

NGHIÊN CỨU THU NHẬN VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA CAO CHIẾT LIPID TỪ RONG MƠ SARGASSUM FELDMANNII BẰNG PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG SÓNG SIÊU ÂM

TRẦN THỊ NGỌC MAI - Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh

NGUYỄN THÁI NGỌC UYÊN - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP Hồ Chí Minh

NGUYỄN THỊ THU HƯƠNG - Trung tâm Sâm và Dược liệu, Viện Dược liệu

Rong mơ *Sargassum feldmannii* là loài rong phổ biến ở vùng biển Khánh Hòa và có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học. Do đó, việc lựa chọn các phương pháp thu nhận các hợp chất này từ rong mơ đang nhận được sự quan tâm của các nhà khoa học. Trong nghiên cứu này, các tác giả sử dụng phương pháp trích ly được hỗ trợ bằng sóng siêu âm để thu nhận cao chiết lipid và đánh giá khả năng kháng oxy hóa của cao chiết. Thiết bị phát sóng siêu âm được sử dụng có dạng thanh, tần số 20 kHz. Kết quả nghiên cứu thu được các thông số chiết như sau: kích thước mẫu là 0,25 mm; dung môi chiết là dichloromethane:methanol (1:1), tỉ lệ dung môi:nguyên liệu là 7:1, thời gian chiết 15 phút. Hàm lượng các acid béo chưa no trong rong mơ chiếm khoảng 33% và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của chúng trong khoảng 45-60%.

Từ khóa: *Sargassum feldmannii*, lipid rong nâu, kháng oxy hóa, trích ly bằng sóng siêu âm.

RESEARCH ON ACQUISITION AND EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ABILITY OF LIPID EXTRACTED FROM SARGASSUM (SARGASSUM FELDMANNII) BY USING ULTRASOUND WAVES

Summary

Sargassum (*Sargassum feldmannii*) is a common seaweed in the sea of Khanh Hoa and contains various bioactive compounds. Therefore, the methods for obtaining bioactive compounds in sargassum have attracted many attentions of scientists. In this study, the authors have used the extraction method assisted by ultrasound waves to obtain lipid extract and studied its antioxidant properties. Ultrasonic processor works at the frequency of 20 kHz. According to the results of the study, the parameters of the extraction are as follows: the sample size is 0.25 mm; extraction solvent is dichloromethane:methanol (1:1), the ratio of solvent and material is 7:1, extraction time is 15 minutes. The concentration of unsaturated fatty acid components has accounted for 33%; their DPPH free radical scavenging activity has been from 45 to 60%.

Keywords: *Sargassum feldmannii*, lipid-soluble compounds of brown seaweed, antioxidant properties of brown seaweed, extraction assisted by ultrasound waves.

Đặt vấn đề

Rong biển là nguồn tài nguyên phong phú, đa dạng về chủng loại. Theo thống kê, nước ta có khoảng 794 loài rong biển, phân bố ở vùng biển phía Bắc 310 loài, phía Nam 484 loài, 156 loài tìm thấy ở cả hai miền. Sản lượng của chúng tương đối lớn với mật độ cây trung bình $43,8 \pm 20,2$ cây/m² và sinh lượng trung bình đạt $456,1 \pm 64,2$ g khô/m² [1]. Hơn nữa, rong biển (đặc biệt là rong nâu) có chứa các thành phần có hoạt tính sinh học cao như: α -tocopherol, β -caroten, các polyphenol, các acid béo thiết yếu... Việc nghiên cứu chiết tách các hợp chất này đã và đang nhận được quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học cả trên thế giới và ở Việt Nam [2-5]. Trong số các phương pháp chiết tách, phương pháp sử dụng sóng siêu âm là phương pháp mới được ứng dụng trong kỹ thuật phân tách, chiết xuất

hiện nay, với ưu điểm cho hiệu suất thu nhận cao hơn so với phương pháp thông thường, thời gian trích ly ngắn, chất lượng của sản phẩm tốt, thân thiện với môi trường và nhiều tiềm năng ứng dụng ở quy mô công nghiệp [6, 7].

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Rong mơ *Sargassum feldmannii* được thu từ vùng biển Khánh Hòa vào khoảng tháng 4 đến tháng 8 hàng năm. Rong được ngâm, rửa sạch, phơi khô (có độ ẩm ban đầu là 16%) và xay nghiền nhỏ thành bột với 3 kích cỡ: 0,25; 0,5 và 0,63 mm. Bột rong này được sử dụng cho các nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp chiết sử dụng sóng siêu âm: siêu âm là sóng cơ học hình thành do sự lan truyền dao động của các phần tử trong không gian có tần số khoảng 20-100 kHz. Sóng siêu âm có độ dài sóng khoảng $10 \cdot 10^{-3}$ cm nên không đủ năng lượng để tương tác trực tiếp lên liên kết hoá học (không thể làm đứt liên kết hoá học). Tuy nhiên, sự phát sóng siêu âm trong môi trường lỏng lại sản sinh ra một năng lượng lớn, gây nên hiện tượng vật lý gọi là sự tạo và vỡ bọt (cavitation). Khi truyền sóng siêu âm qua môi trường lỏng, dưới tác dụng của sóng, các bọt khí bị kéo nén, sự tăng áp suất và nhiệt độ làm các bọt khí nổ vỡ, tạo nên hiện tượng "sốc sóng". Khi sự nổ vỡ của các bọt khí xảy ra ở gần bề mặt pha rắn sẽ gây ra sự mất đối xứng, sinh ra tia dung môi có tốc độ cao vào thành tế bào, do đó làm tăng sự xâm nhập của dung môi vào tế bào và làm tăng bề mặt tiếp xúc giữa pha rắn và pha lỏng. Điều này làm tăng sự truyền khối và phá vỡ cấu trúc tế bào. Sự nổ vỡ của các bọt khí làm tăng sự thoát ra của các chất nội bào vào dung dịch.



Hình 1: thiết bị phát sóng siêu âm dạng thanh

Thiết bị phát sóng siêu âm sử dụng trong nghiên cứu là thiết bị siêu âm dạng thanh. Mẫu được chuẩn bị trong các cốc, nhúng thanh phát sóng siêu âm vào dung dịch lỏng - rắn (dung môi - nguyên liệu). Các thí nghiệm khảo sát thực hiện ở cùng tần số 20 kHz.

Sau khi trích ly bằng sóng siêu âm, tách bã bằng máy ly tâm với tốc độ 3500 vòng/phút trong 10 phút, toàn bộ bã được sấy về độ ẩm ban đầu (phương pháp sấy đến khối lượng không đổi). Hỗn hợp dung môi và chất chiết

được đưa qua hệ thống cô quay chân không để cất loại dung môi, sản phẩm thu được ở dạng cao chiết khô kiệt. Mỗi thí nghiệm tiến hành chiết $10 \pm 0,05$ g nguyên liệu rong, được lặp lại 3 lần. Tỷ lệ thu hồi cao chiết được tính như sau:

$$\text{Tỷ lệ thu hồi (\%)} = \frac{M_T - M_S}{M_T} \times 100$$

Trong đó: M_T là khối lượng bột rong trước khi chiết (g) có độ ẩm 16%; M_S là khối lượng bột rong sau khi chiết (g) có cùng độ ẩm 16%.

- Phương pháp bắt gốc tự do DPPH - đánh giá khả năng kháng oxy hóa: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) là một gốc tự do bền, có màu tím và có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 517 nm. Khi có mặt chất chống oxy hóa, nó sẽ bị khử thành 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H), có màu vàng. Đo độ hấp thụ tại bước sóng 517 nm để xác định khả năng khử gốc DPPH của chất chống oxy hóa trong mẫu cần phân tích. Acid ascorbic được sử dụng làm chất đối chiếu. Phần trăm bắt gốc tự do DPPH (I) của mẫu cần phân tích được tính theo công thức:

$$I(\%) = \frac{OD_c - OD_T}{OD_c} \times 100$$

Trong đó: OD_c là mật độ quang của chứng (dung môi); OD_T là mật độ quang của mẫu thử hay đối chiếu.

- Xử lý số liệu: dùng phần mềm Statgraphics centurion.

Kết quả và bàn luận

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của kích thước mẫu đến hiệu quả thu hồi cao chiết lipid

Rong mơ với các kích thước 0,25; 0,5; 0,63 mm với hỗn hợp dung môi là n-hexane-ethanol 96% được trích ly với thiết bị phát sóng siêu âm dạng thanh tần số 20 kHz trong khoảng thời gian 15 phút. Kết quả thu được như trong bảng 1.

Bảng 1: hiệu quả thu hồi cao chiết lipid khảo sát theo kích thước mẫu

Kích thước mẫu (mm)	0,25	0,5	0,63
Tỷ lệ thu hồi (%)	$6,518 \pm 0,027^a$	$5,461 \pm 0,034^b$	$4,873 \pm 0,018^c$
I mẫu thử (%)	$52,996 \pm 1,719^d$	$47,159 \pm 1,499^e$	$46,132 \pm 0,092^e$
Tỷ lệ % (I mẫu thử / I đối chiếu)	57,128	50,836	49,729

a, b, c, d, e: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$

Đối với kích thước vật liệu, quá trình trích ly xảy ra chủ yếu do thẩm thấu và khuếch tán nên kích thước vật liệu càng nhỏ, diện tích tiếp xúc càng lớn và hiệu quả trích ly càng cao.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, tỷ lệ thu hồi trung bình giữa các loại kích thước nguyên liệu khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$. Tỷ lệ thu hồi trung bình ứng với kích thước nguyên liệu là 0,25 mm cho kết quả cao nhất ($6,518 \pm 0,027\%$). Khả năng bắt gốc tự do DPPH ở mẫu có kích thước 0,5 mm và 0,63 mm không có khác biệt ở mức 95%, ở mẫu có kích thước 0,25 mm cao nhất ($52,996 \pm 1,719\%$), bằng 57,128% so với chất đối chiếu acid ascorbic ở cùng nồng độ. Kết luận, nguyên liệu có kích thước 0,25 mm được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của dung môi đến hiệu quả thu hồi cao chiết lipid

Rong mơ có kích thước 0,25 mm được chiết với 3 hỗn hợp dung môi, trích ly với thiết bị phát sóng siêu âm dạng thanh tần số 20 kHz trong thời gian 15 phút. Kết quả được thống kê trong bảng 2.

Bảng 2: hiệu quả thu hồi cao chiết lipid khi sử dụng các loại dung môi kết hợp khác nhau

Dung môi	n-Hexane: Ethanol (1:1)	Dichloromethane: n-Hexane (1:1)	Dichloromethane: Methanol (1:1)
Tỷ lệ thu hồi (%)	$6,518 \pm 0,027^a$	$6,316 \pm 0,015^b$	$7,095 \pm 0,032^c$
I mẫu thử (%)	$53,624 \pm 1,122^{d,e}$	$51,613 \pm 1,674^d$	$57,184 \pm 0,253^c$
Tỷ lệ % (I mẫu thử / I đối chiếu)	57,805	55,638	61,642

a, b, c, d, e: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$

Trích ly đạt hiệu suất cao khi dùng đúng dung môi với chất cần trích ly. Dựa vào tính phân cực, ta có thể dự đoán sự có mặt của các chất trong dịch trích: đối với dung môi không phân cực có thể chiết được các hydrocarbon béo hoặc thơm, các thành phần của tinh dầu như monoterpen, các chất không phân cực như chất béo, carotenoid, các sterol...; dung môi phân cực vừa và yếu sẽ chiết được các sesquiterpen, diterpen, coumarin, quinon, các aglycon... Việc chọn dung môi kết hợp (n-Hexane:Ethanol, Dichloromethane:n-Hexane và Dichloromethane:Methanol), mỗi cặp là sự kết hợp hai loại dung môi có mức độ phân cực khác nhau và khi trộn lẫn có thể tạo thành hỗn hợp dung dịch đồng nhất, nhằm tăng khả năng chiết kiệt những thành phần lipid không phân cực và ít phân cực có trong nguyên liệu. Theo bảng 2, tỷ lệ thu hồi cao chiết lớn nhất khi sử dụng dung môi là hỗn hợp dichloromethane - methanol (1:1) với $7,095 \pm 0,032\%$; khả năng bắt gốc tự do DPPH là $57,184 \pm 0,253\%$, tương ứng 61,642% so với chất đối chiếu acid ascorbic.

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu: dung môi đến hiệu quả thu hồi cao chiết lipid

Rong mơ có kích thước 0,25mm được trích ly bằng hỗn hợp dung môi dichloromethane - methanol (1:1), trích ly với

thiết bị phát sóng siêu âm dạng thanh tần số 20 kHz trong thời gian 15 phút. Kết quả thu được như trong bảng 3.

Bảng 3: hiệu quả thu hồi cao chiết lipid khảo sát theo tỷ lệ nguyên liệu: dung môi

Tỷ lệ nguyên liệu: dung môi	1:5	1:6	1:7	1:8
Tỷ lệ thu hồi (%)	$5,635 \pm 0,025^a$	$6,518 \pm 0,027^b$	$6,520 \pm 0,019^b$	$6,525 \pm 0,025^b$
I mẫu thử (%)	$56,418 \pm 0,487^c$	$57,184 \pm 0,253^c$	$59,385 \pm 0,636^d$	$56,049 \pm 0,602^c$
Tỷ lệ % (I mẫu thử / I đối chiếu)	60,817	61,642	64,016	60,419

a, b, c, d: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$

Sự chênh lệch giữa tỷ lệ dung môi:nguyên liệu càng lớn thì động lực quá trình khuếch tán càng lớn, do đó các thành phần trong nguyên liệu có xu hướng đi vào dung môi nhiều hơn. Tuy nhiên, không phải giảm tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là độ khuếch tán liên tục tăng mà tăng chậm dần và hầu như không tăng nữa ở một tỷ lệ nhất định. Bảng 3 cho thấy, tỷ lệ thu hồi tăng dần trong khoảng tỷ lệ dung môi:nguyên liệu từ 1:5 ($5,635 \pm 0,025\%$) đến 1:8 ($6,525 \pm 0,025\%$), tại tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là 1:8, tỷ lệ thu hồi là cao nhất. Tỷ lệ thu hồi có xu hướng tăng khi tăng tỷ lệ nguyên liệu: dung môi nhưng tốc độ tăng nhanh chỉ trong khoảng tỷ lệ 1:5 đến 1:6, từ 1:6 trở đi, tốc độ tăng tỷ lệ thu hồi gần như không tăng. Tỷ lệ thu hồi trung bình giữa các tỷ lệ 1:6, 1:7 và 1:8 không khác biệt ở mức ý nghĩa 95%. Khả năng bắt gốc tự do DPPH cao nhất ở tỷ lệ 1:7 ($59,385 \pm 0,636\%$), bằng 64,016% so với chất đối chiếu acid ascorbic, cao hơn so với tỷ lệ 1:6 (61,642%). Để thu được cao chiết có hoạt tính bắt gốc tự do cao, tỷ lệ 1:7 được chọn cho quá trình trích ly.

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian xử lý sóng siêu âm lên hiệu quả thu hồi cao chiết lipid

Rong mơ có kích thước 0,25 mm với hỗn hợp dung môi là dichloromethane - methanol (1:1), tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là 1:7. Trích ly với thiết bị phát sóng siêu âm dạng thanh tần số 20 kHz trong 5 khoảng thời gian là: 10, 15, 20, 25 và 30 phút. Kết quả thu được như trong bảng 4.

Bảng 4: hiệu quả thu hồi cao chiết lipid khảo sát theo thời gian xử lý sóng siêu âm

Thời gian (phút)	10	15	20	25	30
Tỷ lệ thu hồi (%)	$6,362 \pm 0,014^a$	$6,518 \pm 0,027^b$	$6,525 \pm 0,008^b$	$6,539 \pm 0,009^b$	$6,543 \pm 0,005^b$
I mẫu thử (%)	$55,338 \pm 0,3198^c$	$58,478 \pm 0,258^d$	$53,959 \pm 0,597^c$	$54,828 \pm 0,634^c$	$53,058 \pm 1,386^c$
Tỷ lệ % (I mẫu thử / I đối chiếu)	59,653	63,037	58,166	59,102	57,195

a, b, c, d: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$

Thời gian trích ly khi sử dụng sóng siêu âm thường ngắn hơn so với phương pháp truyền thống. Thông thường, thời gian trích ly càng dài thì hàm lượng chất trích ly càng tăng. Kết quả ở bảng 4 cho thấy, tỷ lệ thu hồi cao chiết tăng theo thời gian. Tỷ lệ thu hồi trung bình của các khoảng thời gian là 10, 20, 25 và 30 phút không có khác biệt ở mức ý nghĩa 95%. Mặt khác, theo thời gian xử lý cho thấy, thời gian càng dài thì khả năng bắt gốc tự do DPPH càng giảm, trong khi tỷ lệ thu hồi lại không tăng, ở thời gian trích ly 15 phút khả năng bắt gốc tự do DPPH cao nhất bằng 63,037% so với chất đối chiếu acid ascorbic. Do đó, ở thời gian xử lý sóng siêu âm 15 phút cho hiệu quả trích ly cao nhất.

So với phương pháp ngâm chiết truyền thống (không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm), phương pháp chiết được hỗ trợ bằng sóng siêu âm có tỷ lệ thu hồi cao và thời gian chiết ngắn hơn. Ở cùng điều kiện ngâm chiết (kích thước mẫu 0,25 mm; dung môi dichloromethane - methanol 1:1, tỷ lệ dung môi:nguyên liệu là 7:1), trong cùng thời gian chiết là 15 phút thì tỷ lệ thu hồi cao chiết rất thấp ($1,095 \pm 0,039\%$); khi tăng thời gian chiết đến 7 giờ thì tỷ lệ thu hồi cao chiết tăng $5,653 \pm 0,023\%$ nhưng vẫn thấp hơn so với tỷ lệ thu hồi cao chiết của phương pháp chiết có hỗ trợ bằng sóng siêu âm ($6,518 \pm 0,027\%$). Kết quả trên đã chứng minh tính ưu việt của phương pháp ngâm chiết có hỗ trợ sóng siêu âm để rút ngắn thời gian chiết, tăng tỷ lệ thu hồi, góp phần giảm chi phí và thời gian trong quá trình chiết.

Kết quả phân tích thành phần acid béo có trong cao chiết lipid

Bảng 5: kết quả phân tích các thành phần acid béo có trong cao chiết lipid (phương pháp phân tích: Ref. AOAC 996.06:2011 GC/MS)

STT	Thành phần các acid béo	Hàm lượng trong cao chiết lipid (%)
1	Myristic acid	3,67
2	Palmitoleic acid	4,73
3	Palmitic acid	21,22
4	Linoleic acid	9,57
5	Oleic acid	11,58
6	Stearic acid	2,67
7	Arachidonic acid	9,1
8	Erucic acid	1,35
9	Behenic acid	1,6
10	Lignoceric acid	0,246
11	Pentadecanoic acid	<0,1
12	Heptadecanoic acid	<0,1
13	11-eicosenoic acid	<0,1
14	Arachidic acid	<0,1

Cao chiết rong mơ *Sargassum feldmannii* với kích thước mẫu 0,25 mm, dung môi sử dụng là dichloromethane - methanol (1:1), tỷ lệ dung môi:nguyên liệu là 7:1, thời gian chiết với sóng siêu âm tần số 20 kHz là 15 phút, sau đó tiến hành phân tích thành phần acid béo bằng phương pháp sắc ký GC-MS. Kết quả được thống kê trong bảng 5.

Dựa vào bảng kết quả phân tích sắc ký khí cho thấy, hàm lượng các acid béo không no chiếm khoảng 33%, bao gồm các loại linoleic acid (ω -3) chiếm 9,57%, oleic acid (ω -9) chiếm 11,58% và arachidonic acid (ω -6) chiếm 9,1%.

Kết luận

Các kết quả khảo sát thu được các thông số tối ưu cho quá trình chiết lipid từ rong mơ *Sargassum feldmannii* như sau: kích thước mẫu 0,25 mm; dung môi dichloromethane - methanol (1:1), tỷ lệ dung môi:nguyên liệu là 7:1, thời gian chiết là 15 phút. Tỷ lệ thành phần acid béo không no trong cao chiết lipid chiếm khoảng 33% và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của chúng khoảng 45-60%.

Tài liệu tham khảo

- [1] Hộ P.H., Rong biển Việt Nam. 1969, Trung tâm học liệu, Bộ Giáo dục.
- [2] O'Sullivan A.M. et al., In vitro and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. Food Chemistry, 2011. 126(3): p. 1064-1070.
- [3] Meenakshi S. et al., In vitro antioxidant properties and FTIR analysis of two seaweeds of Gulf of Mannar. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2011. 1(1): p. S66-S70.
- [4] Kumar K.S., K. Ganesan, and P.V.S. Rao, Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - An edible seaweed. Food Chemistry, 2008. 107(1): p. 289-295.
- [5] Devi G.K. et al., In vitro antioxidant activities of selected seaweeds from Southeast coast of India. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2011. 4(3): p. 205-211.
- [6] Li H., L. Pordesimo and J. Weiss, High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. Food Research International, 2004. 37(7): p. 731-738.
- [7] Awad T.S. et al., Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. Food Research International, 2012. 48(2): p. 410-427.