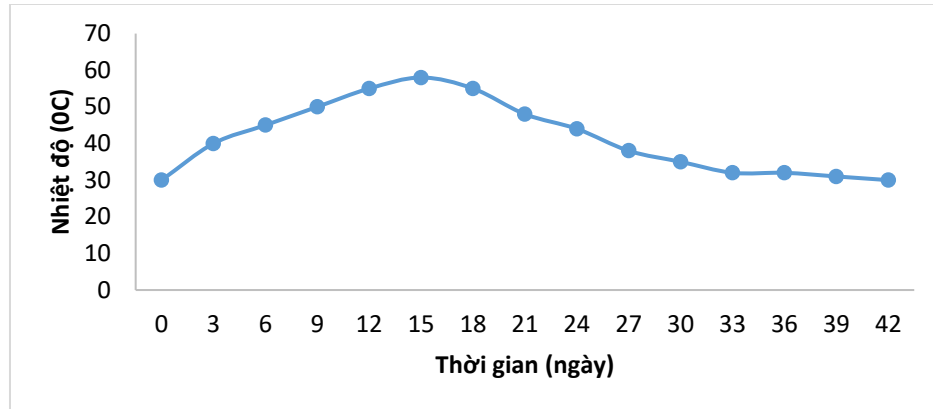
Khi so sánh tỷ lệ C/N giữa các đồng ủ có bổ sung chế phẩm vi sinh và đối chứng là không bổ sung chế phẩm cho thấy, sau 6 tuần tỷ lệ C/N đã giảm mạnh giữa lô không bổ sung chế phẩm (C/N: 50,17%) xuống còn xấp xỉ 12-15%. Tỷ lệ C/N đạt 10-15 đạt tiêu chuẩn phân bón, tuy nhiên chế phẩm S.EM có tỷ lệ C/N 12,33 có kết quả tốt nhất được lựa chọn.

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

3.6.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

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

Streptomyces sp. hoạt động mạnh mẽ, sử dụng chất thải hữu cơ để đồng hóa và phát triển mạnh. Nhiệt độ cao nhất vào ngày thứ 15 (58°C). Ban đầu, nhiệt độ tăng cao ngăn chặn vi sinh vật gây thối phát triển, tạo điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật sau đó như *Bacillus* sp. đồng hóa các hợp chất hữu cơ. Sau đó, nhiệt độ khối ủ giảm dần, tạo điều kiện cho nấm sợi và nấm men hoạt động. Chính vì vậy, sau khoảng 4 - 5 tuần, nhiệt độ giảm mạnh xuống còn 32°C, đồng thời khối ủ chuyển sang màu đen, tơi, xốp mềm và không có mùi hôi thối khó chịu.

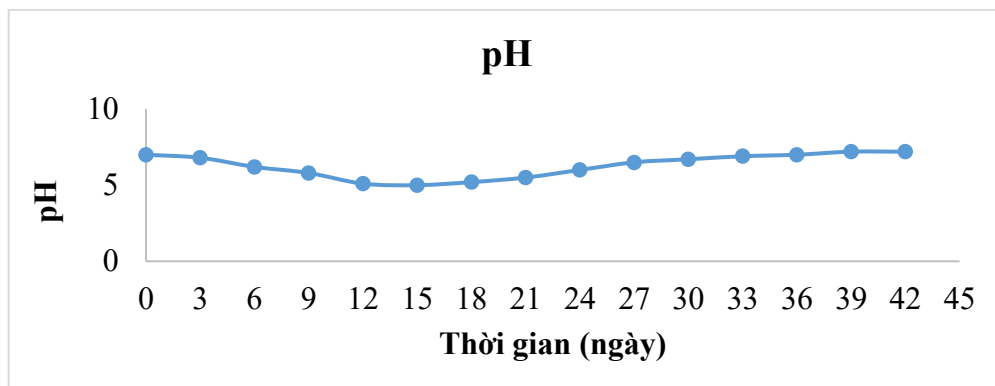


Hình 3.38. Theo dõi diễn biến nhiệt độ trong đồng ủ

3.6.3.2. Theo dõi sự biến động pH

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

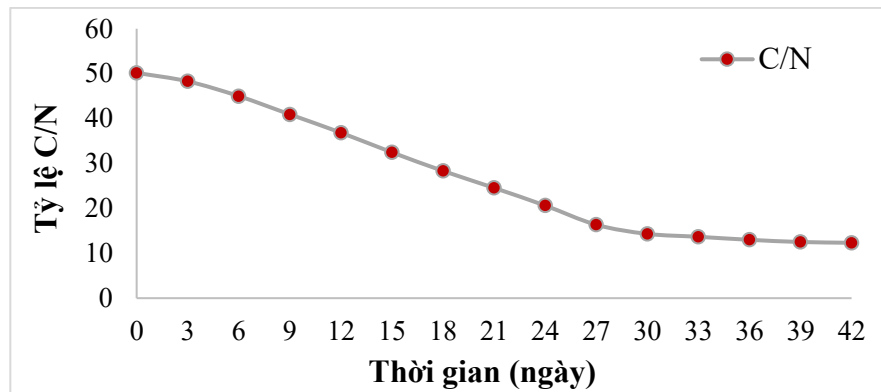
Điểm đặc biệt là pH của bã rong sau khi chiết fuicoidan và alginat có tính kiềm, pH 9,7. Vì vậy, trước khi phối trộn với vi sinh làm phân bón, nguồn bã rong cần được tiền xử lý trong quá trình ủ.



Hình 3.39. Theo dõi sự biến động pH trong đồng ủ

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

Sự thay đổi tỷ lệ C/N diễn ra trong suốt quá trình ủ 21 ngày bổ sung chế phẩm vi sinh. Kết quả ở hình cho thấy, hàm lượng C% giảm, N% tăng kéo theo tỷ lệ C/N giảm dần từ khi ủ cho tới khoảng ngày thứ 27-30, tương ứng khoảng 4 tuần (tỷ lệ C/N 14,32). Các ngày tiếp theo, tỷ lệ này có giảm nhưng xu hướng giảm ít. Xét theo tiêu chuẩn phân bón compost (C/N = 10 – 15) là đạt tiêu chuẩn. Chính vì vậy, sau khoảng 4 tuần ủ, bã rong đã chuyển hóa thành phân compost, sau 6 tuần quá trình này gần như triệt để, đủ điều kiện để làm phân bón hữu cơ.



Hình 3.40. Theo dõi tỷ lệ C/N trong đồng ủ

3.6.4. Đánh giá thành phần phân bón từ bã rong

Sau 6 tuần ủ, bã rong sau (khi chiết alginate) có màu Nâu, hơi vàng chuyển thành phân hữu cơ màu đen, tơi xốp, sờ thấy mềm tay, không có mùi hôi thối khó chịu. Kết quả chỉ ra ở hình 3.41 và bảng 3.33.



(a)

(b)

Hình 3.41. Bã rong trước khi ủ (a) và sau khi ủ 6 tuần (b)

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

Bảng 3.33. Một số chỉ tiêu đánh giá bã rong trước và sau khi ủ chế phẩm S.EM

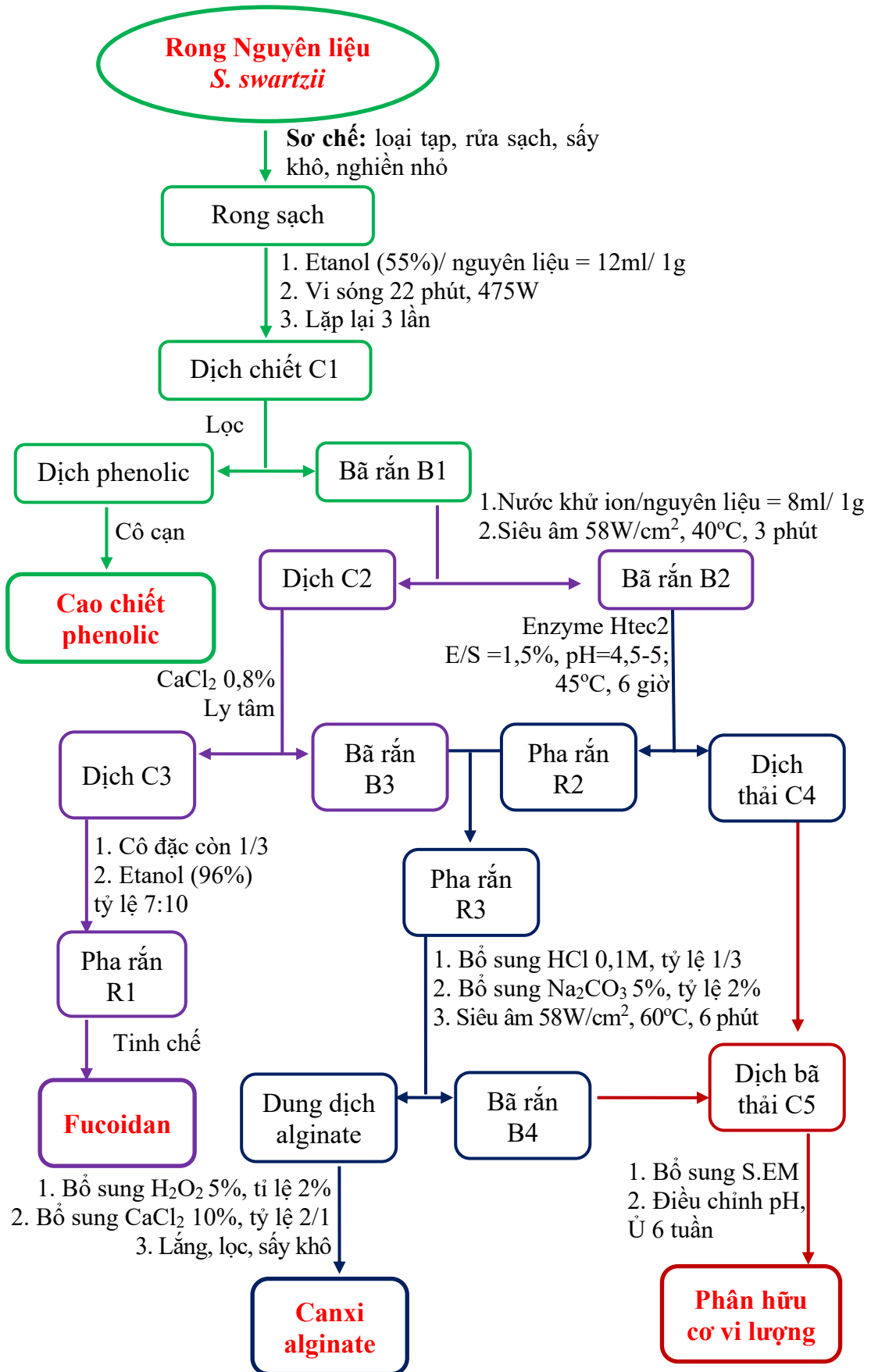
TT	Chỉ tiêu đánh giá	Đơn vị	Trước khi ủ	Sau khi ủ
1	Cảm quan		Màu Nâu nhạt, bã rong dai, cứng	Màu đen, xốp, mềm
2	OC	%	67,23	37,12
3	N _{Ts}	%	1,34	3,01
4	P ₂ O ₅	%	0,05	0,20
5	K ₂ O	%	1,77	2,15

3.7. Xây dựng quy trình công nghệ tích hợp chế biến các sản phẩm từ rong Mơ

3.7.1. Sơ đồ và thuyết minh quy trình

Luận án đã đưa ra quy trình công nghệ chế biến toàn diện rong Mơ thành các sản phẩm có giá trị cao như phenolic, fucoidan và alginat theo phương pháp tích hợp các kỹ thuật tiên tiến (enzyme, vi sóng, siêu âm, ly tâm tốc độ cao...). Quy trình chiết xuất theo sơ đồ trong Hình 3.42 được mô tả là hiệu quả với khả năng thu hồi đồng bộ và hiệu suất cao các sản phẩm, hạn chế tối đa chất thải từ nguồn nguyên liệu rất dồi dào, có sẵn trong tự nhiên.

Quy trình dựa trên đặc tính của nguyên liệu và các sản phẩm, sử dụng nền tảng công nghệ vi sóng để phá hủy các cấu trúc tế bào, kết hợp enzyme – siêu âm áp dụng trên đối tượng rong Mơ. Việc sử dụng sóng siêu âm cường độ cao trong giai đoạn đầu và sự kết hợp sóng siêu âm với enzyme ở giai đoạn tiếp theo đã giúp giảm một lượng lớn enzyme cần sử dụng (3 - 4 lần), đồng thời giảm thời gian thủy phân, hạn chế được sự oxy hóa một số thành phần nhạy cảm như fucoxanthin và phlorotanin trong phenolic. Việc tích hợp các kỹ thuật tiên tiến đã giúp nâng cao hiệu quả phá vỡ được mạng lưới liên kết giữa alginat, fucoidan với xenlulozơ; do đó không cần sử dụng axit trong giai đoạn xử lý nguyên liệu trước khi chiết tách fucoidan nên các cấu trúc của fucoidan và alginat được bảo toàn, tránh sự cắt đứt mạch polime một phần bởi axit. Quá trình chiết tách phenolic trước khi chiết tách alginat đã làm giảm một lượng lớn các chất màu. Bên cạnh đó, việc sử dụng H₂O₂ để tẩy màu giúp tránh được việc phải sử dụng chất tẩy màu gây ô nhiễm môi trường như javen. Các phần chất thải còn lại được điều chỉnh pH trung tính, bổ sung vi sinh vật để ủ lên men tạo thành phân bón hữu cơ đa vi lượng. Mặt khác, công nghệ hoàn toàn có khả năng triển khai thực hiện ở quy mô công nghiệp. Do đó, đảm bảo cung cấp một lượng lớn sản phẩm phenolic, fucoidan và alginat có giá trị chăm sóc sức khỏe cộng đồng với hiệu quả kinh tế cao.



Hình 3.42. Sơ đồ quy trình chế biến toàn diện rong Mơ

Thuyết minh quy trình

Bước 1: Sơ chế nguyên liệu.

Mẫu rong sau khi thu hoạch được làm sạch, loại bỏ rong lạ và sinh vật bám trên rong, rửa sạch bằng nước biển sau đó rửa sạch lại bằng nước ngọt, sấy khô sau đó bảo quản ở nhiệt độ 5-10°C trước khi sử dụng. Khi sử dụng cần nghiền nhỏ bằng máy nghiền chuyên dụng.

Bước 2: Chiết và thu cao phenolic có hỗ trợ vi sóng.

Rong sau khi sơ chế được bổ sung etanol 55% (tỷ lệ dung môi: nguyên liệu rong là 12ml : 1g), tiến hành chiết với sự hỗ trợ của lò vi sóng ở mức công suất 475W trong 22 phút, lặp lại 3 lần.

Hỗn hợp dịch sau khi chiết (C1) được lọc và thu được dịch phenolic và hỗn hợp bã rắn (B1). Dịch phenolic được cô đặc dưới áp suất giảm thu được hỗn hợp cao chiết phenolic.

Bước 3: Chiết fuicoidan bằng siêu âm kết hợp ly tâm tốc độ cao

Hỗn hợp bã rắn B1 được bổ sung nước khử ion (tỉ lệ 10ml : 1g bã rắn) và tiến hành siêu âm với công suất 58W/cm² ở 40°C trong 3 phút. Lọc hỗn hợp sau siêu âm thu được dịch chiết (C2) và bã rắn (B2).

Dịch chiết (C2) được bổ sung CaCl₂ 0,8%, khuấy đều trong 1 giờ sau đó ly tâm thu được pha lỏng (C3) và bã rắn (B3). Pha lỏng C3 được cô đặc đến 1/3 thể tích sau đó bổ sung etanol 96⁰ (tỷ lệ so với dịch cô đặc là 7ml : 10 ml), để yên trong 1 giờ rồi ly tâm ở tốc độ 10.000 rpm thu được pha rắn (R1), đem tinh chế lại thu được fuicoidan sạch.

Bước 4: Chiết alginate bằng siêu âm, tẩy màu, thu chế phẩm Canxi alginate

Bã rắn B2 được thủy phân cellulose bằng enzyme Htec2 ở nồng độ 1,5% (enzyme/ cơ chất), điều chỉnh pH trong khoảng 4,5 – 5, nhiệt độ 45°C trong 6 giờ. Kết thúc quá trình thủy phân, hỗn hợp được để nguội đến nhiệt độ phòng, tiến hành lọc, ly tâm thu được pha rắn (R2) và dịch thải (C4).

Pha rắn R2 được gom chung với bã rắn B3, thu được hỗn hợp rắn R3, đem xử lý với dung dịch HCl 0,1 M (tỷ lệ 1/3) ở 25°C, lọc hỗn hợp thu lấy phần chất rắn. Phần chất rắn được rửa lại bằng nước sạch rồi bổ sung 2% dung dịch Na₂CO₃ 5%, siêu âm với công suất 58 W/cm² ở 60°C trong 6 phút. Để nguội hỗn hợp đến nhiệt độ phòng sau đó tiến hành lọc để thu được dung dịch alginate thô và bã rắn B4.

Dung dịch alginate thô được bổ sung từ từ dung dịch H₂O₂ 5% theo tỉ lệ 2%, khuấy đều trong 15 phút rồi bổ sung từ từ dung dịch CaCl₂ 10% theo tỷ lệ 2/1; để lắng trong 2 giờ rồi tiến hành lọc và sấy khô thu được sản phẩm Canxi alginate.

Bước 5: Xử lý phụ phẩm tạo phân hữu cơ vi lượng

Gom dịch thải C4 với bã thải B4 thành dịch bã thải C5, đem xử lý với chế phẩm vi sinh S.EM, ổn định pH và ủ trong 6 tuần để thu được chế phẩm phân bón hữu cơ vi lượng.

Bảng 3.34. Hiệu quả sản xuất ở quy mô 5 kg nguyên liệu rong/mẻ

Mẻ sản xuất	Khối lượng nguyên liệu (kg)	Khối lượng bột Canxi alginate (g)	Hàm lượng alginate (%)	Hàm lượng canxi (%)	Khối lượng fucoidan (g)	Khối lượng cao chiết Phenolic (g)
1	5	212	80,1	5,8	14,5	8,50
2	5	209	81,2	6,2	15,1	8,81
3	5	209	80,23	5,7	15,0	8,49
4	5	214	81,5	5,5	14,8	8,53
5	5	210	80,9	5,7	15,2	8,55
6	5	213	81,3	6,1	15,5	8,48
7	5	212	81,5	6,0	14,9	8.52
8	5	215	81,7	6,3	15,3	8.50
9	5	218	82,0	6,2	14,8	8,54
10	5	220	80,6	5,9	15,2	8,53



Hình 3.43. Chế phẩm bột Canxi alginate

3.7.2. Đánh giá hiệu quả các quá trình chiết xuất

3.7.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của việc tích hợp các kỹ thuật tiên tiến khác nhau đến hiệu suất chiết

Tiến hành khảo sát một số phương án nhằm mục đích nghiên cứu sự ảnh hưởng của việc tích hợp các kỹ thuật tiên tiến khác nhau đến hiệu quả chiết xuất.

- *Phương án 1*: Quy trình chiết như sơ đồ 3.42, mục đích thu đồng thời các sản phẩm phenolic, fucoidan và alginat không dùng vi sóng, siêu âm và enzyme.

- *Phương án 2*: Quy trình chiết như sơ đồ 3.42, mục đích thu đồng thời các sản phẩm phenolic, fucoidan và alginat, sử dụng enzyme, không dùng vi sóng, siêu âm.

- *Phương án 3*: Quy trình chiết như sơ đồ 3.42, mục đích thu đồng thời các sản phẩm phenolic, fucoidan và alginat, sử dụng tích hợp kỹ thuật siêu âm, vi sóng và không dùng enzyme.

- *Phương án 4*: Quy trình chiết như sơ đồ 3.42, mục đích thu đồng thời các sản phẩm phenolic, fucoidan và alginat, sử dụng tích hợp kỹ thuật siêu âm và enzyme, không dùng vi sóng

- *Phương án 5*: Quy trình chiết như sơ đồ 3.42, mục đích thu đồng thời các sản phẩm phenolic, fucoidan và alginat, sử dụng tích hợp kỹ thuật vi sóng, siêu âm và enzyme.

Bảng 3.35. Hiệu suất chiết theo các phương án kỹ thuật khác nhau

Phương án	Hàm lượng sản phẩm (% tính theo lượng khô của nguyên liệu)		
	Phenolic tổng	fucoidan	alginate
1: Chiết không dùng vi sóng, siêu âm, enzyme	0,015	1,23	8,24
2: Chiết dùng enzyme, không dùng siêu âm và vi sóng	0,088	1,97	16,6
3: Chiết dùng siêu âm, vi sóng và không dùng enzyme	0,112	2,51	24,5
4: Chiết dùng siêu âm và enzyme, không dùng vi sóng	0,182	2,78	28,7
5: Chiết tích hợp dùng vi sóng, siêu âm, enzyme	0,174	2,83	32,2

Nhận xét: Việc tích hợp các kỹ thuật tiên tiến nâng cao rõ rệt hiệu quả chiết. Phương án 4 (chiết sử dụng siêu âm, enzyme) và phương án 5 (tích hợp vi sóng,

siêu âm, enzyme) cho hiệu quả chiết tốt nhất, trong đó Phương án 4 chiết phenolic tổng cao hơn (0,182%) nhưng Phương án 5 lại giúp chiết fucoidan và alginate tốt hơn (lần lượt là 2,83% và 32,2%).

3.7.2.2. So sánh hiệu suất chiết với một số nghiên cứu khác đã được công bố

Đức Giang và Cs (2016) đã tiến hành nghiên cứu chiết alginate bằng một số phương pháp khác nhau, kết quả cho thấy hiệu suất chiết alginate dao động trong khoảng từ 12,13 - 35,87% [127]. Nguyễn Văn Nguyễn Văn Nguyễn (2018) chiết xuất Fucoïdan theo phương pháp của Bilan và Cs đối với một số loài rong Nâu sinh trưởng ở Nha Trang, kết quả cho thấy hàm lượng Fucoïdan chiết xuất được dao động trong khoảng từ 1,98 - 3,7% [128]. Võ Mai Như Hiếu (2014), chiết xuất Phenolic tổng từ một số loài rong Nâu khác nhau, kết quả cho thấy hàm lượng phenolic dao động từ 0,089 đến 0,44% tùy theo loài rong và vị trí lấy mẫu [57].

Kết quả so sánh hiệu suất chiết theo sơ đồ 3.42 với các nghiên cứu khác được trình bày tại bảng 3.36.

Bảng 3.36. So sánh hiệu suất chiết với một số nghiên cứu khác

Phương án chiết xuất	Phenolic tổng	Fucoïdan	Alginate
Theo kết quả nghiên cứu của Lê Đức Giang và Cs [127]	-	-	12,13-35,87%
Theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Nguyễn [128]	-	1,98-3,7%	-
Theo kết quả nghiên cứu của Võ Mai Như Hiếu [57]	0,089 - 0,44%	-	-
Sử dụng công nghệ tích hợp	0,1704 – 0,182%	2,78 – 2,83%	28,7 – 32,2%

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

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

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

2. Kết quả sàng lọc ảo *in silico docking* cho thấy hợp chất difucodiphloretol-A được phân lập từ chi rong Mơ có tiềm năng trong phát triển thuốc ức chế enzyme tyrosinase để phát triển sản phẩm làm trắng da.

3. Kết quả nghiên cứu, đánh giá việc tích hợp các kỹ thuật tiên tiến (enzyme, siêu âm, vi sóng, ly tâm tốc độ cao...) để xây quy trình công nghệ chiết xuất và chế biến toàn diện rong Mơ đem lại khả năng thu hồi đồng bộ, hiệu suất cao đối với các sản phẩm như phenolic, fucoidan, alginate từ nguồn nguyên liệu rong Nâu dồi dào, có sẵn trong tự nhiên; đồng thời, bã thải được nghiên cứu sử dụng làm phân hữu cơ vi lượng, giúp hạn chế tối đa chất thải, góp phần bảo vệ môi trường và nâng cao giá trị sử dụng của rong Nâu.

4. Kết quả nghiên cứu, xây dựng quy trình công nghệ chiết xuất phenolic từ loài *swartzii* thuộc chi rong Mơ (*Sargassum*), ngành rong Nâu theo phương pháp vi sóng và tối ưu hóa điều kiện chiết xuất phenolic bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) cho thấy: Ở nồng độ etanol 55%, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu = 35/1 (v/w); thời gian chiết 65 phút và công suất lò vi sóng là 475W thì hàm lượng phlorotannin thu được là $1,50 \pm 0,12$ mgGAE/g; khối lượng cao chiết là $8,52 \pm 0,11$ mg, chênh lệch không đáng kể so với giá trị tối ưu được dự đoán, phù hợp với những phân tích từ phần mềm Design expert 7.0. Kết quả thử hoạt tính chống oxy hóa và gây độc tế bào *in vitro* của phenolic thu được ở mức trung bình.

5. Đã nghiên cứu quá trình tích hợp một số công nghệ tiên tiến để thu nhận alginate và sản xuất chế phẩm Canxi alginate ở quy mô mini pilot; đã tiến hành đánh giá hoạt tính chống loãng xương, độ an toàn và hiệu lực của chế phẩm Canxi alginate. Kết quả cho thấy: **(i)** Chế phẩm không ghi nhận gây độc tính ở liều kiểm định; **(ii)** Ở nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$ và 4 $\mu\text{g/ml}$, chế phẩm Canxi alginate thể hiện có khả năng tăng cường hoạt động của enzyme ALP, tăng cường tổng hợp collagen và kích thích tạo khoáng ở mức độ có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm; **(iii)** Chế phẩm alginate ghi nhận có tác dụng đào thải các kim loại nặng ở chuột khi sử dụng bắt đầu từ liều thử 0,1g/kg thể trọng của chuột.

Kiến nghị:

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

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Tran Quoc Toan, **Tran Duy Phong**, Dam Duc Tien, Nguyen Manh Linh, Nguyen Thi Mai Anh, Pham Thi Hong Minh, Le Xuan Duy, Do Huu Nghi, Hai Ha Pham Thi, Pham Tri Nhut, Ho Sy Tung, and Nguyen Quang Tung, 2021, Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phlorotannin From *Sargassum swartzii* (Turn.) C. Ag. With Etanol/Water, *Natural Product Communications*, 16 (2), pp. 1-11.
2. Trần Quốc Toàn, Phạm Quốc Long, Hoàng Thị Bích, **Trần Duy Phong**, Phạm Minh Quân, GPHI thuộc Bằng độc quyền Giải pháp hữu ích số 2606 “*Quy trình chế biến rong Mơ (Sargassum.SP) để thu các sản phẩm Fucoxanthin, Phlorotanin, Fucoidan và Alginate theo phương pháp sử dụng sóng siêu âm cường độ cao kết hợp enzym*”, cấp theo quyết định số 3750w/QĐ-SHTT, 08/3/2021, Cục sở hữu trí tuệ Việt Nam.
3. Đặng Thị Phương Ly, **Trần Duy Phong**, Trần Quốc Toàn, Đoàn Lan Phương, Trịnh Thu Hương, Đặng Thị Minh Tuyết, Đào Thị Kim Dung, Lại Phương Phương Thảo, Hoàng Thị Bích, Phạm Minh Quân, Đàm Đức Tiến, Lưu Văn Huyền, Phạm Quốc Long, 2019, Bước đầu đánh giá hàm lượng Lipid và thành phần Axit béo của một số loài rong Nâu khu vực biển Bắc và trung Trung Bộ - Việt Nam, *Tuyển tập hội nghị khoa học biển*, tr. 579-585.
4. Trịnh Thị Thu Hương, Đào Thị Kim Dung, Phạm Thu Huệ, Lê Tất Thành, Đỗ Thị Thảo, Nguyễn Thị Cúc, Phạm Minh Quân, Trần Quốc Toàn, **Trần Duy Phong**, Phạm Quốc Long, 2019, Đánh giá chỉ tiêu sinh hóa và hoạt tính chống loãng xương của hoạt chất canxi alginate từ nguồn rong biển Việt Nam, *Tuyển tập hội nghị khoa học biển*, tr. 572-578.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hakim M.M., Patel I.C., 2020, A review on phytoconstituents of marine brown algae, *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6 (129), pp. 1-11.
2. Kawai H., Henry E.C., 2016, Phaeophyta (Phaeophyta/ Heterokonta/ Ochrophyta), *Handbook of the Protists*, pp. 1-38.
3. Yoon H.S., Andersen R.A., Boo S.M., Bhattacharya, D., 2009, Stramenopiles, *In Encyclopedia of microbiology*, pp. 721-731.
4. Myklestad S.M., Granum E., 2009, Biology of (1, 3)- β -glucans and related glucans in protozoans and chromistans, *In Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*, Academic Press, pp. 353-385.
5. Đàm Đức Tiến, Trần Quốc Toàn, Phạm Quốc Long, 2020, *Các loài rong biển thường gặp ở vùng biển Việt Nam và giá trị sử dụng*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ.
6. Aizawa M., Asaoka K., Atsumi M., Sakao T., 2009, Seaweed Bioethanol Production in Japan, *the Ocean Sunrise Project*, Oceans.
7. Titlyano E. A., Titlyanova T. V., 2012, *Marine Plants of the asian Pacific region countries, their use and cultivation*, P. H. Vladivostok, Dalnauka, pp. 376.
8. Ito K., Hori K., 1989, Seaweed: chemical composition and potential food uses, *Food reviews international*, 5(1), pp. 101-144.
9. Holdt S.L., Kraan S., 2011, Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation, *Journal of Applied Phycology*, 23, pp. 543-597.
64. Beata Łabowska M., Michalak I., Detyna J., 2019, Methods of extraction, physicochemical properties of alginates and their applications in biomedical field—a review, *Open Chemistry*, 17(1), pp. 738-762.
11. Kimura Y., Watanabe K., Okuda H., 1996, Effects of soluble sodium alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 54, pp. 47-54.
12. Zee S., 1991, Body weight loss with the aid of alginic acid, *Archives of internal medicine*, 3, pp. 113-114.
13. Vaugelade P., Hoebler C., Bernard F., Guillon F., Lahaye M., Duee P.H., Darcy-Vrillon B., 2000, Non-starch polysaccharides extracted from seaweed can modulate intestinal absorption of glucose and insulin response in the pig, *Reproduction Nutrition Development*, 40, pp. 33-47.

14. Segal H.C., Hunt B.J., Gilding K., 1998, The effects of alginate and nonalginate wound dressings on blood coagulation and platelet activation, *Journal of Biomaterials Applications*, 12, pp. 249-257.

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

16. Li N., Zhang Q.B., Song J.M., 2005, Toxicological evaluation of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* in Wistar rats, *Food and Chemical Toxicology*, 43, pp. 421-426.

17. Wu X.W., Yang M.L., Huang X.L., Yan J., Luo Q., 2003, Effect of fucoidan on splenic lymphocyte apoptosis induced by radiation, *Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection*, 23, pp. 43-50.

18. Mandal P., Mateu C.G., Chattopadhyay K., Pujol C.A., Damonte E.B., Ray B., 2007, Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*, *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 18, pp. 153-162.

19. Iqbal M., Flick-Smith H., McCauley J.W., 2000, Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E-rns with cell surface glycosaminoglycans, *Journal of General Virology*, 81, pp. 451-459.

20. Li F., Tian T.C., Shi Y.C., 1995, Study on anti virus effect of fucoidan *in vitro*, *Journal of Norman Bethune University Of Medical Sciences*, 21, pp. 255-257.

21. Aisa Y., Miyakawa Y., Nakazato T., Shibata H., Saito K., Ikeda Y., Kizaki M., 2005, Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways, *American Journal of Hematology*, 78, pp. 7-14.

22. Xue C.H., Chen L., Li Z.J., Cai Y.P., Lin H., Fang Y., 2004, Antioxidative activities of low molecular fucoidans from kelp *Laminaria japonica*, *Developments in Food Science*, 42, pp. 139-145 .

23. Hu J.F., Geng M.Y., Zhang J.T., Jiang H.D., 2001, An *in vitro* study of the structure - activity relationships of sulfated polysaccharide from brown algae to its antioxidant effect, *Journal of Asian Natural Products Research*, 3, pp. 353-358.

24. Deville C., Damas J., Forget P., Dandrifosse G., Peulen O., 2004, Laminarin in the dietary fibre concept, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, pp. 1030-1038.

25. Miao H.Q., Elkin M., Aingorn E., Ishai-Michaeli R., Stein C.A., Vlodavsky I., 1999, Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides, *International Journal of Cancer*, 83 (3), pp. 424-431.

26. Bhaskar N., Hosokawa M., Miyashita K., 2004, Comparative evaluation of fatty acid composition of different Sargassum (Fucales, Phaeophyta) species harvested from temperate and tropical waters, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13 (4), pp. 53-70.

27. Dembitsky V.M., Rozentsvet O.A., Elena E.P., 1990, Glycolipids, phospholipids and fatty acids of brown algae species, *Phytochemistry*, 29 (11), pp. 3417-3421.

28. Maeda H., Hosokawa M., Sashima T., Miyashita K., 2008, Antiobesity effect of fucoxanthin from edible seaweeds and its multibiological functions, *ACS Symposium Series*, 993, pp. 376-388

29. Haugan J.A., Liaaen-Jensen S., 1989, Improved isolation procedure for fucoxanthin. *Phytochemistry*, 28 (10), pp. 2797-2798.

30. Nakazawa Y., Sashima T., Hosokawa M., Miyashita K., 2009, Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomers of fucoxanthin in human cancer cell lines, *Journal of Functional Foods*, 1 (1), pp. 88-97.

31. Kotake-Nara E., Kushiro M., Zhang H., Sugawara T., Miyashita K., Nagao A., 2001, Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells, *The Journal of Nutrition*, 131 (12), 3303-3306.

32. Okuzumi J., Takahashi T., Yamane T., Kitao Y., Inagake M., Ohya K., Nishino H., Tanaka Y., 1993, Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mouse duodenal carcinogenesis, *Cancer Letters*, 68 (2-3), pp.159-168.

33. Miyashita H., Hosokawa M., 2008, Beneficial health effects of seaweed carotenoid, fucoxanthin, *Barrow C, Shahidi F (eds) Marine nutraceuticals and functional foods*, CRC, Boca Raton, pp. 297-320.

34. Hosokawa M., Wanezaki S., Miyauchi K., Kunihara H., Kohno H., Kawabata J., Odashima S., Takahashi K., 1999, Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell line HIL-60, *Food Science and Technology Research*, 5 (3), pp. 243-246.

35. Maeda H., Hosokawa M., Sashima T., Funayama K., Miyashita K., 2005, Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332 (2), pp. 392-397.
36. Heo S.J., Park E.J., Lee K.W., Jeon Y.J., 2005, Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds, *Bioresource Technology*, 96 (14), pp. 1616-1623.
37. Chkikvishvili I.D., Ramazanov Z.M., 2000, Phenolic substances of brown algae and their antioxidant activity, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36 (3), pp. 289-291.
38. Eide I., Myklestad S., Melson S., 1980, Long-term uptake and release of heavy metals by *Ascophyllum nodosum* (L) le jol. (phaeophyceae) *in situ*, *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 23 (1), pp.19-28.
39. Nagayama K., Iwamura Y., Shibata T., Hirayama I., Nakamura T., 2002, Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50 (6), pp. 889-893.
40. Kang H.S., Kim Y.T., Byun H.G., Son B.W., Jung H.A., Choi J.S., 2004, Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation, *Archives of Pharmacal Research*, 27, pp. 194-198.
41. Kang K., Park Y., Hwang H.J., Kim S.H., Lee J.G., Shin H.C., 2003, Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agent against vascular risk factors, *Archives of Pharmacal Research*, 26, pp. 286-293.
42. Swanson A.K., Druehl L.D., 2002, Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins, *Aquatic Botany*, 73 (3), pp. 241-253.
43. Nabors L.O.B., 2004, Alternative sweeteners, *Agro Food Industry HiTech*, 15 (4), pp. 39-41.
44. Fleurence J., 2004, Seaweed proteins, *Yada RY (ed) Proteins in food processing*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 197-213.
45. Dawczynski C., Schubert R., Jahreis G., 2007, Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products, *Food Chemistry*, 103 (3), pp. 891-899.
46. Fujiwara-Arasaki T., Mino N., Kuroda M., 1984, The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan, *Hydrobiologia*, 116, pp 513-516.

47. Rhein-Knudsen N., Ale M. T., Meyer A. S., 2015, Seaweed hydrocolloid production: an update on enzyme assisted extraction and modification technologies, *Marine Drugs*, 13(6), pp. 3340-3359.

48. Saji S., Hebden A., Goswami P., Du C., 2022, A brief review on the development of alginate extraction process and its sustainability, *Sustainability*, 14(9), pp. 5181.

49. Phạm Quốc Long, Đoàn Lan Phương, NCS.Lưu Văn Huyền, Chăm Thị Ính, Chu Quang, 2009, *Nghiên cứu quy trình tạo chế phẩm Catosal từ rong Nâu làm thực phẩm chức năng có tác dụng đào thải kim loại nặng*, Báo cáo tổng kết đề tài, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

50. Chew Y.L., Lim Y.Y., Omar M., Khoo K.S., 2008, Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia, *LWT - Food Science and Technology*, 41 (6), pp. 1067-1072.

51. López A., Rico M., Rivero. A., de Tangil M.S., 2011, The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts, *Food Chemistry*, 125, pp. 1104-1109

52. Otero P., López-Martínez M.I., García-Risco M., 2019, Application of pressurized liquid extraction (PLE) to obtain bioactive fatty acids and phenols from *Laminaria ochroleuca* collected in Galicia (NW Spain), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164, pp. 86-92.

53. Machu L., Misurcova L., Vavra Ambrozova J., Orsavova J., Mlcek J., Sochor J., Jurikova T., 2015, Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products, *Molecules*, 20 (1) , pp. 1118-1133.

54. Del Pilar Sánchez-Camargo A., Montero L., Stiger-Pouvreau V., Tanniou A., Cifuentes A., Herrero M., Ibáñez E., 2016, Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae, *Food Chemistry*, 192, pp. 67-74.

55. Airanthi M.K., Hosokawa M., Miyashita K., 2011, Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds, *Journal of Food Science*, 76 (1), pp. C104-C111.

56. Meng W., Mu T., Sun H., Garcia-Vaquero M., 2021, Phlorotannins: A review of extraction methods, structural characteristics, bioactivities, bioavailability, and future trends, *Algal Research*, 60, 102484.

57. Võ Mai Như Hiếu, 2014, *Nghiên cứu xây dựng quy trình tách chiết và sàng lọc các chất phenolic có hoạt tính sinh học từ rong Nâu tại vùng biển Nam Trung bộ*, Luận án tiến sĩ Hóa học, Học Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội.

58. Ale M. T, Meyer A. S., 2013, Fucoidans from brown seaweeds: An update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation, *Rsc Advances*, 3(22), pp. 8131-8141.

59. Dobrinčić A., Balbino S., Zorić Z., Pedisić S., Bursać Kovačević D., Elez Garofulić I., Dragović-Uzelac V., 2020, Advanced technologies for the extraction of marine brown algal polysaccharides, *Marine Drugs*, 18(3), pp. 168.

60. January G.G., Naidoo R.K., Kirby-McCullough B., Baue R., 2019, Assessing methodologies for fucoidan extraction from South African brown algae, *Algal Research*, 40, 101517.

61. Liu J., Wu S.Y., Chen L., Li Q.J., Shen Y.Z., Jin L., Zhang X., Chen P.C., Wu M.J., Choi J., Tong H.B., 2019, Different extraction methods bring about distinct physicochemical properties and antioxidant activities of *Sargassum fusiforme* fucoidans, *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, pp. 1385-1392.

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

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

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

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

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

67. Lourenço-Lopes C., Garcia-Oliveira P., Carpena M., Fraga-Corral M., Jimenez-Lopez C., Pereira A. G., Prieto M.A., Simal-Gandara J., 2020, Scientific

approaches on extraction, purification and stability for the commercialization of fucoxanthin recovered from brown algae, *Foods*, 9 (8), pp. 1113.

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

69. Kanda H., Kamo Y., Machmudah S., Wahyudiono, Goto M., 2014, Extraction of fucoxanthin from raw macroalgae excluding drying and cell wall disruption by liquefied dimethyl ether, *Marine Drugs*, 12 (5), pp. 2383-2396.

70. Foo S. C., Khoo K. S., Ooi C. W., Show P. L., Khong N. M., Yusoff F. M., 2021, Meeting sustainable development goals: Alternative extraction processes for fucoxanthin in algae, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 546067.

71. Youssouf L., Lallemand L., Giraud P., Soulé F., Bhaw-Luximon A., Meilhac O., D'Hellencourt C.L., Jhurry D., Couprie J., 2017, Ultrasound-assisted extraction and structural characterization by NMR of alginates and carrageenans from seaweeds, *Carbohydrate Polymers*, 166 (4), pp. 55-63.

72. Ummat V., Tiwari B.K., Jaiswal A.K., Condon K., Garcia-Vaquero M., O'Doherty J., O'Donnell C., Rajauria G., 2020, Optimisation of ultrasound frequency, extraction time and solvent for the recovery of polyphenols, phlorotannins and associated antioxidant activity from brown seaweeds, *Marine Drugs*, 18 (5), pp. 250.

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

74. Suprunchuk V., 2021, Ultrasonic-treated fucoidan as a promising therapeutic agent, *Polymers in Medicine*, 51(2), pp. 85-90.

75. Wan P., Yang X. M., Cai B. N., Chen H., Sun H. L., Chen D. K., Pan J. Y., 2015, Ultrasonic extraction of polysaccharides from *Laminaria japonica* and their antioxidative and glycosidase inhibitory activities, *Journal of Ocean University of China*, 14(4), pp. 651-662.

76. Flórez-Fernández N., López-García M., González-Muñoz M.J., López Vilariño J.M., Domínguez H., 2017, Ultrasound-assisted extraction of fucoidan from *Sargassum muticum*, *Journal of Applied Phycology*, 29 (3), pp. 1553-1561.

77. Hanjabam M.D., Kumar A., Tejpal C.S., Krishnamoorthy E., Kishore P., Kumar K.A., 2019, Isolation of crude fucoidan from *Sargassum wightii* using conventional and ultra-sonication extraction methods, *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 20 (11), 100200.

78. Alboofetileh M., Rezaei M., Tabarsa M., You S., 2019, Ultrasound-assisted extraction of sulfated polysaccharide from *Nizamuddinina zanardinii*: Process optimization, structural characterization, and biological properties, *Journal of Food Process Engineering*, 42 (2), pp. 1-13.

79. Okolie C.L., Mason B., Mohan A., Pitts N., Udenigwe C.C., 2019, The comparative influence of novel extraction technologies on *in vitro* prebiotic-inducing chemical properties of fucoidan extracts from *Ascophyllum nodosum*, *Food Hydrocoll*, 90, pp. 462-471.

80. My P.L.T., Sung V.V., Dat T.D., Nam H.M., Phong M.T., Hieu N.H., 2020, Ultrasound-assisted extraction of fucoidan from Vietnamese brown seaweed *Sargassum mcclurei* and testing bioactivities of the extract, *ChemistrySelect*, 5 (14), pp. 4371-4380.

81. Alboofetileh M., Rezaei M., Tabarsa M., You S.G., 2019, Bioactivities of *Nizamuddinina zanardinii* sulfated polysaccharides extracted by enzyme, ultrasound and enzyme-ultrasound methods, *Journal of Food Science and Technology*, 56 (12), pp. 1212-1220.

82. Alboofetileh M., Rezaei M., Tabarsa M., Rittà M., Donalisio M., Mariatti F., You S.G., Lembo D., Cravotto G., 2019, Effect of different non-conventional extraction methods on the antibacterial and antiviral activity of fucoidans extracted from *Nizamuddinina zanardinii*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, pp. 131-137.

83. Raguraman V., MubarakAli D., Narendrakumar G., Thirugnanasambandam R., Kirubakaran R., Thajuddin N., 2018, Unraveling rapid extraction of fucoxanthin from *Padina tetrastratica*: Purification, characterization and biomedical application, *Process Biochemistry*, 73, pp. 211-219.

84. Eom S.J., Kim Y.E., Kim J.E., Park J., Kim Y.H., Song K.-M., Lee N.H., 2020, Production of *Undaria pinnatifida* sporophyll extract using pilot-scale ultrasound-assisted extraction: Extract characteristics and antioxidant and anti-inflammatory activities, *Algal Research*, 51, 102039.

85. Borazjani N.J., Tabarsa M., You S., Rezaei M., 2017, Effects of extraction methods on molecular characteristics, antioxidant properties and immunomodulation of alginates from *Sargassum angustifolium*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, pp. 703–711.

86. Okolie C.L., Mason B., Mohan A., Pitts N., Udenigwe C.C., 2020, Extraction technology impacts on the structure-function relationship between sodium alginate extracts and their in vitro prebiotic activity, *Food Bioscience*, 37, 100672.

87. Kadam S.U., Tiwari B.K., O'Donnell C.P., 2013, Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, pp. 4667-4675.

88. Lee S.H., Park M.H., Han J.S., Jeong Y., Kim M., Jeon Y.J., 2012, Bioactive compounds extracted from gamtae (*Ecklonia cava*) by using enzymatic hydrolysis, a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice, *Food Science and Biotechnology*, 21 (4), pp. 1149-1155.

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

90. Puspita M., D'eniél M., Widowati I., Radjasa O.K., Douzenel P., Marty C., Vandanjon L., Bedoux G., Bourgougnon N., 2017, Total phenolic content and biological activities of enzymatic extracts from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, *Journal of Applied Phycology*, 29, pp. 2521-2537.

91. Siriwardhana N., Kim K., Lee K., Kim S., Ha J., Song C.B., Lee J., Jeon Y., 2008, Optimisation of hydrophilic antioxidant extraction from *Hizikia fusiformis* by integrating treatments of enzymes, heat and pH control, *International Journal of Food Science & Technology*, 43, pp. 587-596.

92. Alboofetileh M., Rezaei M., Tabarsa M., 2018, Enzyme-assisted extraction of *Nizamuddinina zanardinii* for the recovery of sulfated polysaccharides with anticancer and immune-enhancing activities, *Journal of Applied Phycology*, 31, pp. 1391-1402.

93. Hammed A.M., Jaswir I., Simsek S., Alam Z., Amid A., 2017, Enzyme aided extraction of sulfated polysaccharides from *Turbinaria turbinata* brown seaweed, *International Food Research Journal*, 24, pp. 1660-1666.

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

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

96. Shannon E., Abu-Ghannam N., 2018, Enzymatic extraction of fucoxanthin from brown seaweeds, *International Journal of Food Science & Technology*, 53, pp. 2195-2204.

97. Billakanti J.M., Catchpole O.J., Fenton T.A., Mitchell K.A., Mackenzie A.D., 2013, Enzyme-assisted extraction of fucoxanthin and lipids containing polyunsaturated fatty acids from *Undaria pinnatifida* using dimethyl ether and ethanol, *Process Biochem*, 48, pp. 1999-2008.

98. Yuan Y., Macquarrie D.J., 2015, Microwave assisted step-by-step process for the production of fucoidan, alginate sodium, sugars and biochar from *Ascophyllum nodosum* through a biorefinery concept, *Bioresource Technology*, 198, pp. 819-827.

99. Torabi P., Hamdami N., Keramat J., 2022, Microwave-assisted extraction of sodium alginate from brown macroalgae *Nizimuddinia zanardini*, optimization and physicochemical properties, *Separation Science and Technology*, 57, pp. 872-885.

100. Magnusson M., Yuen A.K.L., Zhang R., Wright J.T., Taylor R.B., Maschmeyer T., de Nys R., 2017, A comparative assessment of microwave assisted (MAE) and conventional solid-liquid (SLE) techniques for the extraction of phloroglucinol from brown seaweed, *Algal Research*, 23, pp. 28-36.

101. Grosso C., Valentão P., Ferreres F., Andrade P.B., 2015, Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds, *Marine Drugs*, 13, pp. 3182-3230.

102. Rodriguez-Jasso R.M., Mussatto S.I., Pastrana L., Aguilar C.N., Teixeira J.A., 2011, Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed, *Carbohydrate Polymers*, 86, pp. 1137-1144.

103. Du B., Zhao Q., Cheng C., Wang H., Liu Y., Zhu F., Yang Y., 2022, A critical review on extraction, characteristics, physicochemical activities, potential health benefits, and industrial applications of fucoida, *EFood*, 3(4), e19.

104. Lorbeer A. Z., Lahnstein J., Fincher G. B., Su P., Zhang W., 2015, Kinetics of conventional and microwave-assisted fucoidan extractions from the brown alga, *Ecklonia radiata*, *Journal of Applied Phycology*, 27 (5), pp. 2079-2087.

105. Yuan Y., Macquarrie D., 2015, Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity, *Carbohydrate Polymers*, 129, pp. 101-107.

106. Ren B., Chen C., Li C., Fu X., You L., Liu R.H., 2017, Optimization of microwave-assisted extraction of *Sargassum thunbergii* polysaccharides and its antioxidant and hypoglycemic activities, *Carbohydrate Polymers*, 173, pp. 192-201.

107. Xiao X., Si X., Yuan Z., Xu X., Li G., 2012, Isolation of fucoxanthin from edible brown algae by microwave-assisted extraction coupled with high-speed countercurrent chromatography, *Journal of Separation Science*, 35, pp. 2313-2317.

108. Quitain A.T., Kai T., Sasaki M., Goto M., 2013, Supercritical carbon dioxide extraction of fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*, *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 61 (24), pp. 5792-5797.

109. Xu S., Liao W., Chen W., Kang B., Chen J., Lin Y., 2018, Study of Microwave Synergistic Enzyme Method for Extraction from *Laminaria Japonica* by Response Surface Methodology, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 146, 012077.

110. Saravana P.S., Cho Y.J., Park, Y.B., Woo H.C., Chun B.S., 2016, Structural, antioxidant, and emulsifying activities of fucoidan from *Saccharina japonica* using pressurized liquid extraction, *Carbohydrate Polymers*, 153, pp. 518-525.

111. Tierney M.S., Smyth T.J., Hayes M., Soler-Vila A., Croft A.K., Brunton N., 2013, Influence of pressurised liquid extraction and solid-liquid extraction methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalgae, *International Journal of Food Science & Technology*, 48, pp. 860-869.

112. Saravana P.S., Cho Y.J., Park Y.B., Woo H.C., Chun B.S., 2016, Structural, antioxidant, and emulsifying activities of fucoidan from *Saccharina japonica* using pressurized liquid extraction, *Carbohydrate Polymers*, 153, pp. 518-525.

113. Saravana P.S., Choi J.H., Park Y.B., Woo H.C., Chun B.S., 2016, Evaluation of the chemical composition of brown seaweed (*Saccharina japonica*) hydrolysate by pressurized hot water extraction, *Algal Research*, 13, pp. 246-254.
114. Shang Y.F., Kim S.M., Lee W.J., Um B.H., 2011, Pressurized liquid method for fucoxanthin extraction from *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111 (2), pp. 237-241.
115. Sugiono S., Masruri M., Estiasih T., Widjanarko S.B., 2019, Optimization of extrusion-assisted extraction parameters and characterization of alginate from brown algae (*Sargassum cristaefolium*), *Journal of Food Science and Technology*, 56, pp. 3687-3696.
116. Dobrinčić A., Balbino S., Zorić Z., Pedisić S., Bursać Kovačević D., Elez Garofulić I., Dragović-Uzelac V., 2020, Advanced technologies for the extraction of marine brown algal polysaccharides, *Marine Drugs*, 18 (3), pp. 168.
117. Miyashita K., Beppu F., Hosokawa M., Liu X., Wang S., 2020, Bioactive significance of fucoxanthin and its effective extraction, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101639.
118. Conde E., Moure A., Domínguez H., 2015, Supercritical CO₂ extraction of fatty acids, phenolics and fucoxanthin from freeze-dried *Sargassum muticum*, *Journal of Applied Phycology*, 27 (2), pp. 957-964.
119. Roh M.K., Uddin M.S., Chun B.S., 2008, Extraction of fucoxanthin and polyphenol from *Undaria pinnatifida* using supercritical carbon dioxide with Co-solvent, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13 (6), pp. 724-729.
120. Sivagnanam S.P., Yin S., Choi J.H., Park Y.B., Woo H.C., Chun B.S., 2015, Biological properties of fucoxanthin in oil recovered from two brown seaweeds using supercritical CO₂ extraction, *Marine Drugs*, 13, pp. 3422-3442.
121. Saravana P.S., Getachew A.T., Cho Y.-J., Choi J.H., Park Y.B., Woo H.C., Chun B.S., 2017, Influence of co-solvents on fucoxanthin and phlorotannin recovery from brown seaweed using supercritical CO₂, *The Journal of Supercritical Fluids*, 120, pp. 295-303.
123. De Caprio A. P., 2008, The Toxicology of Hydroquinone - Relevance to Occupational and Environmental Exposure, *Critical Reviews in Toxicology*, 29 (3), pp. 283-330.
124. Yagi A., Kanbara T., Morinobu N., 2007, Inhibition of Mushroom - Tyrosinase by *Aloe* Extract, *Planta Medica*, 53 (06), pp. 515-517.

125. Da Silva Rocha S. F. L., Olanda C. G., Fokoue H. H., Sant'Anna C. M. R., 2019, Virtual Screening Techniques in Drug Discovery: Review and Recent Applications, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19 (19), pp. 1751-1767.

126. Slater O., Kontoyianni M., 2019, The compromise of virtual screening and its impact on drug discovery, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14 (7), pp. 619-637.

127. Lê Đức Giang, Lê Thị Thủy, 2016, Chiết xuất alginate từ rong Nâu (*Sargassum Polycystum*) bằng một số phương pháp khác nhau, *Tạp chí Khoa học Đại học sư phạm Tp. Hồ Chí Minh*, số 12 (90), tr. 52-59.

128. Nguyễn Văn Nguyên, 2018, *Nghiên cứu đặc điểm cấu trúc và hoạt tính sinh học của Fucoidan từ một số loài rong Nâu Việt Nam*, Luận án tiến sĩ Hóa học, Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội.

PHỤ LỤC

1. Hàm lượng alginate trong một số mẫu rong Nâu được khảo sáti
2. Hàm lượng axit béo trong một số mẫu rong Nâu được khảo sátiv
3. Danh sách chất phân lập từ chi rong Mơvi
4. Kết quả dự đoán năng lượng liên kết của các hợp chất với enzyme tyrosinase xviii
5. Kết quả thử nghiệm tác dụng đào thải kim loại nặng của Canxi algenate.....xx

Phụ lục 1. Hàm lượng alginate trong một số mẫu rong Nâu được khảo sát

TT	Ký hiệu mẫu	Tên KH	Địa điểm thu mẫu	Hàm lượng alginate (%)
1	RB01 QN-CT	<i>S. polycystum</i>	Quảng Ninh – Cô Tô	34,2 ± 0,5
2	RB02 QN-CT	<i>S.mcclurei</i>	Quảng Ninh – Cô Tô	36,1 ± 0,3
3	RB03 QN-CT	<i>S. swartzii</i>	Quảng Ninh – Cô Tô	34,5 ± 0,7
4	RB04 QN-CT	<i>S. polycystum</i>	Quảng Ninh – Cô Tô	32,5 ± 0,4
5	RB02 QB-HL	<i>P.boryana</i>	QB-Hòn La	25,6 ± 0,9
6	RB03 QB-HL	<i>S. polycystum</i>	QB-Hòn La	28,7 ± 0,5
7	RB04 QB-HL	<i>Sargassum</i> sp.	QB-Hòn La	33,5 ± 0,3
8	RB01 VM-RD	<i>Sargassum</i> sp.	Vĩnh Mốc – Rạn Đá	31,6 ± 0,2
9	RB02 VM-RD	<i>P. boryana</i>	Vĩnh Mốc – Rạn Đá	26,7 ± 0,7
10	RB03 VM-RD	<i>S. gracillimum</i>	Vĩnh Mốc – Rạn Đá	36,2 ± 0,6
11	RB04 VM-RD	<i>D. dichotoma</i>	Vĩnh Mốc – Rạn Đá	27,5 ± 0,6
12	RB 01 MC1-HM	<i>Laminaria</i> sp.	Mặt Cắt I – Hòn Mê	28,1 ± 0,9
13	RB 02 MC1-HM	<i>Sargassum</i> sp.	Mặt Cắt I – Hòn Mê	34,8 ± 0,3
14	RB 04 HV-SC-BC	<i>Sargassum</i> sp.1	Hải Vân-Sơn Chà-Bãi Chuối	29,2 ± 0,4
15	RB 02 HV-SC-MTL	<i>Laminaria</i> sp.1	Hải Vân-Sơn Chà-Mũi Thô Lô	32,7 ± 0,5
15	RB 1(1)HT-CLC	<i>Turbinaria</i> sp.	Hòn Tai-Cù Lao Chàm	37,3 ± 0,3
17	RB 03 LS	<i>S. kjellmanianum</i>	Lý Sơn	38,6 ± 0,6
18	RB 06 LS	<i>Sargassum</i> sp.3	Lý Sơn	34,2 ± 0,4
19	RB 07 LS	<i>D. dichotoma</i>	Lý Sơn	25,8 ± 0,8
20	RB 08 LS	<i>T. turbinata</i>	Lý Sơn	40,5 ± 0,9
21	RB 09 LS	<i>S. tenerrimum</i>	Lý Sơn	29,7 ± 0,4
22	RB 01 - NT	<i>S.mcclurei</i>	Nha Trang	35,1 ± 0,2
23	RB 02 - NT	<i>S. polycystum</i>	Nha Trang	32,9 ± 0,5
24	RB 03 - NT	<i>S. swartzii</i>	Nha Trang	36,0 ± 0,5
25	RB 04 - NT	<i>S. quinthoneness</i>	Nha Trang	38,7 ± 0,3

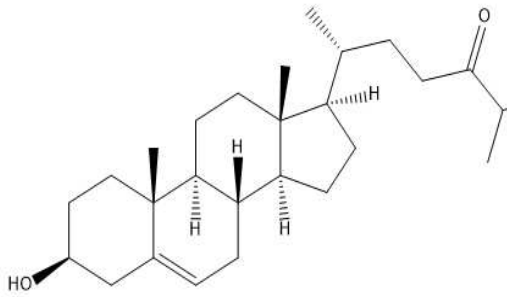
26	RB 05 - NT	<i>Sargassum</i> sp.4	Nha Trang	33,8 ± 0,7
27	RB 06 - NT	<i>S. swartzii</i>	Nha Trang	34,5 ± 0,4
28	RB 06 - NT	<i>S.mcclurei</i>	Nha Trang	32,8 ± 0,5
29	RB 01 - TS	<i>D. dichotoma</i>	Trường Sa	27,5 ± 0,2
30	RB 02 - TS	<i>T. turbinata</i>	Trường Sa	38,6 ± 0,5
31	RB 02 - TS	<i>Sargassum</i> sp.5	Trường Sa	32,5 ± 0,3
32	RB 02 - TS	<i>S. swartzii</i>	Trường Sa	35,0 ± 0,6

Phụ lục 2. Hàm lượng axit béo trong một số mẫu rong Nâu được khảo sát

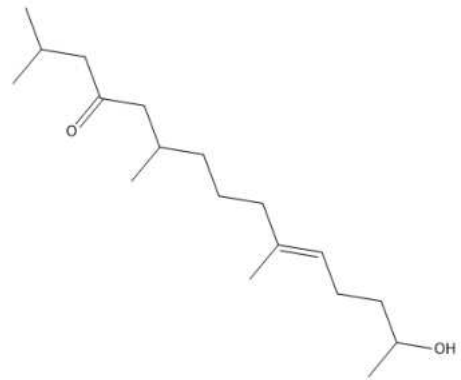
Mã	SFA	USFA	MUFA	PUFA	Axit n-3	Axit n-6	Axit n-9	Axit n-7	Khác
RB02 QB-HL	30,01	69,99	33,43	36,56	13,63	22,93	28,82	4,61	0
RB03 QB-HL	35,15	59,82	51,32	8,5	3,06	5,44	8,97	42,35	5,03
RB04 QB-HL	37,27	62,73	28,5	34,23	15,86	18,37	28,5	0	0
RB01 VM-RD	85,26	14,74	3,86	10,88	0	10,88	1,69	2,17	0
RB02 VM-RD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

RB LS	03	27,24	67,5	33,12	34,38	28,81	5,57	14,44	18,68	5,26
RB LS	06	48,07	50,01	24,34	25,67	5,92	19,75	24,34	0	1,92
RB LS	07	6,99	93,01	15,93	77,08	40,21	36,87	15,62	0,31	0
RB LS	08	25,75	73,53	9,67	63,86	41,51	22,35	7,03	2,64	0,72
RB LS	09	74,19	24,87	15,22	9,65	4,63	5,02	9,6	5,62	0,94

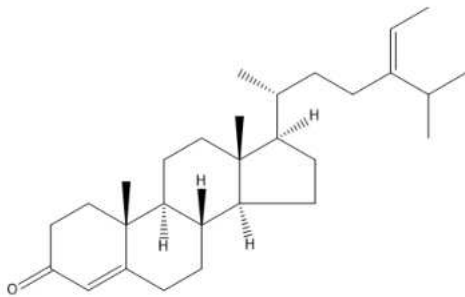
Phụ lục 3. Danh sách chất phân lập từ chi rong Mơ

**1**

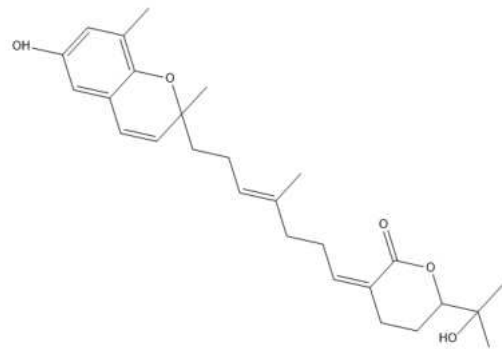
3-Hydroxycholest-5-en-24-one

**2**

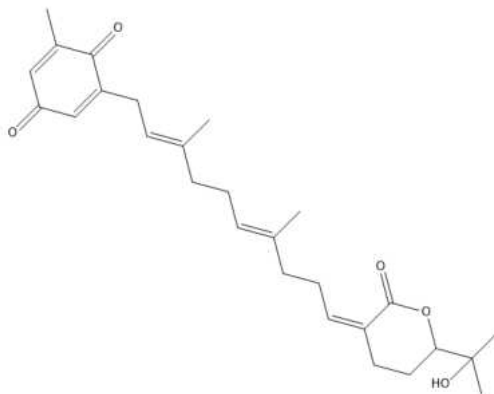
14-Hydroxy-2,6,10-trimethyl-10-pentadecen-4-one

**3**

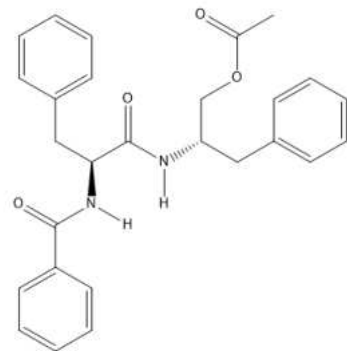
24-hydroxystigmasta-4,28-dien-3-one

**4**

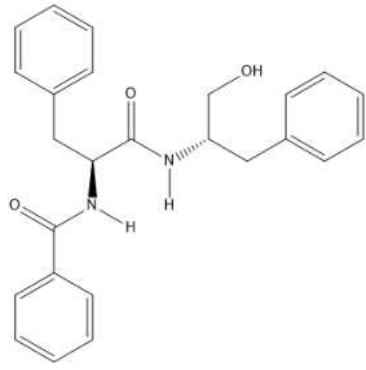
110-Hydroxysargachromelide

**5**

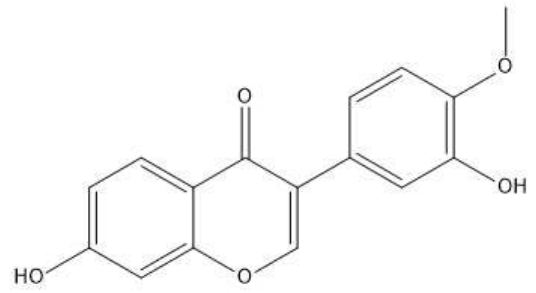
150-Hydroxysargaquinolide

**6**

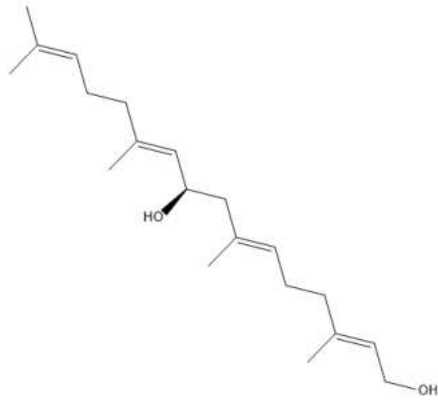
Aurantiamide acetate



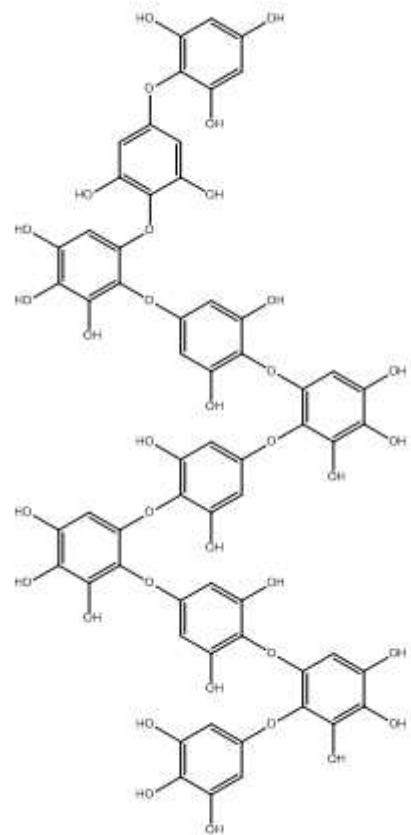
7
Aurantiamide



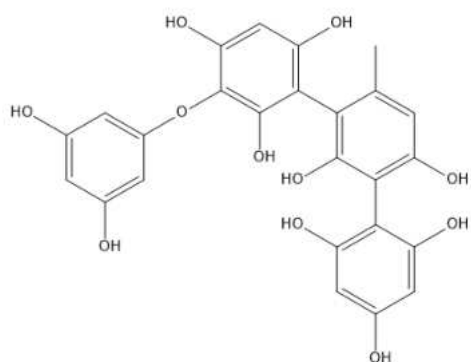
8
Calycosin



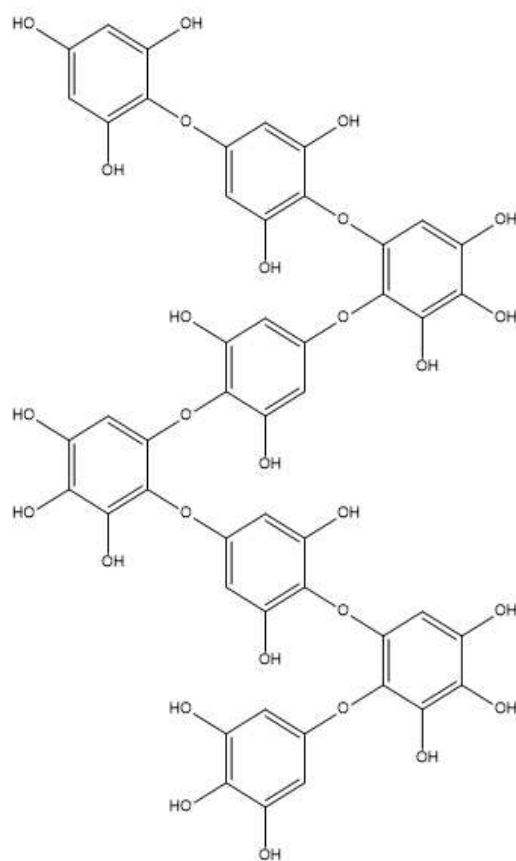
9
Crinitol



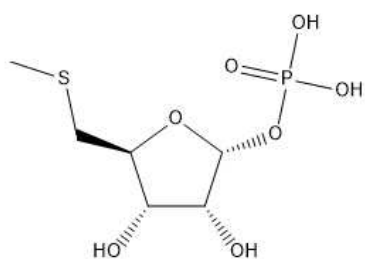
10
decaafuhalol A



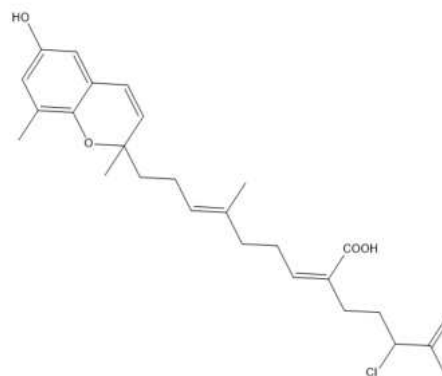
11
difucodiphlorethol A



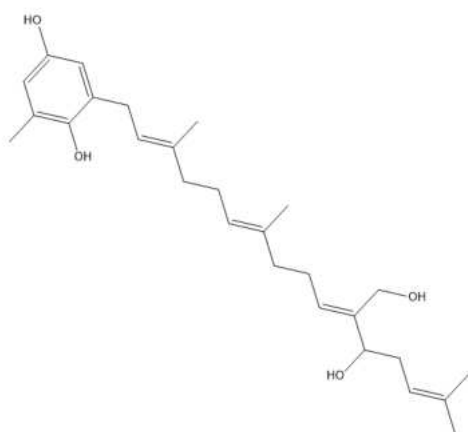
12
dodecafuhalol A



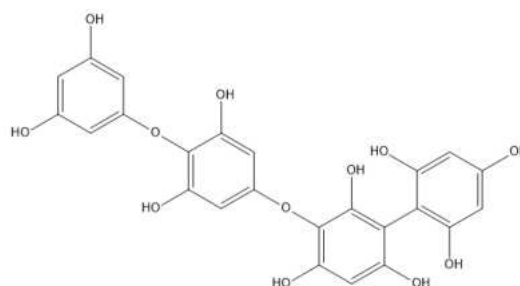
13
D-ribofuranoside



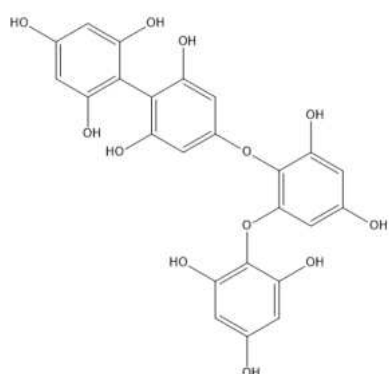
14
fallachromenoic axit



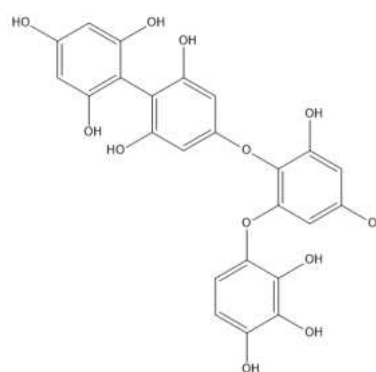
15
fallahydroquinone



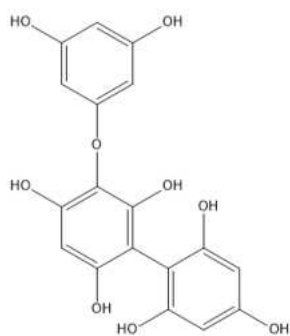
16
fucodiphlorethol D



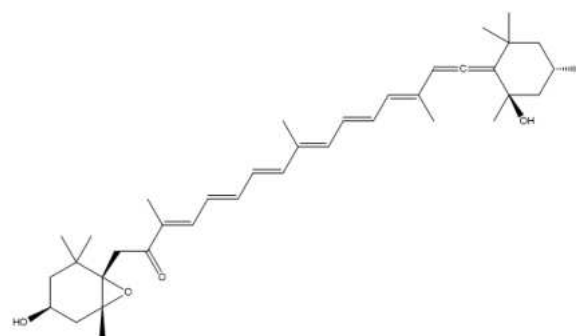
17
fucodiphlorethol E



18
fucodiphlorethol F

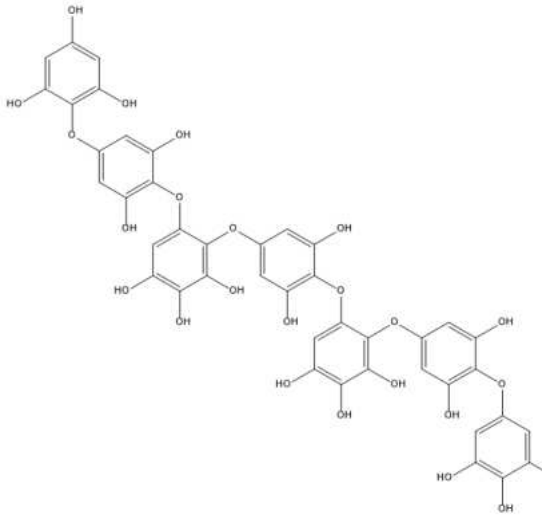


19
fucophlorethol B

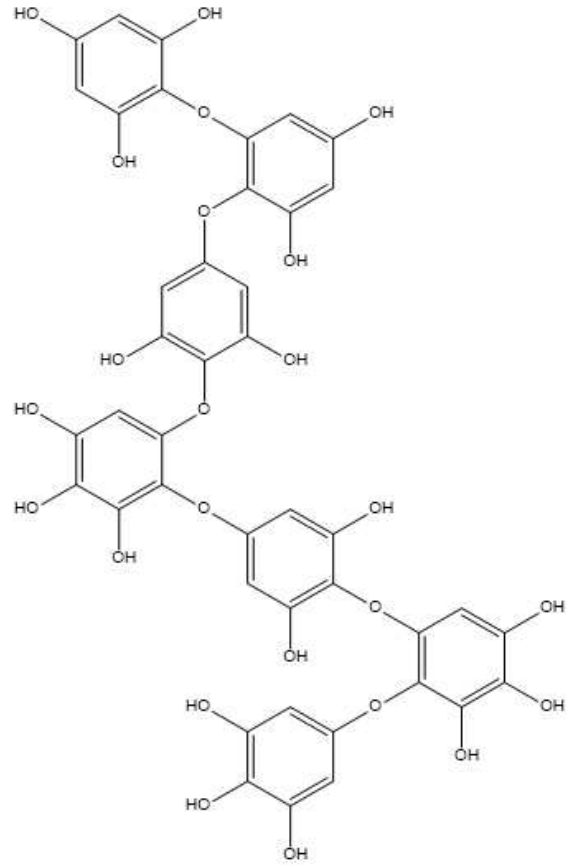


20
Fucoxanthin

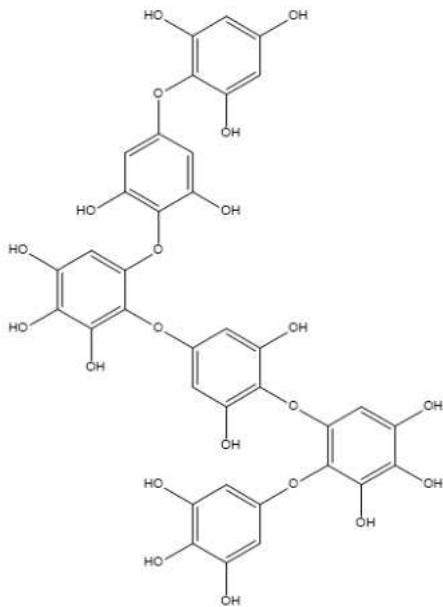
X



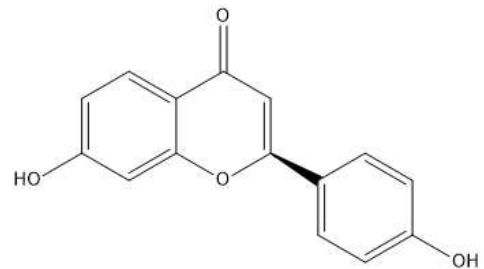
21
Heptafuhalol A



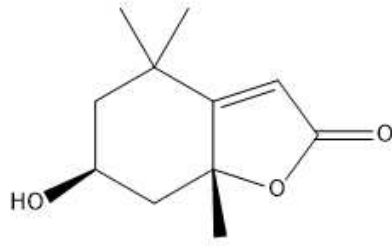
22
heptafuhalol B



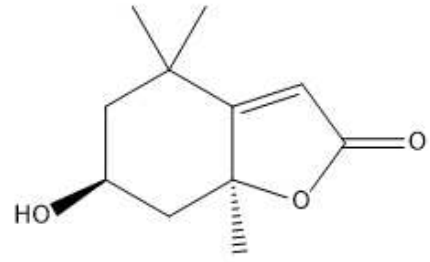
23
hexafuhalol A



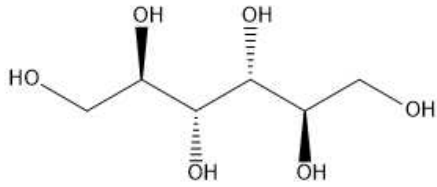
24
Liquiritigenin



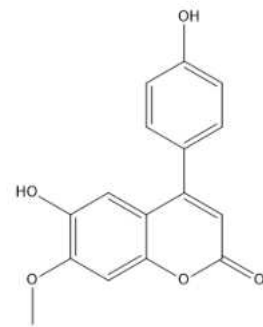
25
Loliolide(6S,7aR)



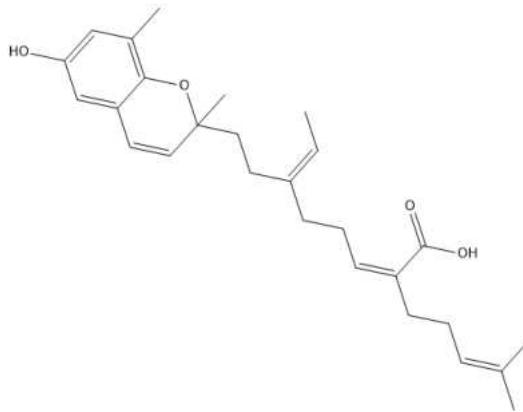
26
Loliolide(6S,7aS)



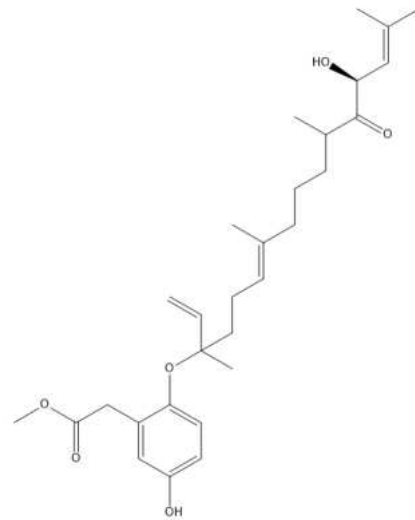
27
Mannitol



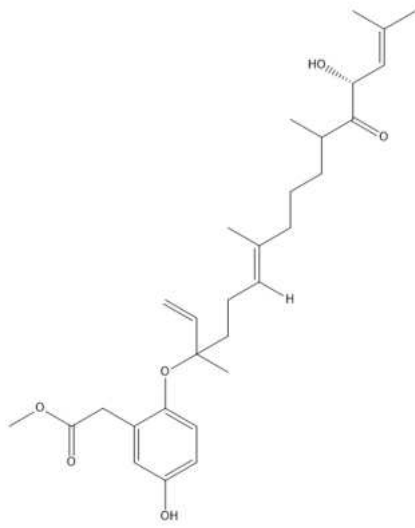
28
Melanettin



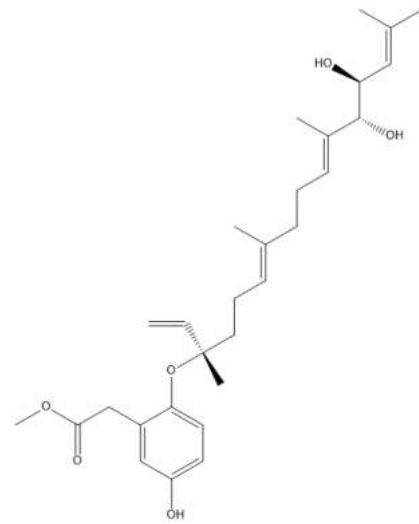
29
Mojabanchromanol



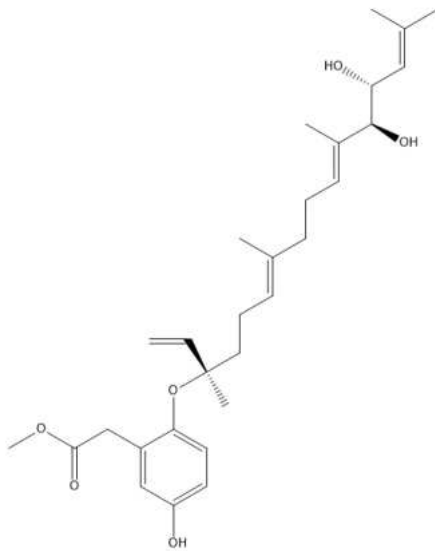
30
Nahocol A



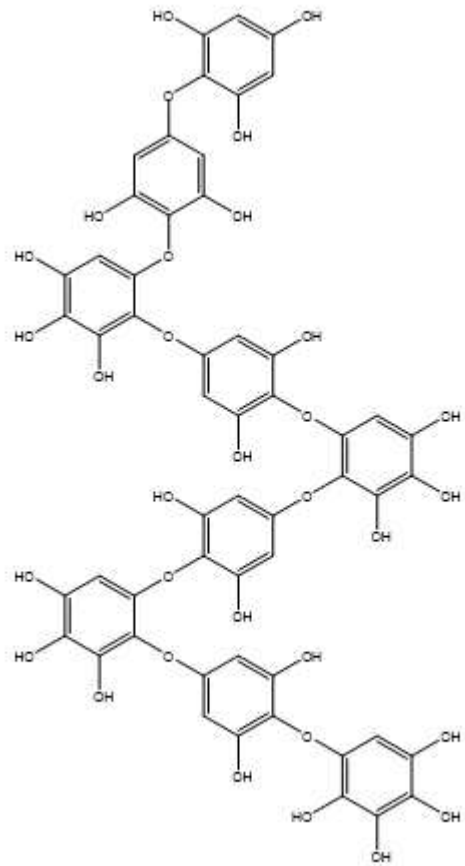
31
Nahocol A1



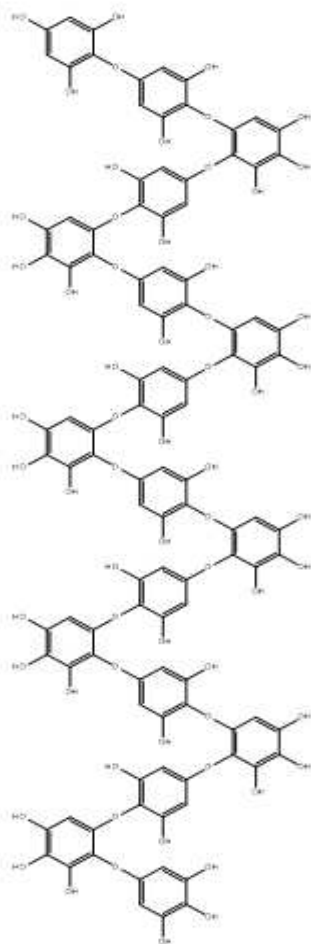
32
Nahocol D1



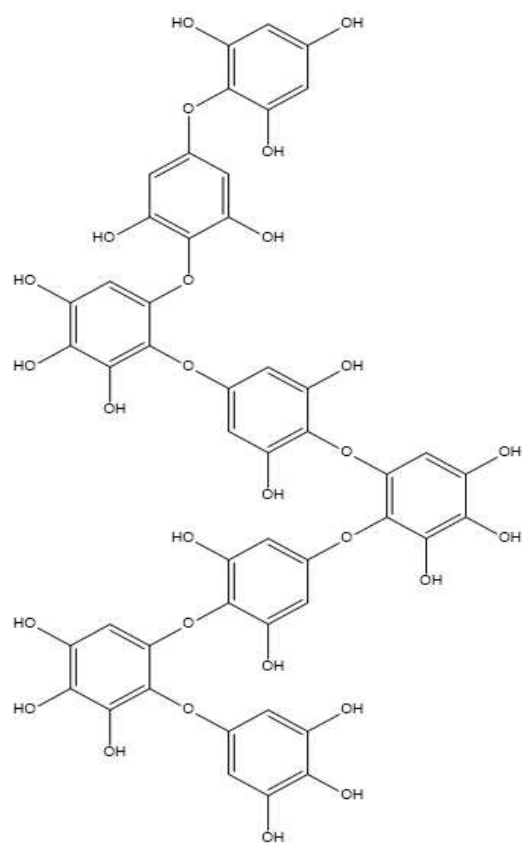
33
Nahocol D2



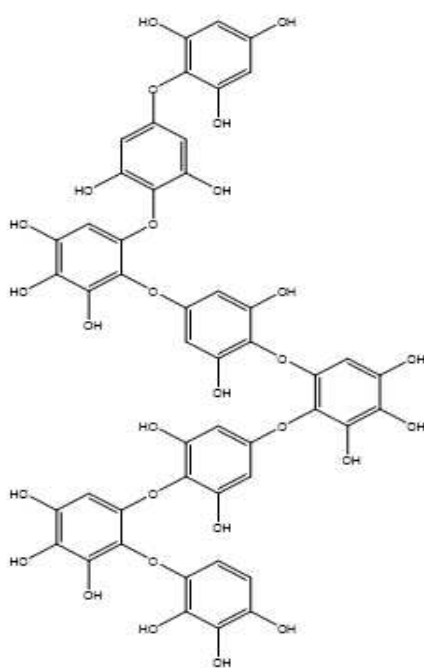
34
nonafuhalol A



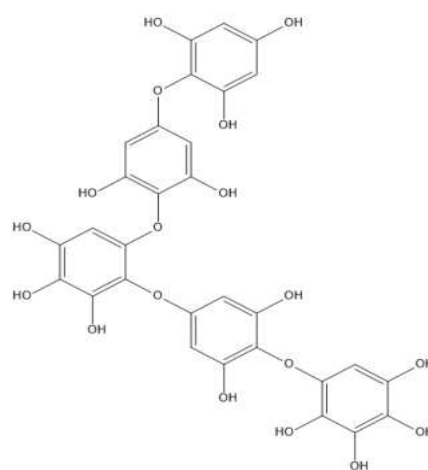
35
Octadecafuhalol A



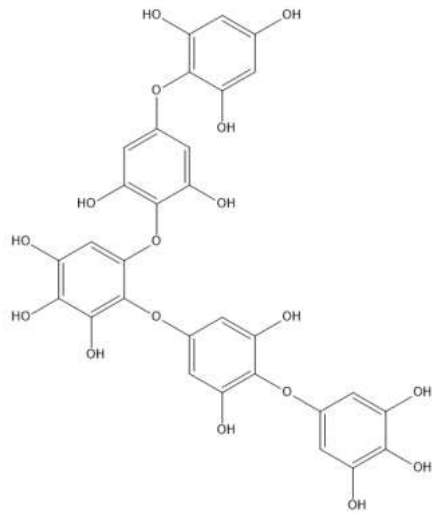
36
octafuhalol A



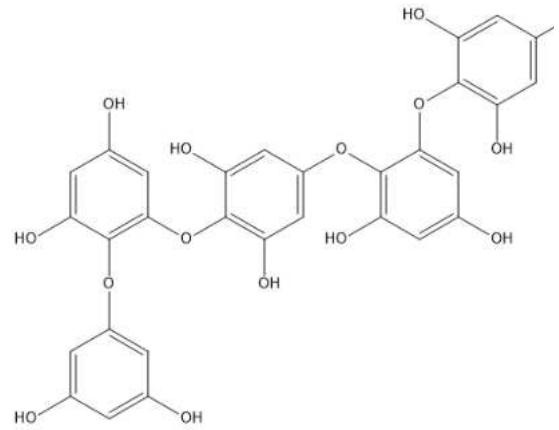
37
octafuhalol B



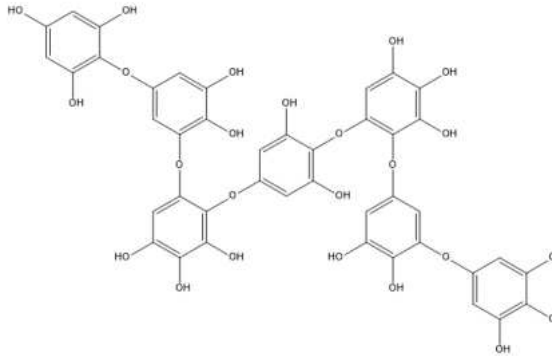
38
pentafuhalol A



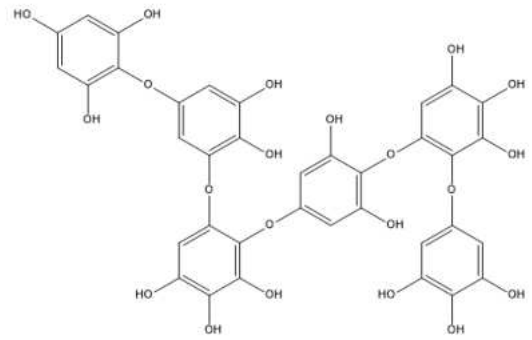
39
pentafuhalol B



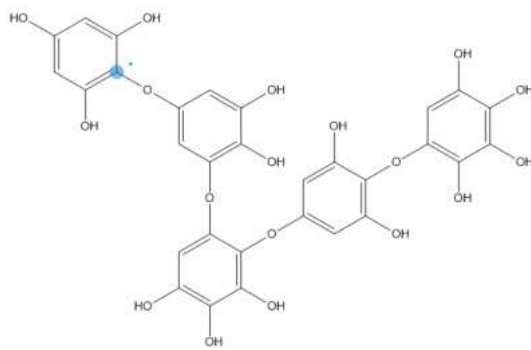
40
pentaphlorethol A



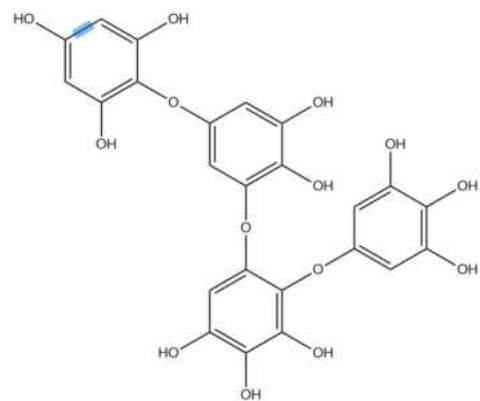
41
pseudoheptafuhalol A



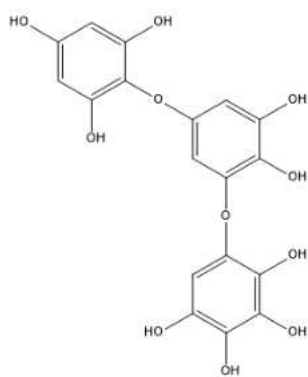
42
pseudohexaafuhalol A



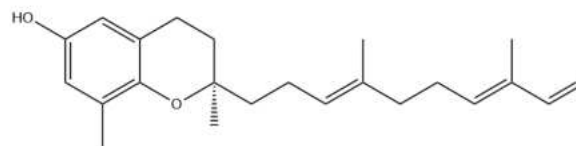
43
pseudopentafuhalol A



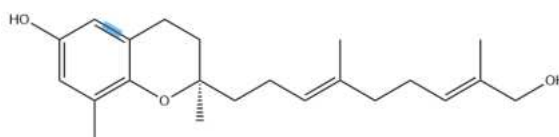
44
pseudotetrafuhalol A



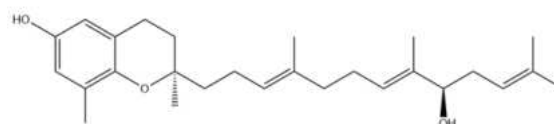
45
pseudotrifuhalol A



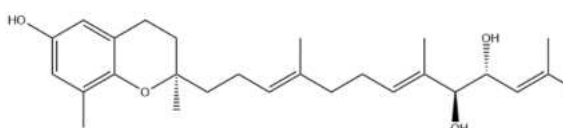
46
pseudotrifuhalol A



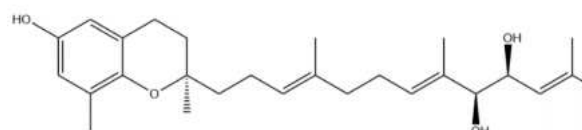
47
Sargachromanol B



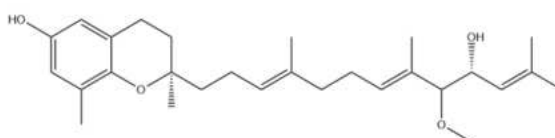
48
Sargachromanol C



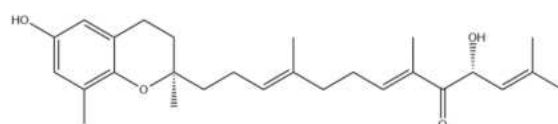
49
Sargachromanol D



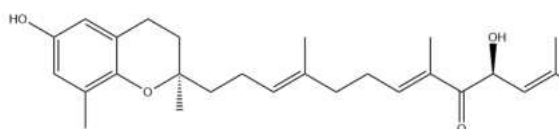
50
Sargachromanol E



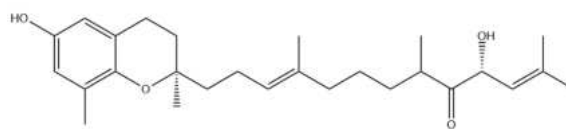
51
Sargachromanol F



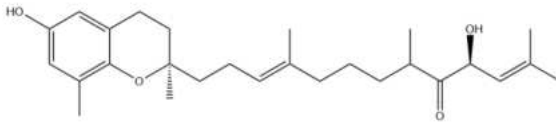
52
Sargachromanol G



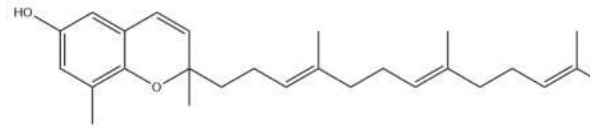
53
Sargachromanol H



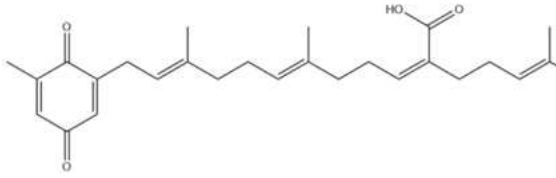
54
Sargachromanol I



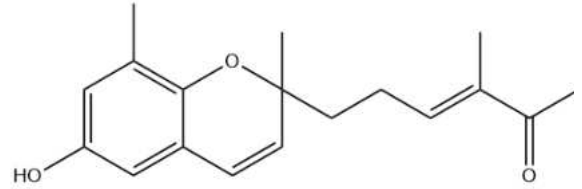
55
Sargachromanol J



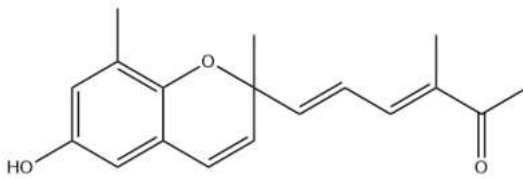
56
Sargaol



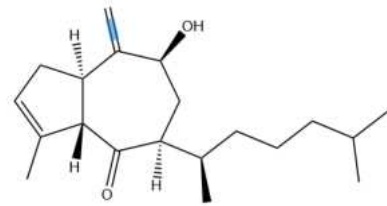
57
Sargaquinoic axit



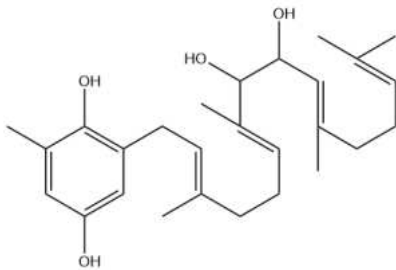
58
Sargasal 1



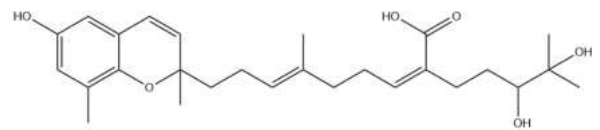
59
Sargasal 2



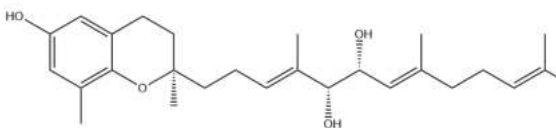
60
Sargassinone



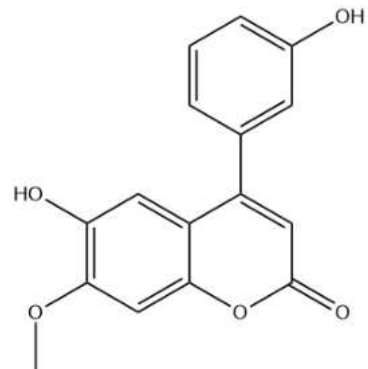
61
Sargatetraol



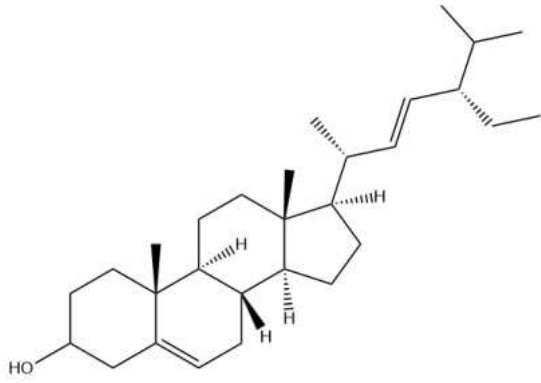
62
Sargathunbergol A



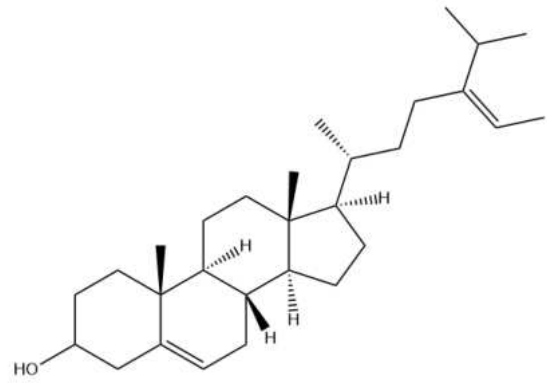
63
Sargatriol



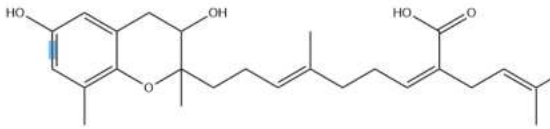
64
Stevenin



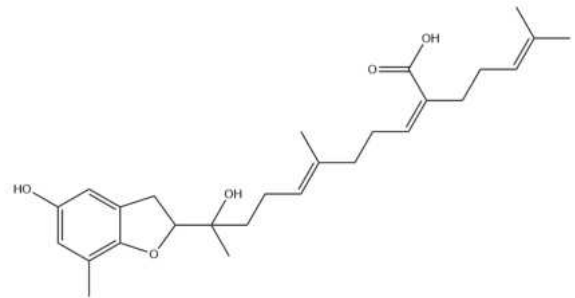
65
Stigmasta-5,22-dien-3-ol



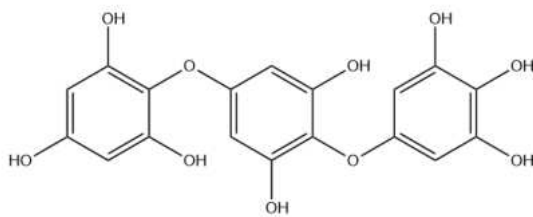
66
Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol



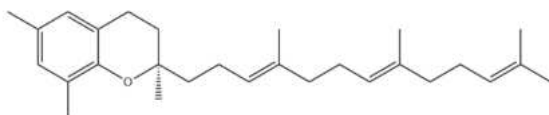
67
Thunbergol A



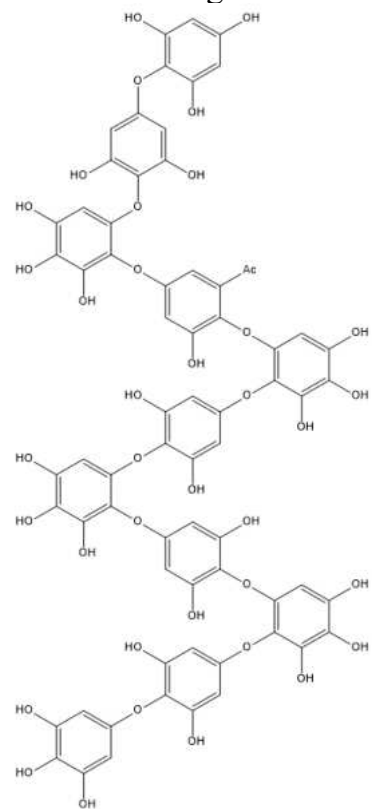
68
Thunbergol B



69
trifuhalol A



71
 δ -Tocotrienol



70
undecaafuhalol A

Phụ lục 4. Kết quả dự đoán năng lượng liên kết của các hợp chất với enzyme tyrosinase

Ký hiệu	Năng lượng liên kết ΔG_{pred} (kcal/mol)	Ký hiệu	Năng lượng liên kết ΔG_{pred} (kcal/mol)
Dock 1	-7,40	Dock 37	-6,23
Dock 2	-6,53	Dock 38	-12,15
Dock 3	-14,06	Dock 39	-9,27
Dock 4	-11,73	Dock 40	-9,68
Dock 5	-10,85	Dock 41	-6,22
Dock 6	-9,09	Dock 42	-6,81
Dock 7	-10,40	Dock 43	-5,73
Dock 8	-9,56	Dock 44	-11,78
Dock 9	-9,50	Dock 45	-13,99
Dock 10	-8,42	Dock 46	-11,28
Dock 11	-13,62	Dock 47	-11,00
Dock 12	-8,65	Dock 48	-9,58
Dock 13	-5,82	Dock 49	-9,01
Dock 14	-5,85	Dock 50	-8,55
Dock 15	-4,67	Dock 51	-8,16
Dock 16	-12,02	Dock 52	-7,76
Dock 17	-11,86	Dock 53	-9,85
Dock 18	-12,13	Dock 54	-7,40
Dock 19	-10,27	Dock 55	-11,04
Dock 20	-4,79	Dock 56	-7,93
Dock 21	-4,83	Dock 57	-7,51
Dock 22	-5,04	Dock 58	-9,03
Dock 23	-6,32	Dock 59	-8,94
Dock 24	-7,12	Dock 60	-10,13
Dock 25	-6,53	Dock 61	-9,42
Dock 26	-6,34	Dock 62	-9,23
Dock 27	-7,28	Dock 63	-10,15

Dock 28	-7,30	Dock 64	-10,22
Dock 29	-5,74	Dock 65	-11,04
Dock 30	-6,00	Dock 66	-9,81
Dock 31	-6,59	Dock 67	-6,75
Dock 32	-5,53	Dock 68	-6,80
Dock 33	-5,80	Dock 69	-8,30
Dock 34	-7,24	Dock 70	-7,42
Dock 35	-7,57	Dock 71	-10,40
Dock 36	-8,12	Tropolone	-12,35

Phụ lục 5. Kết quả thử nghiệm tác dụng đào thải kim loại nặng của Canxi alginate

Nhóm	Hàm lượng kim loại có trong bộ phận ($\mu\text{g/g}$ khối lượng chuột)			
	Gan	Tim	Thận	Xương đùi
	Sau 3 tuần (gây độc kim loại nặng) (tuần 1 đến 3)			
Đối chứng	0	0	0	0
Nhóm 1 (gây độc chì)	72,5 \pm 8,7	71,5 \pm 9,2	323,7 \pm 30,9	1508,2 \pm 195,2
Nhóm 2 (gây độc cadimin)	79,9 \pm 7,7	78,0 \pm 15,9	320,2 \pm 29,5	1561,8 \pm 201,1
Nhóm 3 (gây độc thủy ngân)	74,5 \pm 8,7	82,1 \pm 18,9	322,7 \pm 32,5	1611,8 \pm 221,7
Sau 3 tuần gây độc đồng thời sử dụng muối canxi alginate (tuần 1 đến 3)				
Nhóm 4 (gây độc chì và được uống Canxi alginate)	41,8 \pm 6,5	39,7 \pm 6,2	198,5 \pm 18,4	958,8 \pm 91,1
Nhóm 5 (gây độc cadimi và được uống Canxi alginate)	39,9 \pm 5,9	38,5 \pm 6,1	199,5 \pm 16,5	951,8 \pm 104,3
Nhóm 6 (gây độc thủy ngân và được uống Canxi alginate)	44,8 \pm 7,1	47,5 \pm 8,5	205 \pm 19,7	1121 \pm 122,7
3 tuần tiếp tục cho chuột ăn canxi alginate và ngừng gây độc (tuần 4 đến 6)				
Nhóm 4 (dùng gây độc chì và được uống canxi alginate)	32,4 \pm 2,1	31,6 \pm 2,2	123,3 \pm 6,2	768,8 \pm 31,2
Nhóm 5 (dùng gây độc cadimi và được uống canxi alginate)	31,2 \pm 3,2	30,1 \pm 2,1	129,4 \pm 6,5	731,8 \pm 44,3

Nhóm 6 (dùng gây độc thủy ngân và được uống canxi alginate)	35,7±3,1	34,2±3,5	131,2 ± 7,3	782,5 ± 52,5
3 tuần tiếp tục cho chuột ăn canxi alginate và ngừng gây độc (tuần 7 đến 9)				
Nhóm 4 (dùng gây độc chì và được uống canxi alginate)	24,4 ± 1,8	24,2 ± 1,5	78,8 ± 4,5	578,6 ± 41,1
Nhóm 5 (dùng gây độc cadimi và được uống canxi alginate)	23,9 ± 1,7	24,5 ± 1,4	79,7 ± 5,1	561,8 ± 44,3
Nhóm 6 (dùng gây độc thủy ngân và được uống canxi alginate)	24,8 ± 2,1	26,1 ± 1,5	80,5 ± 4,7	587,8 ± 42,4

Số: 23 /QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 18 tháng 01 năm 2024

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện

GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 303/QĐ-VHL ngày 01/03/2023 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 08/2017/TT-BGDĐT ngày 04/4/2017 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế Tuyển sinh và Đào tạo trình độ Tiến sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1948/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2018 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy định đào tạo trình độ tiến sĩ tại Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Quyết định số 1815/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2018 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận nghiên cứu sinh;

Căn cứ Quyết định số 1497/QĐ-HVKHCN ngày 26/12/2023 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc gia hạn thời gian học tập lần 3: (03 tháng từ ngày 28/12/2023 đến ngày 28/3/2024) cho NCS. Trần Duy Phong;

Xét đề nghị của Trưởng phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện cho nghiên cứu sinh Trần Duy Phong với đề tài:

“Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích”

Chuyên ngành: Kỹ thuật hóa học Mã số: 9 52 03 01

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận án kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận án tiến sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ.

Quyết định có hiệu lực tối đa 90 ngày kể từ ngày ký. Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính và Truyền thông, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và nghiên cứu sinh có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. /.

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ NCS;
- Lưu: VT, ĐT, TN16.



GIÁM ĐỐC

GS.TS. Vũ Đình Lâm

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIÊN SĨ
CẤP HỌC VIỆN



(Kèm theo Quyết định số 23 /QĐ-HVKHCN ngày 18 / 01 /2024
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)

Chợ luận án của nghiên cứu sinh: Trần Duy Phong

Về đề tài: “Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích
hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích” .

Chuyên ngành: Kỹ thuật hóa học

Mã số: 9 52 03 01

Người hướng dẫn 1: GS.TS. Phạm Quốc Long, Viện Hóa học các HCTN, Viện
Hàn lâm KHCNVN

Người hướng dẫn 2: PGS.TS. Trần Quốc Toàn, Viện Hóa học các HCTN, Viện
Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1	GS.TS. Phạm Văn Thiêm	Kỹ thuật hóa học	Hội Khoa học các sản phẩm thiên nhiên Việt Nam	Chủ tịch
2	PGS.TS. Nguyễn Tuấn Anh	Kỹ thuật hóa học	Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội, Bộ Công Thương	Phản biện 1
3	PGS.TS. Ngô Xuân Lương	Hóa hữu cơ	Trường Đại học Hồng Đức, Ủy ban nhân dân Thành phố Thanh Hóa	Phản biện 2
4	TS. Vũ Mạnh Hùng	Môi trường và năng lượng	Viện Tài nguyên và Môi trường biển, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 3
5	TS. Trịnh Thị Thu Hương	Hóa học các HCTN	Viện Hóa học các HCTN, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
6	PGS.TS. Tạ Hồng Đức	Kỹ thuật hóa học	Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội	Ủy viên
7	PGS.TS. Lê Thị Huyền	Hóa hữu cơ	Trường Đại học KHTN, Đại học Quốc gia Hà Nội	Ủy viên

Hội đồng gồm 07 thành viên./.

BẢN NHẬN XÉT/ PHẢN BIỆN LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên đề tài luận án: “Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích”

Chuyên ngành: Kỹ thuật hóa học

Mã số: 9 52 03 01

Nghiên cứu sinh: Trần Duy Phong

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

2. PGS. TS. Trần Quốc Toàn

Người nhận xét: GS.TS Phạm Văn Thiêm

Cơ quan công tác: Hội Khoa học các Sản phẩm Thiên nhiên Việt Nam

Nội dung nhận xét:

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Rong nâu ở vùng biển Việt Nam có nhiều thành phần có giá trị cao như fucoidan, acid alginic, fucoxanthin, phlorotantin,... Từ lâu nhân dân vùng biển đã sản xuất alginate từ rong nâu ứng dụng trong công nghệ thực phẩm, công nghệ dệt, công nghệ giấy, công nghệ in và mỹ phẩm. Gần đây đã tách được fucoidan từ rong nâu có hoạt tính sinh học cao được ứng dụng trong sản xuất thuốc kháng khuẩn, kháng sinh và điều trị ung thư. Tuy nhiên hiện nay việc khai thác, chế biến rong nâu mới dừng lại ở việc sản xuất quy mô nhỏ và chỉ chiết xuất Alginat cho công nghiệp thực phẩm. Vì vậy, cần có một nghiên cứu toàn diện chế biến rong nâu thành các sản phẩm có giá trị cho ngành công nghiệp thực phẩm, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và dược phẩm. Cách đặt vấn đề xuất phát từ thực tiễn Việt Nam và giải quyết vấn đề trên cơ sở áp dụng một số kỹ thuật tiên tiến siêu âm, vi sóng, công nghệ enzyme vì vậy đề tài có ý nghĩa khoa học và thực tiễn tốt.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

Đa số nhiều công trình trong nước và quốc tế nghiên cứu chế biến rong nâu nhưng chỉ tập trung nghiên cứu các hoạt chất riêng lẻ và kỹ thuật sử dụng là các kỹ thuật tách chiết truyền thống: ngâm chiết, siêu âm,... chưa nghiên cứu tích hợp các kỹ thuật hiện đại siêu âm, vi sóng, dùng chế phẩm enzyme vì vậy công trình nghiên cứu không trùng lặp với các công bố trước đây.

Luận án có 126 TLTK, trích dẫn các TLTK đầy đủ, trung thực và rõ ràng.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

Nội dung luận án hoàn toàn phù hợp với tên đề tài và với chuyên ngành Kỹ thuật Hóa học mã số 9.52.03.01

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu dựa trên cơ sở tổng hợp các kết quả nghiên cứu rời rạc của các nhà khoa học trong nước và thế giới và đề xuất giải pháp tổng thể chế biến rong nâu thành các sản phẩm có giá trị ứng dụng trong lĩnh vực Công nghệ thực phẩm, dược phẩm, thực phẩm chức năng. Tác giả đã sử dụng các phương pháp phân tích hiện đại để xác định các thành phần hóa học của rong nâu ở các vùng miền ở nước ta, xác định cấu trúc hóa học các hoạt chất, xác định hàm lượng các sản phẩm chính trong rong nâu, phân tích các chỉ tiêu an toàn thực phẩm, xác định độc tích cấp, độc tính bán trường diễn và khả năng đào thải kim loại nặng của các chế phẩm, phương pháp nghiên cứu là hiện đại và phù hợp với nội dung nghiên cứu.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả.

a. Lần đầu tiên đã khảo sát chi tiết vùng nguyên liệu rong nâu dọc bờ biển Việt Nam từ Quảng Ninh đến Nha Trang, Trường Sa,... Đặc biệt đã đánh giá hàm lượng lipit tổng, hàm lượng ω_3 , ω_6 , ω_9 , alginate của các mẫu rong nâu.

b. Đã xây dựng được sơ đồ quy trình công nghệ tích hợp các phương pháp kỹ thuật hiện đại: vi sinh, siêu âm, enzyme,... để tách các sản phẩm hữu ích trong rong nâu: fucoxanthin, phlorotanin, fucoidan, alginate.

c. Đã đánh giá hoạt tính chống loãng xương, an toàn và hiệu quả của gel canxi alginate và khả năng đào thải kim loại nặng ở chuột

d. Đã nghiên cứu xây dựng được quy trình công nghệ xử lý bã thải rong nâu và nước thải làm phân bón lá thực hiện quy trình công nghệ tuần hoàn không phé thải góp phần nâng cao giá trị sử dụng rong nâu và góp phần bảo vệ môi trường.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Luận án có ưu điểm nổi bật là số liệu phong phú, tác giả đã thực hiện một khối lượng lớn thí nghiệm với các kỹ thuật phức tạp, các biện luận hợp lý và phù hợp với số liệu thực nghiệm. Luận án được trình bày logic, mạch lạc người đọc dễ theo dõi, kết cấu hợp lý. Các kết luận đã phản ánh đầy đủ các kết quả chính yếu của luận án.

Tuy nhiên luận án có một số nhược điểm phải bổ sung và chỉnh sửa:

+ Bổ sung danh mục các ký hiệu và chữ viết tắt.

+ Bổ sung kết luận thứ 6 về xây dựng được quy trình xử lý bã thải, nước thải sau chế biến rong nâu làm phân bón là thực hiện quy trình công nghệ sản xuất tuần hoàn không phế thải.

+ Bổ sung tên la tinh rong mơ (*sargassum SP.*) sản phẩm trong tên đề tài.

+ Cần thống nhất tên gọi rong mơ, rong nâu, rong cỏ, rong quạt thống nhất gọi tên rong mơ *sargassum SP* trong toàn bộ nội dung luận án.

+ Một số lỗi về in ấn:

- Trang 95 hình 3.29 ảnh hưởng của tỷ lệ $\text{CaCl}_2/\text{alginat}$ không phải nồng độ CaCl_2

- Trang 114 quá trình điện phân tẩy màu thực chất là dùng H_2O_2

- Trang 115 sơ đồ quy trình nồng độ CaCl_2 1,8% trong khi trang 95 nồng độ CaCl_2 là 10% , cường độ siêu âm $10^{\text{w}/\text{cm}^2}$ trang 94 cường độ siêu âm $58^{\text{w}/\text{cm}^2}$ thực tế là $58^{\text{w}/\text{cm}^2}$

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.

Nội dung luận án được công bố trong 03 bài báo và 01 bằng độc quyền giải pháp hữu ích. Các nội dung công bố phù hợp với nội dung của luận án. Trong đó có 01 tạp chí ISI và hai báo cáo Hội nghị Khoa học toàn quốc là những diễn đàn có uy tín trong nước và quốc tế. Đặc biệt kết quả luận án được bảo hộ độc quyền giải pháp hữu ích chứng tỏ luận án có ý nghĩa thực tiễn tốt.

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không; luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận học vị tiến sĩ được hay không.


a. Luận án đáp ứng yêu cầu đối với luận án tiến sĩ chuyên ngành Kỹ thuật Hóa học mã số 9.52.03.01.

b. Bản tóm tắt phản ánh trung thực nội dung cơ bản của luận án.

c. Luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận học vị Tiến sĩ Hóa học

Hà Nội, Ngày 27 tháng 02 năm 2024

Người nhận xét



Phạm Văn Thiên

BẢN NHẬN XÉT/ PHẢN BIỆN LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên đề tài luận án: “*Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích*”

Chuyên ngành: Kỹ thuật hóa học

Mã số: 9 52 03 01

Nghiên cứu sinh: Trần Duy Phong

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

2. PGS.TS. Trần Quốc Toàn

Người nhận xét/Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Tuấn Anh

Cơ quan công tác: Khoa CN Hóa – Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

Nội dung nhận xét:

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Đề tài nghiên cứu về sử dụng các kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích đồng thời mang lại nhiều giá trị cần thiết từ nhiều khía cạnh. Tính cần thiết của đề tài nằm ở việc tận dụng nguồn lực biển bền vững, giúp giải quyết vấn đề biến đổi khí hậu và giảm áp lực đối mặt với ngư dân. Sự kết hợp của rong nâu trong các sản phẩm thực phẩm, thực phẩm chức năng và mỹ phẩm cung cấp nguồn dinh dưỡng đa dạng, giúp cải thiện chất lượng cuộc sống và đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của người tiêu dùng.

Về mặt thời sự, đề tài là một biện pháp hiệu quả trong việc ứng phó với biến đổi khí hậu và chống ô nhiễm môi trường. Tận dụng rong nâu không chỉ giúp giảm lượng chất thải mà còn cung cấp giải pháp thực tế cho vấn đề này. Trong lĩnh vực khoa học, nghiên cứu về sinh học và hóa học của rong nâu mở ra cơ hội hiểu rõ hơn về thành phần và chức năng của nó, đồng thời phát triển công nghệ xử lý và tích hợp để tối ưu hóa giá trị của nguồn nguyên liệu này.

Ở khía cạnh thực tiễn ứng dụng, đề tài có tiềm năng phát triển các sản phẩm mới như thực phẩm chức năng, thực phẩm sáng tạo và mỹ phẩm từ rong nâu, giúp mở rộng thị trường và tạo ra cơ hội kinh doanh mới. Sự phát triển của ngành công nghiệp này có thể góp phần vào sự đa dạng hóa nền kinh tế và tạo ra việc làm mới.

Tóm lại, nghiên cứu về chế biến toàn diện rong nâu không chỉ đáp ứng nhu cầu thực tế mà còn mang lại những lợi ích lớn về môi trường, sức khỏe và kinh tế, hỗ trợ vào sự phát triển bền vững và hiệu quả của nguồn lực biển.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

Đề tài luận án nghiên cứu về sử dụng kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu được thiết kế với sự chú ý đặc biệt đến sự không trùng lặp với các công trình, luận án đã được công bố ở trong và ngoài nước. Quá trình đánh giá và định hình đề tài đã được tiến hành một cách cẩn thận, đảm bảo rằng nghiên cứu mang tính độc đáo và đóng góp mới mẻ vào lĩnh vực này.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

Tên đề tài nghiên cứu "*Sử Dụng Kỹ Thuật Tiên Tiến và Công Nghệ Tích Hợp trong Chế Biến Toàn Diện Rong Nâu*" được lựa chọn với mục đích thể hiện sự phù hợp và chính xác với nội dung cụ thể của đề tài. Tên đề tài này không chỉ mô tả chủ đề chính mà còn thể hiện sự chú trọng vào việc sử dụng các kỹ thuật tiên tiến và tích hợp công nghệ để chế biến rong nâu một cách toàn diện. Điều này giúp người đọc hiểu rõ về mục tiêu và phạm vi của nghiên cứu.

Nội dung của đề tài phản ánh sự chuyên sâu và chi tiết trong việc xử lý rong nâu, từ quy trình chế biến đến ứng dụng sản phẩm. Nghiên cứu này có sự linh hoạt để bao quát nhiều khía cạnh của chủ đề, từ khía cạnh khoa học đến ứng dụng thực tế. Sự kết hợp giữa nội dung và chuyên ngành được thể hiện thông qua việc tập trung vào các khía cạnh chính của chế biến rong nâu, bao gồm các kỹ thuật hiện đại và ứng dụng thực tế trong ngành công nghiệp thực phẩm và dinh dưỡng.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.

Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu được sử dụng trong đề tài vô cùng quan trọng để đảm bảo sự chất lượng và uy tín của kết quả nghiên cứu.

Phương Pháp Nghiên Cứu:

Nghiên Cứu Thực Nghiệm và Thử Nghiệm Thực Tế: Sử dụng các thử nghiệm thực tế và các mô hình thực nghiệm để kiểm tra và đánh giá hiệu suất của quy trình chế biến

rong nâu. Điều này tăng cường tính ứng dụng và minh bạch của nghiên cứu, đồng thời đảm bảo sự hiện đại của phương pháp.

Phân Tích Hóa Học và Sinh Học: Áp dụng phương pháp phân tích hóa học và sinh học tiên tiến để định lượng và định tính các thành phần chất hóa học và sinh học trong rong nâu. Các kỹ thuật đánh giá tác dụng sinh học như phương pháp xác định độc tính cấp, tính độc bán dẫn trường diễn, đào thải kim loại nặng, chống loãng xương, hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính gây độc tế bào. Các phương pháp nghiên cứu đã được tiến hành: xác định alginate, sàng lọc invitro, xác định thành phần và hàm lượng lipid, các axit béo, hàm lượng fucoxanthin.

Tính Hiện Đại của Công Nghệ:

Sử dụng công nghệ thông tin để theo dõi và quản lý quy trình sản xuất. Hệ thống thông tin và giám sát tự động giúp nâng cao độ chính xác và hiệu suất của quy trình.

Lựa chọn và tích hợp thiết bị và vật liệu chế biến tiên tiến để đảm bảo tính hiện đại và sự đổi mới trong quy trình sản xuất.

Tóm lại, độ tin cậy của nghiên cứu được củng cố thông qua sự linh hoạt của phương pháp và việc tích hợp các công nghệ hiện đại. Sự hiện đại của phương pháp nghiên cứu không chỉ giúp nâng cao chất lượng kết quả mà còn thể hiện cam kết của nghiên cứu đối với sự đổi mới và tiến bộ trong lĩnh vực chế biến rong nâu.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả.

Đã xác lập được quy trình công nghệ chế biến toàn diện rong mơ Sargasum. Sp. thành các sản phẩm có giá trị cao như fucoxanthin, phlorotanin, fucoidan và alginat theo phương pháp tích hợp các kỹ thuật tiên tiến.

Đã xây dựng quy trình công nghệ chiết xuất phenolic từ rong nâu theo phương pháp vi sóng; nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng và tối ưu hóa điều kiện chiết xuất phenolic từ rong nâu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt.

Đã nghiên cứu quá trình tích hợp một số công nghệ tiên tiến để thu nhận alginate; nghiên cứu hoạt tính chống loãng xương, đánh giá độ an toàn và hiệu lực của chế phẩm gel canxi alginate.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Ưu điểm:

Nội dung:

Chi Tiết và Sâu Rộng: Luận án chứa đựng nội dung chi tiết và sâu rộng về chủ đề nghiên cứu, đảm bảo độ phủ mọi khía cạnh của vấn đề.

Kiến Thức Nền Tảng: Luận án có sự đồng nhất và mạch lạc trong việc trình bày kiến thức nền tảng, tạo nền tảng vững chắc cho các ý kiến và kết luận.

Kết cấu:

Tuân Theo Tiêu Chuẩn: Kết cấu của luận án tuân theo các tiêu chuẩn và nguyên tắc của một bản luận án khoa học, bao gồm phần giới thiệu, mục tiêu nghiên cứu, phương pháp, kết quả và thảo luận.

Liên Kết Logic: Các phần trong luận án được liên kết một cách logic, tạo ra một dòng chảy tự nhiên từ ý này sang ý khác.

Hình Thức:

Ngôn Ngữ Khoa Học: Sử dụng ngôn ngữ khoa học chính xác và chuyên nghiệp, thể hiện sự chăm chỉ trong việc trình bày ý và thông tin.

Hình Ảnh và Biểu Đồ: Sử dụng hình ảnh, biểu đồ, và bảng biểu hiện để hỗ trợ mô tả và minh họa, làm cho luận án trở nên dễ hiểu và hấp dẫn.

Nhược Điểm:

Nội Dung:

Thiếu Sự Đối Chiếu: Có thể thiếu sự đối chiếu và so sánh chi tiết với các nghiên cứu tương tự, giảm tính cần thiết và tính mới mẻ của luận án.

Chưa Đánh Giá Đầy Đủ Sự Ảnh Hưởng: Một số khía cạnh của ảnh hưởng của nghiên cứu có thể chưa được đánh giá đầy đủ, làm giảm tính toàn diện của nghiên cứu.

Kết Cấu:

Thiếu Sự Mạch Lạc trong Thảo Luận: Một số phần thảo luận có thể thiếu sự mạch lạc và sự liên kết với các phần khác, gây khó khăn cho người đọc theo dõi và hiểu rõ hơn.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.

Nội dung luận án đã được công bố 4 công trình, trong đó: 1 bài trên tạp chí quốc tế uy tín thuộc danh mục ISI, Q3; 01 Bằng độc quyền Giải pháp hữu ích số 2606; 02 bài công bố trên tuyển tập báo cáo khoa học diễn đàn khoa học toàn quốc năm 2019.

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không; luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận học vị tiến sĩ được hay không.

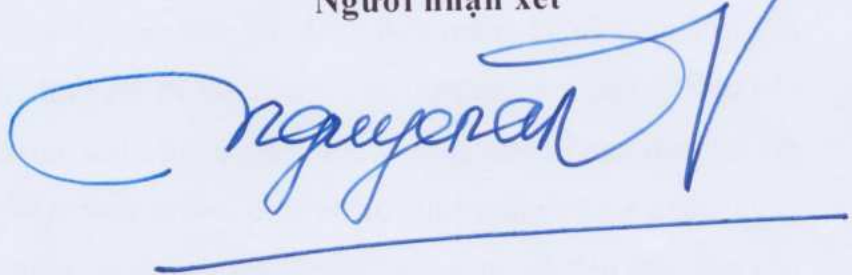
Luận án này đã thành công trong việc đáp ứng và vượt qua các yêu cầu của một luận án tiến sĩ chuyên ngành. Bằng cách tiếp cận tổng thể, nghiên cứu đã đưa ra những kết quả đầy hứa hẹn về chế biến toàn diện rong nâu, mở ra nhiều hướng phát triển trong lĩnh vực này. Bằng cách thực hiện thử nghiệm và sử dụng các phương pháp nghiên cứu tiên tiến, luận án đã đạt được độ tin cậy cao trong việc đưa ra những kết luận và đề xuất chi tiết.

Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành với nội dung cơ bản của luận án, tóm gọn và minh bạch những điểm chính. Nó là một tài liệu tổng quan, giúp người đọc hiểu được ý nghĩa và giá trị của nghiên cứu một cách nhanh chóng. Sự liên kết chặt chẽ giữa các phần của luận án cũng đã được thể hiện một cách rõ ràng.

Dựa trên những thành công này, tôi đồng ý đề luận án này có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận học vị tiến sĩ. Nó là kết quả của sự nỗ lực và cam kết trong quá trình nghiên cứu, đồng thời đóng góp ý nghĩa vào lĩnh vực chuyên ngành và làm giàu kiến thức khoa học.

Hà Nội, Ngày 27 tháng 02 năm 2024

Người nhận xét



PGS.TS. Nguyễn Tuấn Anh

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT/ PHẢN BIỆN LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên đề tài luận án: “Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích”

Chuyên ngành: Kỹ thuật hóa học

Mã số: 9 52 03 01

Nghiên cứu sinh: Trần Duy Phong

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

2. PGS.TS. Trần Quốc Toàn

Người nhận xét/ Người phản biện: PGS.TS. Ngô Xuân Lương

Cơ quan công tác: Trường Đại học Hồng Đức Thanh Hoá, 565 Quang Trung 3 phường Đông Vệ, Thành phố Thanh Hoá.

ĐT: 0916976556;

Email: ngoxuanluong@hdu.edu.vn

Nội dung nhận xét

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án.

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

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

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

Bên cạnh đó, nghiên cứu sử dụng công cụ hỗ trợ máy tính đã và đang đóng góp quan trọng trong lĩnh vực nghiên cứu phát triển thuốc. Dựa trên sự tiến bộ của công nghệ thông tin, các công cụ mô phỏng hóa sinh hiện đại đã có thể được sử dụng để sàng lọc ảo (*in silico*), nghiên cứu cơ chế hoạt động và dự đoán các hợp chất cấu trúc mới có hoạt tính mạnh. Luận án định hướng sử dụng kỹ thuật *in silico* nhằm dự đoán các hợp chất có tiềm năng về hoạt tính làm trắng da từ các loài rong nâu, đồng thời tìm hiểu cơ chế hoạt động, mối tương quan hoạt tính – cấu trúc của các hợp chất có hoạt tính theo ức chế tyrosinase. Với những dự định chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích bảo vệ sức khoẻ từ các mục tiêu : Xây dựng quy trình công nghệ chế biến toàn diện rong mơ *Sargasum. sp.* thành các sản phẩm có giá trị cao (fucoxanthin, phlorotanin, fucoidan và alginate) sử dụng tích hợp các kỹ thuật tiên tiến. Xây dựng quy trình công nghệ chiết xuất phenolic từ rong nâu theo phương pháp tích hợp vi sóng và enzyme; Nghiên cứu dự đoán khả năng làm trắng da của một số hợp chất phân lập từ chi rong. Xây dựng quy trình công nghệ chiết xuất alginate từ rong mơ theo phương pháp tích hợp siêu âm và enzyme, đánh giá tác dụng sinh học, xây dựng tiêu chuẩn cơ sở chế phẩm.

Chính vì vậy tác giả chọn thực hiện đề tài “**Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích**” là cấp thiết và có ý nghĩa khoa học thực tiễn cao

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo. Đề tài “Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích” là công trình nghiên cứu của chính tác giả 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 tác giả đã 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, rõ ràng và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành. . Đề tài “Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích” phù hợp với chuyên ngành và mã số đào tạo đó là : Kỹ thuật hóa học ; Mã số: 9.52.03.01

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu. Trong luận án tác giả đã sử dụng nhiều phương pháp, đây là những phương pháp thường quy, hiện đại sử dụng trong nghiên cứu hoá sinh học nên có độ tin cậy và chính xác cao cụ thể như : Phương pháp xác định hàm lượng phenolic tổng, Phương pháp xác định alginate, Phương pháp sàng lọc invitro, Phương pháp xác định hàm lượng và thành phần lipid, Phương pháp xác định thành phần và hàm lượng các axit béo, Xác định hàm lượng Fucoidan bằng phương pháp so màu, Xác định hàm lượng fucoxanthi. Các phương pháp đánh giá tác dụng sinh học như: Phương pháp đánh giá chỉ tiêu an toàn,. Phương pháp xác định độc tính cấp, . Nghiên cứu tính độc bán trường diễn, Phương pháp đánh giá tác dụng đào thải kim loại nặng, Phương pháp đánh giá khả năng chống loãng xương,

Phương pháp thử hoạt tính chống oxy hóa Phương pháp thử hoạt tính gây độc tính tế bào. Đặc biệt trong đánh giá chỉ tiêu an toàn : Xác định tổng số vi khuẩn yếu khí, nấm men, nấm mốc trong các sản phẩm thực phẩm tác giả đã sử dụng TCVN 4886-89; và đã xác định hết triệt để tất cả các chỉ tiêu như

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

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả. Điểm mới của luận án: Kết quả nghiên cứu của luận án đã chỉ ra 05 kết quả mới cụ thể :

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

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

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

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

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

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Cấu trúc luận án hợp lý, khoa học : Luận án bao gồm phần Mở đầu và 3 chương: Tổng quan; Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu và chương Kết quả thảo luận, Kết luận và tài liệu tham khảo. Toàn bộ luận án được trình bày trong 160 trang, 45 bảng, 44 hình vẽ và đồ thị, 126 tài liệu tham khảo các tài liệu tham khảo được cập nhật là tương đối mới có những trích dẫn sát với đề tài nghiên cứu . Luận án trình bày rõ ràng khoa học và logic ít lỗi chính tả.Luận án chưa được công bố trên bất kỳ tạp chí trong và ngoài nước.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố. Có 04 công trình công bố nội dung của luận án trên các tạp chí có uy tín trong và ngoài nước có 1 bài quốc tế, 01 sáng kiến hữu ích ... Nội dung của các công trình phản ánh nội dung của luận án và có giá trị khoa học cao cụ thể

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

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

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

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

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không; luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận học vị tiến sĩ được hay không.

Luận án và tóm tắt đã đáp ứng đầy đủ mức độ, các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ quy định tại Quy định đào tạo trình độ tiến sĩ của Học viện khoa học công nghệ - Viện Hàn lâm và Khoa học Công nghệ Việt Nam. Luận án được bảo vệ trước hội đồng khoa học và tác giả xứng đáng được nhận học vị tiến sĩ.

Thanh Hoá, ngày 26 tháng 2 năm 2024

XÁC NHẬN CỦA CƠ QUAN



**TRƯỞNG PHÒNG
TỔ CHỨC - HÀNH CHÍNH - QUẢN TRỊ**
Nguyễn Thị Dung

NGƯỜI NHẬN XÉT

PGS.TS. Ngô Xuân Lương

Mẫu trình bày Bản nhận /phản biện (làm 02 bản)

BẢN NHẬN XÉT/ PHẢN BIỆN LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên đề tài luận án: “Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích”

Chuyên ngành: Kỹ thuật hóa học

Mã số: 9 52 03 01

Nghiên cứu sinh: Trần Duy Phong

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

2. PGS. TS. Trần Quốc Toàn

Người phản biện: TS. Vũ Mạnh Hùng

Cơ quan công tác: Viện Tài nguyên và Môi trường biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Nội dung nhận xét:

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án.

Việt Nam là quốc gia biển, với 3.260 km bờ biển và sở hữu nhiều đảo, quần đảo trải dài từ vĩ độ Bắc đến . Dọc theo lãnh thổ trải dài khí hậu Việt Nam phân bố thành 3 vùng: miền Bắc có khí hậu cận nhiệt đới ẩm, miền Trung mang đặc điểm khí hậu nhiệt đới gió mùa, trong khi miền Nam nằm trong vùng nhiệt đới xavan. Chính sự khác biệt về điều kiện khí hậu đã tạo nên sự đa dạng loài với nhiều kiểu phân bố khác nhau.

Rong biển là đối tượng được người dân khai thác và nuôi trồng phục vụ đời sống cũng như sản xuất tạo nguồn nguyên liệu quan trọng cho các sản phẩm công nghiệp. Theo thống kê của các nhà khoa học thì cho đến năm 2019 đã phát hiện được 834 loài rong biển, trong đó có hơn 147 loài rong Nâu có giá trị kinh tế cao, trữ lượng lớn. Rong Nâu được xác định có nhiều thành phần có giá trị như axit alginic, fucoidan, fucoxanthin và phlorotanin... được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực công nghiệp, thực phẩm, bào chế thuốc, công nghệ mỹ phẩm. Một số chất trong rong Nâu có hoạt tính sinh học cao, có tác dụng chống ung thư, kháng khuẩn, virus mạnh, được ứng dụng nhiều trong sản xuất thuốc điều trị ung thư và trong nuôi trồng thủy sản.

Tuy nhiên, việc khai thác và chế biến rong Nâu của Việt Nam hiện còn hạn chế, rong Nâu chủ yếu được chế biến thành thực phẩm ở quy mô hộ gia đình. Hiện nay, việc chiết xuất các sản phẩm có giá trị từ rong Nâu chủ yếu được thực hiện ở quy mô mang tính nhỏ lẻ tự phát. Thiếu những trang thiết bị và công nghệ cao nhằm tạo ra các sản phẩm có giá trị về dược liệu và thực phẩm. Một số nghiên cứu đã ứng dụng và tích hợp các kỹ thuật tiên tiến (chiết siêu âm, chiết enzyme, chiết sử dụng vi sóng, chiết enzyme – siêu âm, chiết enzyme – vi sóng, ...) nhưng chỉ mới dừng ở việc chiết xuất các thành phần cụ thể, chưa đưa ra được quy trình chế biến toàn diện và sâu đối với đối tượng rong Nâu. Do đó, nhu cầu nghiên cứu ứng dụng các kỹ thuật tiên tiến để chế biến toàn diện và hiệu quả rong Nâu ở Việt Nam; đồng thời, định hướng tạo Alginate và một số sản phẩm hữu ích trong thực tiễn trở nên cấp bách.

Bên cạnh đó, nghiên cứu sử dụng công cụ hỗ trợ máy tính đã và đang đóng góp quan trọng trong lĩnh vực nghiên cứu phát triển thuốc. Dựa trên sự tiến bộ của công nghệ thông tin, các công cụ mô phỏng hóa sinh hiện đại đã có thể được sử dụng để sàng lọc ảo (in silico), nghiên cứu cơ chế hoạt động và dự đoán các hợp chất cấu trúc mới có hoạt tính mạnh. Luận án “Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để

chế biến toàn diện rong Nâu thành các sản phẩm hữu ích” của NCS Trần Duy Phong sử dụng kỹ thuật in silico nhằm dự đoán các hợp chất có tiềm năng về hoạt tính làm trắng da từ các loài rong nâu, đồng thời tìm hiểu cơ chế hoạt động, mối tương quan hoạt tính – cấu trúc của các hợp chất có hoạt tính theo ức chế tyrosinase. Luận án được triển khai với 3 mục tiêu chính là:

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

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

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

Kết quả nghiên cứu của Luận văn đã thể hiện được đầy đủ các nội dung nghiên cứu phục vụ cho ba mục tiêu nêu trên. Đây là những kết quả có ý nghĩa khoa học cao và mang tính thực tiễn góp phần vào nâng cao hiệu xuất chế biến từ rong biển từ đó hoàn thiện các quy trình kỹ thuật cho các ngành công nghiệp chế biến từ rong biển.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

Đề tài nghiên cứu của luận án không trùng lặp với các công trình, luận văn, luận án đã công bố trong và ngoài nước. Các tài liệu liên quan tham khảo từ các tác giả khác đã được luận án trích dẫn trung thực, đầy đủ, rõ ràng với 126 tài liệu tham khảo.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

Nội dung nghiên cứu Luận án phù hợp với tên đề tài và phù hợp với chuyên ngành và mã số chuyên ngành đào tạo.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.

NCS đã đưa ra 02 hệ thống phương pháp nghiên cứu trong luận án trong đó hệ thống xác định hàm lượng và sàng lọc có 07 phương pháp, hệ thống đánh giá tác dụng sinh học có 07 phương pháp. Các phương pháp này có sự tương quan, logic và gắn kết với nhau, phù hợp với các nội dung đưa ra trong luận án. Các phương pháp sử dụng trong luận án đều là những phương pháp nghiên cứu hiện đại được các nghiên cứu trong và ngoài nước sử dụng. Các công thức sử dụng trong tính toán đều dựa trên các tài liệu đã được công bố và có độ tin cậy. Hệ thống trang thiết bị tiên tiến, hiện đại và được thực hiện với kỹ thuật và độ chính xác cao tại các Viện chuyên ngành.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả.

Bằng việc áp dụng các phương pháp nghiên cứu tiên tiến, hiện đại với độ chính xác cao. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy được sự nghiêm túc của NCS trong việc triển khai các nội dung nghiên cứu và những phát hiện trong khoa học từ Luận án đã đưa ra được những quy trình chiết xuất toàn diện các hợp chất quý từ rong biển. Theo đó, các kết quả của Luận án đã đưa ra được những điểm mới như:

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

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

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

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

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

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Ưu điểm: Luận án tiến sĩ của NCS Trần Duy Phong có 136 trang và 13 trang phụ lục. Trong đó được bố cục hợp lý giữa các phần nội dung theo quy định. Cụ thể: tổng quan 32 trang; phương pháp 11 trang; kết quả thảo luận 72 trang chiếm 53% tổng số trang của Luận án. Luận án tham khảo 126 tài liệu đều là những nghiên cứu mới và có liên quan đến vấn đề nghiên cứu. Như vậy, về bố cục đã đảm bảo đúng quy định hình thức trình bày luận án tiến sĩ ban hành kèm theo Quyết định số: 755/QĐ-HVKHCN ngày 18 tháng 8 năm 2017 của Giám đốc Học viện KHCN.

Bố cục Luận án phù hợp và thể hiện được đầy đủ các nội dung nghiên cứu với kết quả, bảng và hình được trình bày rõ ràng.

Nhược điểm và một số yêu cầu chỉnh sửa: Luận án Tiến sĩ còn thiếu danh mục các ký hiệu, các chữ viết tắt, đề nghị cần bổ sung. Văn phong còn nhiều chỗ chưa được đúng trong khoa học, nhiều đoạn còn sử dụng văn nói trong Luận án, còn nhiều lỗi dùng văn từ dịch thuật tài liệu nước ngoài chưa chuẩn hóa theo văn phong khoa học cần phải rà soát và chỉnh sửa.

Để người đọc có thể hình dung được toàn bộ các vấn đề nghiên cứu thì phần “Mở đầu” cần phải bố cục lại gồm các phần như sau: Đặt vấn đề, Mục tiêu nghiên cứu, Nội dung nghiên cứu, Tóm tắt những đóng góp mới của Luận án, Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của Luận án.

Việc trích dẫn tài liệu cần được thống nhất theo đúng quy định của Học Viện KH&CN, các thuật ngữ tiếng Anh cần được Việt hóa như at al. chuyển thành và cs. Ngoài ra, cần cập nhật một số tài liệu mới liên quan đến thành phần loài rong biển và rong Nâu tại Việt Nam.

Cần rà soát lại đơn vị thập phân cách nhau bằng dấu “,” thay vì dấu “.” như trong Luận án.

Tên loài cần viết hoa như rong Mơ, rong Nâu. Hơn nữa cần bổ sung tên loài của các loài rong Nâu đã thu thập được và sử dụng trong nghiên cứu. Qua đó giúp người đọc và người tham khảo kết quả nghiên cứu được rõ và so sánh.

Phần kết luận cần viết lại thể hiện được các kết quả nghiên cứu của Luận án với mục tiêu đặt ra.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.

Luận án Tiến sĩ của NCS Trần Duy Phong đã công bố 4 công trình nghiên cứu: 01 bài báo trên tạp chí quốc tế uy tín; 01 GPHI thuộc Bằng độc quyền Giải pháp hữu ích; 02 02 bài báo trong diễn đàn khoa học quốc gia. Cả 04 công trình đều có chất lượng khoa học và là từng phần nội dung chủ yếu của luận án hoặc có liên quan trực tiếp đến luận án.

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không; luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận học vị tiến sĩ được hay không.

- Luận án của NCS. Trần Duy Phong đã đáp ứng được các yêu cầu về nội dung và hình thức của một Luận án Tiến sĩ chuyên ngành Kỹ thuật hóa học, Mã số: 9 52 03 01.

- Bản tóm tắt phản ánh trung thành nội dung cơ bản của Luận án.

- Luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận bằng Tiến sĩ.

Hà Nội, Ngày 26 tháng 2 năm 2024

Người nhận xét



Vũ Mạnh Hùng

Mẫu trình bày Bản nhận /phản biện (làm 02 bản)

BẢN NHẬN XÉT/ PHẢN BIỆN LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên đề tài luận án: “Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích”

Chuyên ngành: Kỹ thuật hóa học

Mã số: 9 52 03 01

Nghiên cứu sinh: Trần Duy Phong

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

2. PGS. TS. Trần Quốc Toàn

Người nhận xét/ Người phản biện: PGS. TS. Tạ Hồng Đức

Cơ quan công tác: Đại Học Bách Khoa Hà Nội

Nội dung nhận xét:

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về rong nâu và các chiết xuất từ rong nâu đã được quan tâm và tiến hành tại một số viện nghiên cứu và trường đại học trong thời gian gần đây. Điều này xuất phát từ các lợi ích to lớn mà cây rong nâu mang lại cho cuộc sống như các ứng dụng làm thực phẩm, môi trường nuôi cấy tế bào và nấm men, làm nhiên liệu sinh học. Rong nâu được xác định có nhiều thành phần có giá trị như axit alginic, fucoidan, fucoxanthin và phlorotannin.....Các nghiên cứu chiết xuất và ứng dụng từ cây rong nâu cũng đã được tiến hành tại nhiều đơn vị như Viện Thủy Sản Nha Trang, Đại Học Nha Trang. Việc chiết xuất các sản phẩm có giá trị từ rong nâu mới chỉ được thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm, quy mô pilot, hiện chưa có một nghiên cứu kỹ thuật tiên tiến nhằm đưa ra được quy trình chế biến toàn diện đối với nguồn nguyên liệu rong nâu Việt Nam. Do đó, việc triển khai nghiên cứu này đáp ứng được yêu cầu về tính cấp thiết, thời sự, có giá trị cả về mặt khoa học và thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

Tên của luận án, các số liệu thực nghiệm thu được, các kết quả nghiên cứu, các nhận xét cũng như kết luận đưa ra không trùng lặp với các luận án đã bảo vệ ở trong nước và ngoài nước.

Luận án đã trích dẫn 126 tài liệu tham khảo, việc trích dẫn tài liệu được thực hiện rõ ràng, đầy đủ và trung thực.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

Nội dung và mục tiêu của luận án là nghiên cứu ứng dụng các kỹ thuật hiện đại như siêu âm, enzyme, đặc biệt là công nghệ tích hợp các kỹ thuật vi sóng, enzyme,

màng lọc và ly tâm... để xây dựng quy trình công nghệ chế biến rong nâu trong điều kiện ở Việt Nam, thu được các sản phẩm có giá trị khác nhau như phenolic, alginate, fucoidan... Luận án cũng đã nghiên cứu đánh giá hoạt tính chống loãng xương, đánh giá độ an toàn của sản phẩm canxi algenat....

Do đó, tên của luận án phù hợp với nội dung và mục tiêu nghiên cứu, phù hợp với chuyên ngành Kỹ thuật hóa học và mã số chuyên ngành.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.

Các kết quả nghiên cứu của luận án có những đóng góp mới về mặt khoa học cũng như về giá trị thực tiễn. Luận án đã chứng minh được giá trị tiềm năng của các hoạt chất cũng như các sản phẩm thu được có ứng dụng cao trong thực tiễn. Về mặt công nghệ đó là sự tích hợp các công nghệ tiên tiến để tạo ra các sản phẩm có giá trị cao.

Nội dung nghiên cứu của luận án phù hợp với tên đề tài với mã số chuyên ngành kỹ thuật hóa học

Các phương pháp được sử dụng để thực hiện luận án:

- Phương pháp phân tích các thành phần hóa học
- Phương pháp xác định cấu trúc hóa học
- Xác định hàm lượng Fucoidan bằng phương pháp so màu
- Phương pháp xác định alginate
- Xác định hàm lượng protein, lipid, carbohydrate và độ ẩm trong các mẫu nguyên liệu, sản phẩm thực phẩm
- Phương pháp phân tích các chỉ tiêu an toàn thực phẩm
- Phương pháp đánh giá tác dụng sinh học
- Các phương pháp nghiên cứu được sử dụng trong luận án là tin cậy, các thiết bị đo để thực hiện là phù hợp và hiện đại với các mục tiêu và nội dung đề ra

Các công nghệ tích hợp trong luận án để chiết xuất và chế biến ra các sản phẩm cũng như các phương pháp nghiên cứu là hiện đại và phù hợp. Do đó, kết quả thu được có giá trị về thực tiễn và có thể tin cậy.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả.

Kết quả nghiên cứu của luận án có các đóng góp mới cho lĩnh vực chuyên ngành kỹ thuật hóa học:

- Đã sử dụng và tích hợp các kỹ thuật tiên tiến (chiết siêu âm, chiết vi sóng, chiết enzyme, lọc màng và ly tâm 3 pha) để đồng thời thu được các sản phẩm có giá trị từ rong mơ.

- Đã xây dựng quy trình công nghệ chiết xuất phenolic từ rong mơ theo phương pháp vi sóng và tối ưu hóa các điều kiện chiết xuất bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM).

- Đã nghiên cứu tích hợp một số công nghệ hiện đại để chiết xuất alginat từ rong mơ, nghiên cứu đánh giá hoạt tính chống loãng xương, đánh giá độ an toàn của sản phẩm canxi algenat....

- 71 hợp chất phân lập được từ chi rong đã được sàng lọc bằng phương pháp Docking phân tử, qua đó các hợp chất 11, 45 có khả năng trong việc phát triển thuốc. Từ đó định hướng cho việc tạo ra sản phẩm làm trắng da từ các hoạt chất chiết xuất từ rong mơ.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Ưu điểm: Luận án được trình bày chi tiết, có mức độ nghiên cứu sâu và rộng về các kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến rong mơ. Kết cấu của luận án tuân theo các tiêu chuẩn và nguyên tắc của luận án khoa học. Về hình thức, luận án được trình bày rõ ràng, mạch lạc, có sự logic và kết nối hợp lý giữa các phần.

Nhược điểm: về hình thức trình bày, tác giả cần thống nhất các thuật ngữ, danh pháp dùng trong toàn bộ luận án, rà soát và sửa một số lỗi chính tả liên quan đến tên hóa chất, tên vi sinh vật...

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.

Tác giả có 01 sáng chế đã được Cục sở hữu trí tuệ cấp Bằng độc quyền giải pháp hữu ích số 2606, cấp theo quyết định số 3750/QĐ-SHTT, ngày 08/3/2021. Bên cạnh đó, tác giả cũng có 03 bài báo, trong đó 01 bài báo đăng trên tạp chí khoa học quốc tế có uy tín (Q3; IF=1.8), 02 bài báo đăng trên tuyển tập báo cáo khoa học “Diễn đàn khoa học toàn quốc về sinh vật biển và phát triển bền vững”.

Các bài báo và sáng chế đã công bố đều phản ánh các kết quả chính của luận án. Các tạp chí, diễn đàn, tổ chức đăng tải và công nhận bài báo là có uy tín nên các bài báo tác giả công bố là có chất lượng, đặc biệt là 01 sáng chế đã được Cục sở hữu trí tuệ công nhận.

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không; luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận học vị tiến sĩ được hay không.

Nội dung nghiên cứu được trình bày trong luận án đáp ứng được các yêu cầu đối với luận án tiến sĩ chuyên ngành kỹ thuật hóa học.

Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án, giúp người đọc nắm được nội dung và kết quả nghiên cứu một cách nhanh chóng.

Trên cơ sở đánh giá các kết quả nghiên cứu đạt được, tôi đồng ý đề tác giả được bảo vệ luận án ở cấp Học viện để nhận học vị tiến sĩ.

Hà Nội, Ngày 26 tháng 2 năm 2024

Người nhận xét

PGS. Tạ Hồng Đức

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên đề tài luận án: “Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích”

Chuyên ngành: Kỹ thuật hóa học

Mã số: 9 52 03 01

Nghiên cứu sinh: Trần Duy Phong

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

2. PGS. TS. Trần Quốc Toàn

Người nhận xét: PGS. TS. Lê Thị Huyền

Cơ quan công tác: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Nội dung nhận xét:

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án.

Rong nâu được xác định có nhiều thành phần có giá trị như alginic acid, fucoidan, fucoxanthin và phlorotanin. Alginate được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như công nghiệp dệt (nâng cao độ bền cho sợi), công nghiệp giấy (chất tạo độ dính cho thuốc nhuộm), mực in (làm chất kết dính), công nghiệp thực phẩm (sử dụng làm phụ gia để tăng độ nhớt, khả năng tạo gel và làm ổn định hỗn hợp với nước, chống đông và nhũ hóa), bào chế thuốc, công nghệ mỹ phẩm (giữ mùi hương, tạo độ ổn định). Fucoidan trong rong nâu có hoạt tính sinh học cao, có tác dụng chống ung thư, kháng khuẩn, chống virus và được ứng dụng nhiều trong sản xuất thuốc điều trị ung thư và trong nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, việc khai thác và chế biến rong nâu của Việt Nam hiện còn hạn chế việc chiết xuất các sản phẩm có giá trị từ rong nâu chủ yếu được thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm hoặc pilot. Một số nghiên cứu đã ứng dụng và tích hợp các kỹ thuật tiên tiến (chiết siêu âm, chiết enzyme, chiết sử dụng vi sóng, chiết enzyme – siêu âm, chiết enzyme – vi sóng nhưng chỉ mới dừng ở việc chiết xuất các thành phần cụ thể, chưa đưa ra được quy trình chế biến toàn diện và sâu đối với đối tượng rong nâu. Do đó, yêu cầu nghiên cứu ứng dụng các kỹ thuật tiên tiến để chế biến toàn diện và hiệu quả rong nâu trong điều kiện ở Việt Nam; đồng thời, định hướng tạo alginate và một số sản phẩm hữu ích trong thực tiễn trở nên cấp bách. Do đó, đề tài “Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích” có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

Các kết quả công bố trong luận án không trùng lặp với bất kì công trình nào của Việt Nam và trên thế giới. Các kết quả nghiên cứu, các số liệu phân tích là trung thực, đáng tin cậy dựa trên các phương pháp nghiên cứu khoa học đúng đắn và được trình bày rõ ràng, mạch lạc.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

Luận án có nội dung hoàn toàn phù hợp với mã số chuyên ngành kỹ thuật hóa học mã số 9.52.03.51. Nội dung và kết quả nghiên cứu là rõ ràng, đầy đủ và có giá trị tham khảo tốt.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.

Các phương pháp nghiên được sử dụng trong đề tài này là phù hợp với các nội dung đưa ra, các phương pháp nghiên cứu bao gồm kết hợp các phương pháp thường quy trong nghiên cứu như phương pháp đo quang xác định tổng hàm lượng phenolic, alginate, fucoidan, GC-MS xác định hàm lượng các acid béo, TLC, các phương pháp chiết xuất với sự hỗ trợ của siêu âm, enzym. Ngoài ra luận án còn sử dụng nhiều phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học như hoạt tính chống oxi hóa quét gốc tự do DPPH, chống loãng xương *in vitro*, thử hoạt tính gây độc tế bào theo phương pháp MTT, và còn sử dụng phương pháp sàng lọc ảo *in silico* để sàng lọc các hợp chất có khả năng ức chế enzym tyrosidase với mục tiêu tìm kiếm nhanh chóng các hợp chất làm trắng da. Kết quả của các phương pháp nghiên cứu được sử dụng đảm bảo tính hiện đại cho độ tin cậy và tính đặc hiệu cao.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả.

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

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

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

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

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

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

a) Ưu điểm

Luận án được thiết kế tốt, có nội dung nghiên cứu rõ ràng, phương pháp nghiên cứu hiện đại, có độ tin cậy cao. Luận án thu được nhiều kết quả có ý nghĩa, những đóng góp này làm cơ sở khoa học tốt cho những nghiên cứu tiếp theo và có giá trị tham khảo. Đây là một công trình nghiên cứu rất hay và hoàn chỉnh, có khối lượng nghiên cứu tương đối lớn và thu được nhiều kết quả có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

Luận án được trình bày sạch, đẹp, rõ ràng, bố cục hợp lý, các bảng biểu, hình vẽ được bố trí khoa học. Tài liệu tham khảo phong phú và cập nhật và được trích dẫn đầy đủ, chính xác.

b) Nhược điểm

- Luận án còn một số lỗi chính tả in ấn như: thống nhất danh pháp hóa học hết bằng tiếng anh trong toàn luận án, viết hoa nhiều từ như Rong, Nâu, Mỡ, Alginate chưa chính xác.

- Một số chỗ trích dẫn chưa đúng và thống nhất.

- Kiểm tra kỹ, sửa lỗi chính tả cẩn thận cho phần tổng quan và kết quả và thảo luận

- Phần phương pháp nghiên cứu, đặc biệt là phần phương pháp thử nghiệm hoạt tính sinh học nên viết gọn lại.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.

Nội dung của luận án đã được công bố trên 1 tạp chí quốc tế ISI Q3, 1 bằng giải pháp hữu ích và 02 bài báo đăng trên tuyển tập hội nghị. Các bài báo, giải pháp hữu ích phản ánh nội dung cơ bản của luận án, có chất lượng tốt, có giá trị tham khảo cao.

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không; luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận học vị tiến sĩ được hay không.

Các kết quả trong luận án cho thấy đây là một luận án có khối lượng công việc lớn, chất lượng tốt và có mục tiêu rõ ràng. Tác giả đã công bố được 3 công trình trên các tạp chí Khoa học trong nước và quốc tế có uy tín và 1 bằng độc quyền giải pháp hữu ích, đã

khẳng định giá trị khoa học cao của luận án. Vì thế, Luận án của NCS đáp ứng được yêu cầu nội dung của một bản Luận án Tiến sĩ về kỹ thuật hóa học (về nội dung chuyên ngành và mã số chuyên ngành) theo qui định tại Điều 30 của Quy chế 10/2009 và sửa đổi tại Thông tư 05/2012/TT-BGDĐT. Do vậy, tôi đồng ý cho NCS Trần Duy Phong được bảo vệ luận án trước Hội đồng chấm luận án cấp Học viện để NCS nhận học vị tiến sĩ.

Hà Nội, Ngày 26 tháng 2 năm 2024

Người nhận xét



PGS. TS. Lê Thị Huyền

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Tên đề tài luận án: “Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích”

Chuyên ngành: Kỹ thuật hóa học

Mã số: 9 52 03 01

Nghiên cứu sinh: Trần Duy Phong

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

2. PGS. TS. Trần Quốc Toàn

Người nhận xét: TS. Trịnh Thị Thu Hương

Cơ quan công tác: Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Nội dung nhận xét:

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án.

Rong biển là nhóm thực vật bậc thấp sống trong thủy vực nước mặn và nước lợ tại các vùng cửa sông, ven biển và các đảo xa bờ. Đây là nhóm thực vật có khả năng phát triển rất nhanh, tạo ra nguồn sinh khối lớn trong thời gian ngắn. Bên cạnh đó, Rong biển là đối tượng có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học cao như các sắc tố của hệ quang tổng hợp, các polysaccharide, lipid dự trữ, steroid, vitamin...có tiềm năng ứng dụng lớn trong lĩnh vực Y, Dược. Trên thế giới, đã có nhiều sản phẩm thương mại từ nguồn nguyên liệu Rong biển. Ở Nhật, Rong biển được sử dụng để làm thuốc chữa bệnh cao huyết áp, trị giun sán; Ở Mỹ, Trung Quốc, các sản phẩm từ Rong được sử dụng trong phòng ngừa và điều trị ung thư...Ở Việt Nam, việc khai thác và chế biến rong, đặc biệt là các loài thuộc ngành Rong nâu, còn nhiều hạn chế. Rong chủ yếu được chế biến thành thực phẩm qui mô hộ gia đình. Luận án nghiên cứu thành công việc sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện Rong nâu thành các sản phẩm hữu ích góp phần quan trọng trong việc khai thác và sử dụng nguồn tài nguyên này một cách hiệu quả. Do đó, Luận án có tính cần thiết, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

Đề tài luận án không trùng lặp với các công trình và kết quả nghiên cứu đã được công bố. Các kết quả của Luận án đã được đăng trên tạp chí khoa học chuyên ngành uy tín trong nước, quốc tế và đăng kí được 01 Giải pháp hữu ích tại Cục sở hữu trí tuệ Việt Nam. Đây là minh chứng về tính mới, sự không trùng lặp với các công trình nghiên cứu trong nước và quốc tế trước đó.

Các tài liệu tham khảo được trích dẫn trung thực, rõ ràng và đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.



Tên đề tài luận án phù hợp với nội dung nghiên cứu. Nội dung của luận án phù hợp với chuyên ngành đã đăng ký.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.

Luận án đã sử dụng các phương pháp, thiết bị, kỹ thuật hiện đại, phù hợp; các phần mềm chuyên dụng cập nhật được sử dụng trong nghiên cứu xây dựng quy trình tạo sản phẩm.

Các phương pháp nghiên cứu hóa học và đánh giá hoạt tính sinh học được sử dụng theo các phương pháp chuẩn, hiện đại đã được công bố trên các tạp chí quốc tế uy tín, do đó, có độ tin cậy cao.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả.

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

- Lần đầu tiên tiến hành nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện chiết xuất phenolic từ rong nâu theo phương pháp vi sóng bằng phương pháp đáp ứng bề mặt.

- Lần đầu tiên đã xây trình công nghệ sâu chiết xuất alginate từ rong mơ theo phương pháp tích hợp siêu âm và enzyme; nghiên cứu quá trình thu nhận alginate.

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

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

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Góp ý:

- Bổ sung Danh mục các chữ viết tắt.
- Sửa “Danh mục hình ảnh” thành “Danh mục hình”
- Cần bổ sung Chương 3 – Thực nghiệm
- Bổ sung các thông số, số liệu trong qui trình chế biến toàn diện Rong mơ (hình 3.37, trang 115 Luận án; trang 18 – Tóm tắt Luận án)
- Phần Tài liệu tham khảo cần trình bày theo đúng qui định.
- Sửa các lỗi in ấn, chế bản.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.

Nội dung Luận án đã công bố 01 bài báo trên tạp chí quốc tế uy tín (Natural Product Communications, 2021, Q3); 2 bài đăng trên Hội nghị quốc gia (Tuyển tập báo cáo khoa học Diễn đàn khoa học toàn quốc, 2019) và 01 Giải pháp hữu ích tại Cục sở hữu trí tuệ Việt Nam (2021).

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không; luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận học vị tiến sĩ được hay không.

- Luận án có nội dung và hình thức đáp ứng đầy đủ các yêu cầu với một luận án Tiến sĩ quy định tại Điều 20 Quy chế. Kính đề nghị cho phép NCS Trần Duy Phong đưa luận án ra bảo vệ tại hội đồng cấp Học viện để nhận học vị Tiến sĩ.

Hà Nội, Ngày 27 tháng 2 năm 2024

Xác nhận của Cơ quan



Hoàng Thị Bích

Người nhận xét

TS. Trịnh Thị Thu Hương



Hà Nội, ngày 23 tháng 3 năm 2024

QUYẾT NGHỊ CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

I. THÔNG TIN CHUNG

Họ và tên NCS: **Trần Duy Phong**
Tên đề tài luận án: *Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong Nâu thành các sản phẩm hữu ích*
Chuyên ngành: Kỹ thuật hóa học
Mã số: 9 52 03 01
Người hướng dẫn: GS. TS. Phạm Quốc Long, PGS.TS. Trần Quốc Toàn
Thời gian bảo vệ: Từ 09h00 đến 12h05 ngày 23/03/2024
Địa điểm bảo vệ: Phòng họp 1705, Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội



II. QUYẾT NGHỊ CỦA HỘI ĐỒNG CHẤM LUẬN ÁN

Sau khi thảo luận và thống nhất ý kiến, Hội đồng đã nhất trí những nội dung quyết nghị sau đây về luận án :

- 7/7 phiếu đánh giá đều nhất trí đồng ý đánh giá tán thành cho NCS Trần Duy Phong được nhận học vị Tiến sĩ Hóa học.
- 3/7 phiếu đánh giá Luận án đạt mức xuất sắc.

*** Luận án đã đạt được những kết quả chính sau đây:**

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

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

3. Đã đưa ra quy trình công nghệ chế biến toàn diện rong Mơ thành các sản phẩm có giá trị cao như phenolic, fucoidan, alginate theo phương pháp tích hợp các kỹ thuật tiên tiến (enzyme, siêu âm, vi sóng, ly tâm tốc độ cao...) hiệu quả với khả năng thu hồi đồng bộ, hiệu suất cao các sản phẩm và hạn chế tối đa chất thải từ nguồn nguyên liệu rất dồi dào, có sẵn trong tự nhiên.

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

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

6. Đã nghiên cứu quy trình thu nhận và xử lý phụ phẩm của quá trình chiết xuất, chế biến rong Mơ để làm phân bón vi sinh, thực hiện quy trình công nghệ tuần hoàn không phát thải, góp phần bảo vệ môi trường và nâng cao giá trị sử dụng rong Mơ.

*** Những đóng góp mới của Luận án:**

1. Lần đầu tiên khảo sát chi tiết các đối tượng rong Nâu thu được dọc bờ biển Việt Nam từ Quảng Ninh đến Nha Trang, Trường Sa... Qua đó, đánh giá được hàm lượng alginate, hàm lượng lipit tổng, hàm lượng omega 3, 6, 9 trong các mẫu rong Nâu của Việt Nam.

2. Lần đầu tiên thực hiện nghiên cứu tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) đối với quy trình công nghệ chiết xuất phenolic từ rong Mơ có hỗ trợ vi sóng.

3. Lần đầu tiên xây dựng quy trình công nghệ tích hợp các phương pháp kỹ thuật tiên tiến, hiện đại (vi sóng, siêu âm, enzyme, ly tâm tốc độ cao...) để chiết tách toàn bộ các hoạt chất có giá trị trong rong Mơ (phenolic, fucoidan, alginate) và sản xuất chế phẩm Canxi alginate ở quy mô mini pilot. Phụ phẩm trong quá trình chế biến đã được thu gom để nghiên cứu làm phân vi sinh, thực hiện quy trình công nghệ tuần hoàn không phát thải, góp phần bảo vệ môi trường và nâng cao giá trị sử dụng rong Mơ.

Các kết quả Luận án đạt được có cơ sở khoa học, trung thực và có độ tin cậy thông qua các công trình đã công bố: 01 bằng độc quyền giải pháp hữu ích, 01 bài báo đăng trên tạp chí quốc tế thuộc danh mục ISI và 02 bài báo được báo cáo tại Hội nghị Khoa học toàn quốc.

Nội dung nghiên cứu của Luận án có tính cấp thiết, ý nghĩa khoa học và tính thực tiễn cao, đã nghiên cứu để chế biến toàn diện đối tượng rong Mơ (thuộc họ rong Nâu) thành các sản phẩm có thể sử dụng trong ngành công nghiệp, thực phẩm, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và dược phẩm, góp phần mang lại lợi ích về môi trường, sức khỏe, kinh tế và hỗ trợ cho sự phát triển bền vững, hiệu quả kinh tế biển Việt Nam.

Luận án hoàn toàn đáp ứng được các yêu cầu về nội dung và hình thức của một Luận án Tiến sĩ chuyên ngành Kỹ thuật hóa học.

- NCS cần phải sửa chữa luận án theo góp ý trong Biên bản của Hội đồng chấm luận án cấp Học viện trước khi nộp quyển cho Thư viện Quốc gia.

Hội đồng nhất trí đề nghị cho **NCS. Trần Duy Phong** được nhận học vị Tiến sĩ Hóa học. 100% thành viên hội đồng nhất trí thông qua biểu quyết công khai.

THƯ KÝ

TS. Trịnh Thị Thu Hương

CHỦ TỊCH

GS.TS. Phạm Văn Thiêm

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO



**KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**

Nguyễn Thị Trung



Hà Nội, ngày 23 tháng 3 năm 2024

**BIÊN BẢN CỦA
HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN**

Họ và tên NCS: **Trần Duy Phong**

Tên đề tài luận án: “Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện Rong nâu thành các sản phẩm hữu ích”.

Chuyên ngành: Kỹ thuật hóa học

Mã số: 9 52 03 01

Người hướng dẫn: GS.TS. Phạm Quốc Long, PGS. TS. Trần Quốc Toàn

Đại biểu tham dự: GS.TS. Vũ Đình Lâm, GD-Học viện KHCN, PGS.TS. Phạm Minh Quân – Phó viện trưởng-Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Ông Nguyễn Hữu Hưng – Chuyên viên cao cấp – Vụ Đánh giá, Thẩm định và Giám định công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ.

Quyết định thành lập Hội đồng: Quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp học viện số 23/QĐ-HVKHCN của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ, ngày 18 tháng 01 năm 2024.

Thời gian tổ chức: 09 giờ 00 phút ngày 23 tháng 03 năm 2024.

Địa điểm tổ chức: Phòng họp 1705, Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội.

I. THÀNH PHẦN THAM DỰ

1. Thành phần Hội đồng:

- Hội đồng có mặt 7/7 thành viên. Vắng mặt: 0

- Danh sách các thành viên Hội đồng có mặt gồm có:

TT	Họ và tên, học hàm, học vị và nơi công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1	GS.TS. Phạm Văn Thiêm – Hội Khoa học các sản phẩm thiên nhiên	Chủ tịch
2	PGS.TS. Nguyễn Tuấn Anh - Đại học Công nghiệp Hà Nội, Bộ Công Thương	Phản biện 1
3	PGS.TS. Ngô Xuân Lương – Trường Đại học Hồng Đức, Ủy ban nhân dân Thành phố Thanh Hóa.	Phản biện 2

4	TS. Vũ Mạnh Hùng – Viện Tài nguyên và Môi trường biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.	Phản biện 3
5	TS. Trịnh Thị Thu Hương - Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.	Ủy viên - Thư ký
6	PGS.TS. Tạ Hồng Đức – Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội	Ủy viên
7	PGS.TS. Lê Thị Huyền – Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội	Ủy viên

II. NỘI DUNG BUỔI BẢO VỆ

1. CV. Nguyễn Thị Thanh Ngân – Đại diện cơ sở đào tạo Học viện Khoa học và Công nghệ tuyên bố lý do, giới thiệu đại biểu, đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận án Tiến sĩ cấp Học viện của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ cùng danh sách các thành viên Hội đồng và mời GS.TS. Phạm Văn Thiêm - Chủ tịch Hội đồng điều khiển buổi bảo vệ.

2. GS.TS. Phạm Văn Thiêm - Chủ tịch Hội đồng, điều khiển buổi bảo vệ:

- Chủ tịch Hội đồng công bố thành phần Hội đồng có mặt 7/7 thành viên, buổi họp đảm bảo điều kiện theo quy chế để Hội đồng có thể làm việc và công bố chương trình làm việc.

- Chủ tịch Hội đồng đề nghị Thư ký Hội đồng thông báo các điều kiện chuẩn bị cho buổi bảo vệ và đọc lý lịch khoa học của NCS.

3. TS. Trịnh Thị Thu Hương - Thư ký Hội đồng: đọc thông báo các điều kiện cho buổi bảo vệ và lý lịch khoa học của NCS. Trần Duy Phong.

(Không có câu hỏi, thắc mắc từ các thành viên hội đồng và những người tham dự về lý lịch khoa học và quá trình đào tạo của nghiên cứu sinh)

4. NCS trình bày luận án:

Nội dung trình bày gồm các phần chính sau đây:

Phần 1. Đặt vấn đề, giới thiệu về đối tượng nghiên cứu, tính cấp thiết và mục tiêu nghiên cứu của luận án.

Phần 2. Đối tượng, phương pháp nghiên cứu và các kỹ thuật nghiên cứu đã sử dụng.

Phần 3. Kết luận và kiến nghị.

5. Chủ tịch Hội đồng mời 03 phản biện đọc bản nhận xét luận án.

❖ **Phản biện 1: PGS.TS. Nguyễn Tuấn Anh, đọc bản nhận xét (có văn bản kèm theo):**

• **Nhận xét:**

- Luận án nghiên cứu chế biến toàn diện Rong nâu không chỉ đáp ứng nhu cầu thực tế mà còn mang lại lợi ích lớn về môi trường, sức khỏe, kinh tế, hỗ trợ vào sự phát

triển bền vững và hiệu quả của nguồn lực biển. Bởi vậy, luận án có tính thời sự, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn;

- Luận án có nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành và mã số đào tạo. Nội dung và các số liệu trong luận án không trùng lặp với các công trình đã được công bố;
- Các phương pháp nghiên cứu hiện đại, linh hoạt, phù hợp với đối tượng và nội dung nghiên cứu. Do vậy, các kết quả là rõ ràng, có độ tin cậy cao;
- Ngôn ngữ sử dụng trong luận án có tính khoa học, chính xác, chuyên nghiệp.

• **Góp ý:**

- Hình ảnh và đồ thị nên in màu.
- Nên sử dụng hình ảnh, biểu đồ, bảng biểu để hỗ trợ mô tả và minh họa làm cho luận án trở nên dễ hiểu và hấp dẫn hơn.

• **Câu hỏi:**

1. Phần mềm design expert 7.0 có bản quyền không? Giải thích cách đánh giá tối ưu mô hình nghiên cứu tích hợp thông qua sử dụng phần mềm design expert 7.0?
2. Tại sao sử dụng vi sóng và siêu âm cho kết quả khác nhau? Luận án đã sử dụng đồng thời cả hai công nghệ để tạo ra sản phẩm. Vậy tác giả có thực hiện so sánh, đối chiếu khi dùng riêng từng phương án công nghệ không?
3. Làm rõ hơn về nội hàm các thuật ngữ “Công nghệ kỹ thuật tiên tiến”? “Công nghệ tích hợp”, “Chế biến toàn diện sản phẩm”

Đánh giá chung: Luận án có khối lượng nghiên cứu lớn, được trình bày rõ ràng, logic. Đồng ý đề NCS bảo vệ luận án tiến sĩ cấp Học viện để nhận học vị Tiến sĩ Hóa học.

❖ **Phản biện 2: PGS.TS. Ngô Xuân Lương, đọc nhận xét (có văn bản kèm theo):**

• **Nhận xét:**

- Đề tài có tính cấp thiết, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Nội dung nghiên cứu và kết quả của luận án có tính mới, không trùng lặp với các công trình, luận án công bố ở trong và ngoài nước;
- Nội dung nghiên cứu của luận án hoàn toàn phù hợp với chuyên ngành và mã số chuyên ngành đào tạo;
- Các phương pháp đã sử dụng trong luận án thường quy, hiện đại sử dụng trong nghiên cứu hóa sinh học nên có độ tin cậy và chính xác cao; Tài liệu tham khảo được trích dẫn đầy đủ, chính xác, cập nhật;

• **Câu hỏi:**

1. Tổng quan về hợp chất phenolic là gì?
2. Giải thích tại sao dạng đồng phân *trans*-fucoxanthin trong Rong nâu chiếm ưu thế hơn?

3. Giải thích tại sao sử dụng hệ dung môi etanol khi chiết các hợp chất phenolic?
Ngoài tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 35/1, có khảo sát thêm tỉ lệ nào khác không?
Nếu chỉ có tỷ lệ 35:1 thì cơ sở nào để sử dụng thì tỷ lệ này?

Đánh giá chung: Luận án có cấu trúc hợp lý, khoa học, đáp ứng đầy đủ các yêu cầu đối với một luận án Tiến sĩ chuyên ngành Kỹ thuật Hóa học. Đề nghị Hội đồng cho phép NCS Trần Duy Phong bảo vệ luận án tại Hội đồng chấm luận án cấp Học viện để nhận học vị Tiến sĩ.

❖ **Phản biện 3: TS. Vũ Mạnh Hùng, đọc bản nhận xét (có văn bản kèm theo):**

• **Nhận xét:**

- Kết quả đề tài góp phần vào nâng cao hiệu suất chế biến rong biển, từ đó hoàn thiện các quy trình kỹ thuật cho các ngành công nghiệp chế biến từ rong. Bởi vậy, luận án mang tính cần thiết, có ý nghĩa khoa học và giá trị thực tiễn cao.
- Bố cục luận án phù hợp và thể hiện được đầy đủ các nội dung nghiên cứu.
- Phương pháp được sử dụng trong luận án có sự tương quan, logic và gắn kết với nhau, phù hợp với nội dung nghiên cứu; hệ thống trang thiết bị tiên tiến, hiện đại và được thực hiện với kỹ thuật có độ chính xác cao.
- Luận án không trùng lặp với các công trình nghiên cứu đã được công bố;

• **Góp ý:**

- Bổ sung danh mục ký hiệu các chữ viết tắt;
- Tài liệu tham khảo cần trình bày theo đúng mẫu quy định;
- Cần viết hoa các tên riêng, ví dụ: Rong mơ, Rong nâu;
- Phần đối tượng nghiên cứu cần bổ sung tên khoa học, thông tin phân loại học của các mẫu nghiên cứu;
- Bảng 3.2 về hàm lượng alginat trong nghiên cứu rong biển nên tổng hợp kết quả theo chi và khu vực nghiên cứu để cho thấy mức biến động của hàm lượng alginat
- Bổ sung thông tin đơn vị tính trong các biểu đồ từ 3.20 đến 3.23;
- Chỉnh sửa các nước chính tả, in ấn.

• **Câu hỏi:**

1. Dựa trên kết quả nghiên cứu của luận án, nêu đánh giá khả năng nhân rộng và tách chiết các hợp chất từ rong biển ở Việt Nam?
2. Nêu những giải pháp hay định hướng nhằm thúc đẩy mạnh mẽ việc khai thác và phát triển các sản phẩm từ rong biển?

Đánh giá chung: Luận án đáp ứng đầy đủ yêu cầu về nội dung, hình thức của một luận án Tiến sĩ chuyên ngành Kỹ thuật Hóa học. Đồng ý cho NCS bảo vệ luận án tại Hội đồng chấm luận án cấp Học viện để nhận học vị Tiến sĩ.

6. NCS. Trần Duy Phong – tác giả luận án trả lời các câu hỏi của phản biện

NCS cảm ơn những nhận xét, góp ý của các phản biện và xin tiếp thu, chỉnh sửa, hoàn thiện luận án theo các nhận xét, góp ý của các thầy.

1. *Phần mềm design expert 7.0 có bản quyền không? Giải thích cách đánh giá tối ưu mô hình nghiên cứu tích hợp thông qua sử dụng phần mềm design expert 7.0?*

Tại thời điểm nghiên cứu, phần mềm Design expert đã có phiên bản 9.0 nhưng nhóm nghiên cứu chỉ sử dụng phiên bản 7.0 có bản quyền (dùng code của ĐH Bách Khoa HN). Hiện nay phần mềm Design expert đã ra đến phiên bản 13.

Giải thích cách đánh giá tối ưu mô hình nghiên cứu tích hợp thông qua sử dụng phần mềm design expert 7.0?

Nghiên cứu tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) được xây dựng trên cơ sở mô hình thí nghiệm của Box-Behnken:

- Biến mã hóa được chạy cho 4 yếu tố là nồng độ Ethanol, tỷ lệ dung môi : nguyên liệu, thời gian chiết và công suất vi sóng (Bảng 3.11), 4 yếu tố này sẽ được tổ hợp thành 24 nhóm (theo các giá trị A, B, C, D) và 3 nhóm trung tâm (giá trị = 0), đây cũng là cơ sở để hình thành bảng 3.12. Tại Bảng 3.12, giá trị Y1 (hàm lượng phlorotanin) và Giá trị Y2 (khối lượng cao chiết) được đo theo thực nghiệm của các nhóm biến mã hóa.

- Kết quả thực nghiệm (Bảng 3.12) sẽ được đưa vào phần mềm Design expert 7.0 để cho ra các kết quả về mô tả toán học của hàm mục tiêu Y1, Y2; mô hình bề mặt đáp ứng của hàm mục tiêu...

2. *Tại sao sử dụng vi sóng và siêu âm cho kết quả khác nhau?*

Chiết siêu âm và chiết vi sóng có sự khác nhau về cơ chế và nguyên lý hoạt động.

- Siêu âm gây ra hiện tượng xâm thực (tạo lỗ hồng) dẫn đến lực cắt mạnh trong hệ. Việc nổ các bong bóng khí xâm thực trên bề mặt vật liệu khiến cho các tia nhỏ được sinh ra và gây nên các ảnh hưởng như tách bề mặt, bào mòn và vỡ thành các mảnh nhỏ tạo điều kiện thuận lợi cho việc hòa tan các chất trong vật liệu và vận chuyển chúng ra môi trường dung môi. Hơn nữa, sự nổ các bong bóng trong môi trường lỏng dẫn đến sự chuyển động nhiễu loạn ở phạm vi lớn (vĩ mô) và sự trộn lẫn phạm vi nhỏ (vi mô) giúp tăng mạnh quá trình khuếch tán vật chất từ bên mặt vật liệu vào môi trường dung môi.

- Vi sóng có tác dụng làm tăng nhiệt độ của vật chất một cách đặc biệt, không phụ thuộc vào sự dẫn nhiệt của bình chứa hay vật chất. Nhiệt sinh ra theo 2 cơ chế dẫn truyền ion và quay lưỡng cực. Khi chiếu xạ vi sóng vào môi trường chiết chứa dược liệu và dung môi phân cực, các phân tử dung môi và các chất phân cực sẽ dao động và nóng lên nhanh chóng làm tăng khả năng hòa tan các chất vào dung môi. Hơn nữa, vi sóng cũng làm phá hủy cấu trúc vách tế bào thực vật, tạo điều kiện cho chất tan giải phóng vào môi trường dễ dàng, làm cho việc chiết xuất nhanh hơn nhưng cũng làm cho dịch chiết lẫn nhiều tạp chất hơn.

Luận án đã sử dụng đồng thời cả hai công nghệ để tạo ra sản phẩm. Vậy tác giả có thực hiện so sánh, đối chiếu khi dùng riêng từng phương án công nghệ không?

Trong quá trình thực nghiệm, nhóm nghiên cứu cũng đã tiến hành so sánh giữa phương pháp chiết siêu âm và chiết vi sóng, kết quả cho thấy phương pháp vi sóng giúp hỗ trợ chiết xuất fucoidan và alginate tốt hơn, phương pháp siêu âm giúp thu nhận phenolic tốt hơn. Bên cạnh đó, phương pháp siêu âm có thể dễ dàng ứng dụng để chiết xuất nguyên liệu ở quy mô bán công nghiệp và công nghiệp hơn so với phương pháp vi sóng.

3. *Làm rõ hơn về nội hàm các thuật ngữ “Công nghệ kỹ thuật tiên tiến”? “Công nghệ tích hợp”, “Chế biến toàn diện sản phẩm”*

So với các kỹ thuật truyền thống (chiết Soxhlet, ngâm chiết, chưng cất...), các kỹ thuật mới như “chiết siêu âm”, “chiết vi sóng”, “chiết enzyme”... được đánh giá là tiên tiến, hiện đại, thân thiện với môi trường do tổng hợp các chất ít độc hại hơn, sử dụng các dung môi an toàn hơn, tiết kiệm năng lượng, có thể tái sử dụng, giảm các tạp chất, hiệu quả kinh tế cao, không gây ô nhiễm và an toàn với người làm.

Trong những năm gần đây cũng đã có nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước về việc ứng dụng các kỹ thuật tiên tiến, hiện đại để chiết xuất các hợp chất từ Rong nâu. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu này chỉ dừng lại ở việc sử dụng một công nghệ hoặc tập trung chiết xuất một loại sản phẩm nhất định.

Do đó, trong luận văn này, em sử dụng tích hợp nhiều công nghệ tiên tiến như siêu âm, vi sóng, enzyme... và tiến hành chiết xuất toàn diện các hợp chất có giá trị của Rong nâu như phenolic, fucoidan, alginate; bã rong được tận dụng làm phân bón. Luận văn hướng đến việc nghiên cứu tận dụng tối đa nguồn nguyên liệu rong để sản xuất các sản phẩm có giá trị, không phát sinh chất thải, đồng thời hạn chế mức thấp nhất việc sử dụng các loại hóa chất độc hại và xả thải ra môi trường.

- NCS trả lời câu hỏi của Phản biện 2:

1. Tổng quan về hợp chất phenolic

Phenolic có cấu tạo gồm nhóm hydroxyl (-OH) liên kết trực tiếp với nhóm hydrocarbon thơm. Phenolics đóng vai trò quan trọng đối với chức năng chống oxy hóa của rong biển. Hàm lượng và thành phần của phenolic trong rong biển thay đổi theo loài, theo mùa. Trong Rong nâu, phlorotannin là nhóm các hợp chất phenolic chính. Phlorotannin được tổng hợp theo con đường axetat-malonate còn được gọi là con đường polyketide được tạo ra bởi quá trình trùng hợp phloroglucinol. Phlorotannin là những thành phần cực kỳ ưa nước với nhiều kích thước phân tử từ 126 kDa đến 650 kDa. Phlorotannin có nhiều tác dụng như giải độc kim loại nặng, tác dụng kháng khuẩn, chống tia cực tím, chống oxy hóa, chống tăng sinh, chống HIV và bảo vệ da, chống phóng xạ và chống dị ứng...

2. *Giải thích tại sao dạng đồng phân trans-fucoxanthin trong Rong nâu chiếm ưu thế hơn?*

Fucoxanthin là một xanthophyll và có cấu trúc độc đáo, bao gồm một liên kết allenic bất thường và 5,6-monoepoxide trong phân tử của nó. Fucoxanthin từ rong *Undaria* tươi chủ yếu được tìm thấy dưới dạng đồng phân hình học all-trans (~88%), nguyên nhân do các dạng đồng phân trans ổn định hơn; Sự hấp thụ và kết hợp dạng trans của fucoxanthin

vào lipid tế bào nhanh hơn so với dạng cis. Tuy nhiên, dạng cis của fucoxanthin được phát hiện có tác dụng ức chế cao hơn với tế bào ung thư bạch cầu (HL-60) và tế bào ung thư ruột kết (Caco-2).

3. Giải thích tại sao sử dụng hệ dung môi etanol khi chiết các hợp chất phenolic?

Nhóm nghiên cứu đã tiến hành thực nghiệm để lựa chọn dung môi chiết (bao gồm nước cất, acetone, ethanol và methanol). Kết quả cho thấy dung môi ethanol cho hiệu suất chiết tốt, đồng thời đây cũng là dung môi an toàn, thân thiện với môi trường và con người, không ảnh hưởng đến quá trình nghiên cứu chiết xuất và chế biến các sản phẩm khác sau khi chiết phenolic.

Ngoài tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 35/1, có khảo sát thêm tỉ lệ nào khác không? Nếu chỉ có tỷ lệ 35:1 thì cơ sở nào để sử dụng thì tỷ lệ này?

Nhóm nghiên cứu đã khảo sát tỷ lệ chiết giữa dung môi/nguyên liệu lần lượt là 15/1, 20/1, 25/1, 30/1, 35/1 và 40/1. Kết quả cho thấy tỷ lệ Tỉ lệ dung môi/nguyên liệu tăng thì hàm lượng phenolic chiết xuất và khối lượng cao chiết cũng tăng dần. Tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu tăng từ 15/1 đến 35/1 thì hàm lượng phenolic tăng từ 0.66 mgGAE/g lên 1.48 mgGAE/g, khối lượng cao chiết tăng rõ rệt từ 5.2 mg lên 8.3 mg. Tuy nhiên, khi tỉ lệ dung môi/nguyên liệu tăng đến 40/1 thì hàm lượng phenolic cũng như khối lượng cao chiết tăng không đáng kể.

Nguyên nhân do:

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

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

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

- NCS trả lời câu hỏi của Phản biện 3:

1. Dựa trên kết quả nghiên cứu của luận án, nêu đánh giá khả năng nhân rộng và tách chiết các hợp chất từ rong biển ở Việt Nam?

Triển vọng và khả năng nhân rộng công nghệ tách chiết các hợp chất từ đối tượng rong biển ở Việt Nam là rất khả quan. Nguyên nhân do:

Thứ nhất, Việt Nam có trữ lượng rong lớn, đặc biệt là Rong nâu (khoảng 35.000 tấn), có thể khai thác làm nguyên liệu cho sản xuất các sản phẩm cho công nghiệp, thực phẩm chức năng, dược phẩm...;

Thứ hai, việc ứng dụng các công nghệ tiên tiến, hiện đại sẽ giúp nâng cao hiệu quả chiết xuất, chế biến và tận dụng tối đa nguồn nguyên liệu rong để sản xuất các sản phẩm có giá trị theo mô hình kinh tế tuần hoàn, đem lại hiệu quả kinh tế cho khu vực ven biển, hải đảo.

Tuy nhiên, việc nhân rộng mô hình công nghệ ở quy mô bán công nghiệp và công nghiệp sẽ gặp một số khó khăn do chi phí đầu tư lớn (thiết bị hiện đại và đất) và đòi hỏi phải tiếp tục có quá trình nghiên cứu, hoàn thiện công nghệ, hạ giá thành sản phẩm để nâng cao khả năng cạnh tranh trên thị trường.

2. Nêu những giải pháp hay định hướng nhằm thúc đẩy mạnh mẽ việc khai thác và phát triển các sản phẩm từ rong biển?

Một số giải pháp và định hướng nhằm đẩy mạnh việc khai thác và phát triển các sản phẩm từ rong biển:

- Cần có sự đầu tư, nghiên cứu để phát triển các công nghệ chiết xuất, chế biến sản phẩm có nguồn gốc từ rong biển, ứng dụng các công nghệ tiên tiến, hiện đại để nâng cao chất lượng, hạ giá thành sản phẩm, hạn chế ô nhiễm môi trường.

- Cần nghiên cứu xây dựng các vùng nguyên liệu rong đảm bảo về chất lượng, sản lượng để cung cấp cho hoạt động sản xuất ở quy mô bán công nghiệp và công nghiệp.

- Nhiều quốc gia trên thế giới đã có những sản phẩm giá trị gia tăng từ rong biển (thực phẩm chức năng phòng ngừa ung thư với chiết xuất fucoidan từ rong biển, sản phẩm mỹ phẩm từ rong biển...). Do đó, ta cần đẩy mạnh hoạt động hợp tác nghiên cứu với các đối tác có tiềm lực về công nghệ, thiết bị và thương hiệu sản phẩm, qua đó rút ngắn quá trình nghiên cứu, chế biến các sản phẩm có nguồn gốc từ rong biển như thực phẩm chức năng, mỹ phẩm... để nâng cao giá trị của đối tượng rong biển.

7. Chủ tịch Hội đồng hỏi ý kiến nhận xét, góp ý của các thành viên khác trong Hội đồng.

❖ **GS.TS. Phạm Văn Thiêm – Chủ tịch Hội đồng:**

• **Câu hỏi:** Có nhiều phương pháp tối ưu hóa, như: Box Wilson, Box-Hamster, Box-Behnken... Tại sao tác giả sử dụng phương pháp Box-Behnken?

❖ **PGS.TS. Tạ Hồng Đức- Ủy viên Hội đồng:**

• **Nhận xét:**

- Đề tài luận án đáp ứng được yêu cầu về tính cấp thiết, thời sự, có giá trị cả về mặt khoa học và thực tiễn.

- Các kết quả nghiên cứu, các biện luận nhận xét, các kết luận không trùng hợp với các luận án được bảo vệ trong và ngoài nước.
- Tên của luận án phù hợp với nội dung và mục tiêu nghiên cứu, phù hợp với chuyên ngành Kỹ thuật hóa học và mã số chuyên ngành.
- Phương pháp nghiên cứu sử dụng trong luận án là hiện đại, phù hợp. Do đó kết quả thu được có giá trị về thực tiễn và có thể tin cậy.
- **Góp ý:**
 - Cần thống nhất các thuật ngữ danh pháp dùng trong toàn bộ Luận án.
 - Rà soát và sửa một số lỗi chính tả liên quan đến tên hóa chất tên vi sinh vật...

Đánh giá chung: Nội dung nghiên cứu được trình bày trong luận án đáp ứng được yêu cầu đối với luận án tiến sĩ chuyên ngành Kỹ thuật hóa học. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án. Đồng ý cho NCS Trần Duy Phong đưa luận án ra bảo vệ tại hội đồng chấm luận án cấp Học viện để nhận học vị Tiến sĩ.

❖ **PGS.TS. Lê Thị Huyền - Ủy viên Hội đồng**

- **Nhận xét:**
 - Luận án được thiết kế tốt, có nội dung nghiên cứu rõ ràng, phương pháp nghiên cứu hiện đại, có độ tin cậy cao. Luận án thu được nhiều kết quả có ý nghĩa những đóng góp này làm cơ sở khoa học tốt cho những nghiên cứu tiếp theo và có giá trị tham khảo. Đây là một công trình nghiên cứu rất hay và hoàn chỉnh, có khối lượng nghiên cứu tương đối lớn và thu được nhiều kết quả có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.
 - Tên đề tài, mục tiêu và nội dung của luận án phù hợp với chuyên ngành Kỹ thuật Hóa học;
 - Luận án được trình bày sạch đẹp, rõ ràng, bố cục hợp lý.
 - Tài liệu tham khảo phong phú cập nhật được trích dẫn đầy đủ chính xác.
- **Góp ý:**
 - Cần thống nhất danh pháp hóa học trong toàn luận án
 - Một số trích dẫn chưa đúng và thống nhất.
 - Luận án còn một số lỗi in ấn, trích dẫn tài liệu tham khảo.
- **Câu hỏi:**
 1. Công thức tính hiệu suất alginate qui mô 5kg/mẻ tính như thế nào?
 2. Sơ đồ 3.37 với nhiều phương án khảo sát để đánh giá và so sánh hiệu quả của các phương pháp xử lý, chế biến vậy phlorotannin, fucoxanthin có được chiết tách ra không? Và hàm lượng được xác định từ phân đoạn nào?

Đánh giá chung: Luận án đáp ứng được các yêu cầu của một luận án Tiến sĩ chuyên ngành Kỹ thuật Hóa học. Bản tóm tắt phản ánh trung thành nội dung luận án. Đồng ý cho NCS bảo vệ luận án trước Hội đồng chấm luận án cấp Học viện để nhận bằng Tiến sĩ.

❖ **TS. Trịnh Thị Thu Hương – Ủy viên Thư ký Hội đồng:**

• **Nhận xét:**

- Luận án có nội dung công việc nhiều, được thiết kế hoàn chỉnh theo mô hình kinh tế tuần hoàn, mang lại giá trị về kinh tế xã hội cũng như giá trị đối với việc bảo vệ môi trường; Đề tài luận án mang tính cần thiết, tính thời sự, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.
- Luận án này không trùng lặp so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước.
- Các tài liệu tham khảo được trích dẫn rõ ràng, đầy đủ và trung thực.
- Nội dung luận án phù hợp với đề tài nghiên cứu, chuyên ngành và mã số chuyên ngành đăng ký.
- Các phương pháp, thiết bị, kỹ thuật hiện đại, có độ tin cậy cao, phù hợp với nội dung nghiên cứu.

• **Góp ý:**

- Bổ sung Danh mục các chữ viết tắt;
- Bổ sung thêm thông tin IC50 của mẫu đối chứng trong bảng Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào (Bảng 3.17, trang 78);
- Bổ sung các thông số, số liệu trong qui trình chế biến toàn diện Rong mơ (hình 3.37, trang 115 Luận án; trang 18 – Tóm tắt Luận án);
- Tài liệu tham khảo cần trình bày theo đúng qui định;
- Sửa các lỗi in ấn, chế bản.

Đánh giá chung: Đánh giá cao kết quả của luận án. Luận án đáp ứng được đầy đủ yêu cầu về nội dung và hình thức đối với luận án tiến sĩ hoá học chuyên ngành Kỹ thuật Hóa học. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án. Đề nghị cho phép NCS. Trần Duy Phong được bảo vệ luận án trước Hội đồng chấm luận án cấp Học viện để nhận học vị Tiến sĩ Hóa học.

8. NCS. Trần Duy Phong – tác giả luận án trả lời các câu hỏi nêu ra

NCS xin tiếp thu ý kiến góp ý của các thầy cô ủy viên Hội đồng và trả lời câu hỏi của các thành viên Hội đồng:

- Trả lời câu hỏi Chủ tịch Hội đồng GS.TS. Phạm Văn Thiêm:

Nhóm nghiên cứu chọn phương pháp Box-Behnken để nghiên cứu tối ưu hóa quá trình chiết xuất phenolic từ Rong mơ, nguyên nhân do phương pháp Box-Behnken đem lại hiệu quả cao trong việc ước lượng các tham số của mô hình bề mặt phản ứng bậc hai,

đồng thời có tính linh hoạt và khả năng thích ứng cao với nhiều loại dữ liệu và điều kiện thực nghiệm khác nhau.

- Trả lời câu hỏi Ủy viên Hội đồng PGS.TS. Lê Thị Huyền:

1. Trong bảng 3.37 (trang 117) - Hiệu quả sản xuất thực ở qui mô 5kg nguyên liệu rong/mẻ cho kết quả hiệu suất của alginate đạt ~80%. Tuy nhiên, trong bảng 3.38 – Hiệu quả quá trình chiết xuất theo các phương án, thể hiện hiệu suất thu alginate từ 8.24-32.5%. Giải thích cách tính hiệu suất alginate trong bảng 3.37?

Cột số 3 là thông tin về khối lượng sản phẩm canxi alginate thu được. Với quy mô 5kg/mẻ thu được khối lượng sản phẩm bột alginate khoảng hơn 200g, trong số 200g này thì alginate chiếm khoảng hơn 80% và canxi khoảng 6%.

2. Sơ đồ 3.37 với nhiều phương án khảo sát để đánh giá và so sánh hiệu quả của các phương pháp xử lý, chế biến vậy phlorotannin, fucoxanthin có được chiết tách ra không? Và hàm lượng được xác định từ phân đoạn nào?

Trong quá trình thực nghiệm, nghiên cứu sinh có tiến hành tách phlorotanin và fucoxanthin từ cao chiết phenolic (Hòa cao chiết vào nước, sau đó chiết bằng n hexan. Bã chiết giàu fucoxanthin được xà phòng hóa và chiết lại fucoxanthin. Dịch chiết được bổ sung ethyl acetate để chiết phlorotanin). Tuy nhiên, kết quả cho thấy hàm lượng fucoxanthin từ cao chiết phenolic rất thấp nên nhóm nghiên cứu không tập trung vào việc tách phlorotanin và fucoxanthin mà chỉ dừng lại ở việc chiết phenolic. Nghiên cứu sinh sẽ sửa lại và làm rõ nội dung này trong bản chỉnh sửa luận văn.

9. GS.TS. Phạm Quốc Long – Hướng dẫn 1: Đại diện tập thể hướng dẫn phát biểu ý kiến bằng văn bản (*Văn bản kèm theo*)

Phần II: Hội đồng họp riêng để bầu ban kiểm phiếu, bỏ phiếu kín và thảo luận thông qua quyết nghị của Hội đồng

1. Hội đồng bầu Ban kiểm phiếu gồm:

- PGS.TS. Ngô Xuân Lương, Trưởng ban.
- PGS.TS. Tạ Hồng Đức, Ủy viên.
- TS. Trịnh Thị Thu Hương, Ủy viên.

2. Hội đồng đã thảo luận, bỏ phiếu kín đánh giá (*có biên bản kiểm phiếu kèm theo*).

Kết quả đánh giá:

- 7/7 phiếu đánh giá đều nhất trí đồng ý đánh giá tán thành cho NCS. Trần Duy Phong được nhận học vị Tiến sĩ Hóa học.
- 03/07 phiếu đánh giá luận án đạt mức xuất sắc

3. Thảo luận thông qua Quyết nghị của HĐ (*có bản Quyết nghị của HĐ kèm theo*).

Phần III:

1. **PGS.TS. Ngô Xuân Lương** - Trưởng ban kiểm phiếu công bố kết quả đánh giá luận án

- Số phiếu phát ra: 07 phiếu
- Số phiếu còn lại: 0 phiếu

• Kết quả bỏ phiếu đánh giá luận án:

- Số phiếu hợp lệ: 07 phiếu
- Số phiếu không hợp lệ: 0 phiếu
- Số phiếu tán thành: 07 phiếu
- Số phiếu không tán thành: 0 phiếu
- Số phiếu xếp loại xuất sắc: 03/07 phiếu

2. **GS.TS. Phạm Văn Thiêm** - Chủ tịch Hội đồng đọc quyết nghị của Hội đồng
(văn bản kèm theo)

3. Chủ tịch Hội đồng tuyên bố Hội đồng đã hoàn thành nhiệm vụ và trao lại quyền điều
khiển cho Cơ sở đào tạo

Buổi bảo vệ luận án Tiến sĩ cấp Học viện của NCS. Trần Duy Phong kết thúc vào hồi
12 giờ 05 phút ngày 23 tháng 03 năm 2024.

THƯ KÍ HỘI ĐỒNG

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG




TS. TRỊNH THỊ THU HƯƠNG



GS.TS. PHẠM VĂN THIÊM

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO
KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Thị Trung

PHÉ VIẾT

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA, BỔ SUNG
LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN**

Ngày 23 tháng 03 năm 2024, Học viện Khoa học và Công nghệ đã tổ chức đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện cho nghiên cứu sinh Trần Duy Phong theo Quyết định số 23/QĐ-HVKHCN ngày 18 tháng 01 năm 2024 của Giám đốc Học viện.

Đề tài: “Nghiên cứu sử dụng một số kỹ thuật tiên tiến và công nghệ tích hợp để chế biến toàn diện rong nâu thành các sản phẩm hữu ích”

Ngành: Kỹ thuật hóa học, Mã số: 9 52 03 01

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

PGS. TS. Trần Quốc Toàn

Theo Biên bản của Hội đồng, NCS phải bổ sung và chỉnh sửa luận án các điểm sau đây:

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, bổ sung	Nội dung đã được chỉnh sửa, bổ sung (Ghi rõ số trang/chương/mục... đã được chỉnh sửa)
1	Bổ sung danh mục ký hiệu chữ viết tắt	Đã bổ sung danh mục các ký hiệu chữ viết tắt (phía sau phần mục lục)
2	Phân đối tượng nghiên cứu cần bổ sung tên khoa học, thông tin phân loại học của các mẫu nghiên cứu	Đã bổ sung tên khoa học, thông tin phân loại học của các mẫu rong Nâu được nghiên cứu trong Luận án tại Mục 2.1.1 Mẫu rong Nâu, bảng 2.1. Mẫu rong nguyên liệu được sử dụng trong nghiên cứu (trang 35)
3	Bảng 3.2 về hàm lượng alginate trong nghiên cứu rong biển nên tổng hợp kết quả theo chỉ và khu vực nghiên cứu để cho thấy mức biến động của hàm lượng alginate	Đã thay Bảng 3.2 bằng Hình 3.1 (trang 50) để so sánh, làm rõ mức biến động của hàm lượng alginate theo các khu vực. Bảng 3.2 đã được chuyển sang phần phụ lục để đối chiếu về số liệu trong trường hợp cần thiết.
4	Bổ sung các thông tin đơn vị tính trong các biểu đồ từ 3.20 đến 3.23	Đã bổ sung thông tin về đơn vị tính trong các biểu đồ liên quan
5	Chỉnh sửa một số lỗi chính tả, in ấn (viết hoa tên riêng rong Nâu, rong Mơ; trình bày tài liệu tham khảo theo quy định...)	Đã rà soát, chỉnh sửa các lỗi về chính tả, in ấn và thống nhất cách trình bày tài liệu tham khảo trong luận văn.

Lưu ý: Các chữ ký xác nhận cần gắn với nội dung trên cùng một trang giấy. Học viện sẽ không xác nhận nếu phần chữ ký tách rời với nội dung

6	Bổ sung thêm thông tin IC50 của mẫu đối chứng trong bảng kết quả thử hoạt tính độc tế bào (Bảng 3.17, trang 78)	Đã bổ sung thông tin về kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào IC50 của chất đối chứng Paclitaxel (do có sự sắp xếp lại bố cục luận án, Bảng kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào hiện là Bảng 3.13, trang 75)
7	Bổ sung thêm các thông số, số liệu trong quy trình chế biến toàn diện rong Mơ (hình 3.37, trang 115 Luận án và trang 18 Tóm tắt luận án)	Đã bổ sung các thông số, số liệu trong quy trình chế biến toàn diện rong Mơ (trang 115 Luận án và trang 18 Tóm tắt luận án).

Nghiên cứu sinh chân thành cảm ơn Quý thầy, cô trong Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện đã góp ý và tạo cơ hội cho NCS hoàn thiện luận án của mình.

Xin trân trọng cảm ơn./.

Hà Nội, ngày 02 tháng 4 năm 2024

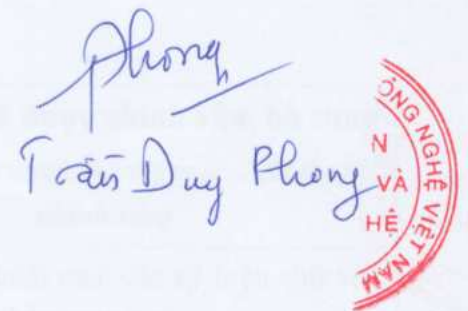
TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

(Trường hợp có 02 người hướng dẫn xin chữ ký cả 02 người, ký và ghi rõ họ tên)



GS. TS. Phạm Quốc Long PGS. TS. Trần Quốc Toàn

NGHIÊN CỨU SINH



**XÁC NHẬN CỦA HỌC VIỆN
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**



Nguyễn Thị Trung

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG



GS. TS. Phạm Văn Thiêm