



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002606

(51) **A61K 36/00; A61K 36/03; A23L 33/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00014

(22) 05/11/2019

(67) 1-2019-06190

(45) 25/04/2021 397

(43) 30/01/2020 382A

(73) Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

Nhà 1H, số 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Trần Quốc Toàn (VN); Phạm Quốc Long (VN); Hoàng Thị Bích (VN); Trần Duy Phong (VN); Phạm Minh Quân (VN).

(54) QUY TRÌNH CHẾ BIẾN RONG MƠ (*SARGASSUM*. SP) ĐỂ THU CÁC SẢN PHẨM FUCOXANTHIN, PHLOROTANIN, FUCOIDAN VÀ ALGINAT THEO PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG SÓNG SIÊU ÂM CƯỜNG ĐỘ CAO KẾT HỢP ENZYM

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình chế biến rong Mơ (*Sargassum sp.*) để thu các sản phẩm fucoxanthin, phlorotanin, fucoidan và alginat theo phương pháp sử dụng sóng siêu âm cường độ cao kết hợp enzym, trong đó quy trình này bao các bước: sơ chế nguyên liệu, siêu âm phá vỡ tế bào nguyên liệu bằng cách sử dụng siêu âm cường độ cao để phá vỡ cấu trúc tế bào rong Mơ, thủy phân xenlulozo trong rong bằng cách sử dụng enzym xenluloza kết hợp sóng siêu âm ở cường độ thấp để thủy phân thành các oligosacarit hòa tan, chiết thu hồi fucoxanthin, chiết thu hồi phlorotanin bằng cách sử dụng kỹ thuật chiết với các dung môi hữu cơ có độ phân cực khác nhau kết hợp ly tâm, chiết xuất fucoidan bằng cách bổ sung nước khử ion vào pha rắn, siêu âm với cường độ mạnh để thu nhận fucoidan; và chiết xuất alginat bằng dung dịch kiềm, sử dụng kỹ thuật điện hóa để tẩy màu, thu được alginat sạch. Các phần chất thải còn lại được điều chỉnh độ pH trung tính, bổ sung vi sinh vật để ủ lên men tạo thành phân bón hữu cơ đa vi lượng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này đề cập đến quy trình chế biến rong Mơ (*Sargassum* sp.) để thu các sản phẩm có giá trị, như fucoxanthin, phlorotanin, fucoidan và alginat, theo phương pháp tích hợp enzym – siêu âm và các kỹ thuật khác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Họ rong Mơ (Sargassaceae) có hai chi là *Sargassum* và *Turbinaria* chiếm đại đa số về trữ lượng và thành phần loài trong ngành rong Nâu (Phaeophyta), trong đó chi *Sargassum* có số lượng phong phú nhất. Chúng sống trôi nổi trong nước, thân có dạng trụ gần tròn, màu từ xanh ô liu đến nâu, có khi mọc dài đến một vài mét bao gồm một chân bám, một bộ cuống dài phân nhánh và bộ lá mang theo các túi sinh dục (noãn, phấn). Một số loài mọc ra nhiều túi khí hình cầu giúp cây đứng thẳng nhờ đó bộ lá dễ dàng quang hợp. Một số loài khác có thân khá nhám để bầu vào nhau nhằm giữ cho cây khỏi bị cuốn trôi nơi dòng nước chảy mạnh. Trong điều kiện tự nhiên các loài rong Mơ phát triển dưới mực thủy triều, chân bám vào các nền đá gần bờ, vào các rạn san hô hay các bãi đá cuội. Nhưng khi bị sóng cuốn lên mặt nước chúng vẫn tiếp tục sống, sinh sản vô tính, và rồi trôi dạt vào bờ. Ở Việt Nam, số loài rong Mơ nơi vùng biển phía Bắc nhiều hơn, bao gồm các loài quen thuộc như rong mơ sừng dài *Sargassum siliquarum*, rong mơ mảnh *S. grucillium*, rong mơ tro *S. glaucescens*, rong mơ thối gai *S. cinereum*, rong mơ chổi *S. virgatum* và rong mơ lá dài *S. augustifolium*.

Một số thành phần hóa học có hoạt tính của rong mơ:

Fucoxanthin: là một carotenoids xanthophyll có cấu trúc allen được tìm thấy lần đầu ở rong nâu. Công thức phân tử fucoxanthin là $C_{42}H_{58}O_6$, cấu trúc phân tử fucoxanthin ngoài chuỗi mạch carotenoid còn có cấu trúc allen, epoxit và hydroxyl. Ở trạng thái bình thường, fucoxanthin kết tinh dạng tinh thể màu nâu, tan tốt trong

các dung môi phân cực trung bình. Trong tự nhiên, ngoài dạng chính, fucoxanthin còn có các dạng chuyển hóa fucoxanthinol, amarouciaxanthin A và halocynthiaxanthin.

Hoạt tính sinh học: Các nghiên cứu cho thấy fucoxanthin và các dạng chuyển hóa của nó thể hiện các hoạt tính sinh học rất phong phú và quý báu đối với sức khỏe con người. Các hoạt tính bao gồm:

- Hoạt tính chống oxi hóa: fucoxanthin thể hiện hoạt tính chống oxi hóa cao hơn vitamin E.
- Hoạt tính chống lại các rối loạn trao đổi chất: fucoxanthin giúp phòng ngừa và hỗ trợ điều trị tình trạng thừa cân, béo phì và bệnh đái tháo đường.
- Fucoxanthin các tác dụng chăm sóc da và làm trắng da thể hiện qua các hoạt tính ức chế hoạt động của các enzym gây bất lợi cho da: collagenaza, hyaluronidaza, elastaza và tyrosinaza.
- Fucoxanthin thể hiện tốt hoạt tính chống viêm và kháng ung thư.
- Fucoxanthin thể hiện tác dụng tốt cho não thông qua tác dụng bảo vệ mạch máu não cũng như chống lại quá trình thoái hóa thần kinh (bệnh Alzheimer)
- Fucoxanthin có độ an toàn sinh học cao thông qua quá trình thử nghiệm trên động vật (*in vivo*) với liều 2000mg/kg thể trọng trong 13 tuần liên tiếp ở chuột mà không thấy xuất hiện các tác dụng phụ.

Chế phẩm fucoxanthin hiện nay được sản xuất và bán trên thị trường dưới dạng chế phẩm nguyên liệu cho chế biến thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm. Hiện nay, quy trình công nghệ sản xuất fucoxanthin chủ yếu là sử dụng các dung môi hữu cơ để chiết xuất từ rong biển. Các dung môi thường được sử dụng như diethylene glycol, acetone, ethanol, methanol, v.v.. Tuy nhiên, quá trình xử lý nguyên liệu có vai trò quyết định đến hiệu suất thu hồi fucoxanthin. Một số kỹ thuật thường được dùng để xử lý như ngâm, Soxhlet, chiết áp suất cao, chiết với hỗ trợ siêu âm hoặc sử dụng enzym để xử lý nguyên liệu trước khi chiết.

Phlorotannin: Trong rong nâu các hợp chất phenolic được quy cho như phlorotannin, bởi vì hầu hết chúng là polyme của phloroglucinol (1,3,5-

trihydroxybenzen). Phlorotannin là một trong những hợp chất chuyển hóa thứ cấp phổ biến nhất trong 4 nhóm hợp chất chuyển hóa thứ cấp như alkaloit, phlorotannin, acetogenin, và terpen được tìm thấy trong rong biển. Chúng khác với 3 nhóm chất còn lại là ở chỗ chỉ được tìm thấy trong rong Nâu và có hàm lượng lớn nhất, biến đổi từ 20-250mg/g rong khô tùy theo vị trí địa lý và điều kiện môi trường mà cây rong sinh sống.

Hoạt tính sinh học của hợp chất phenolic của rong Nâu thể hiện các hoạt tính chủ yếu như chống oxy hóa, chống dị ứng, chống đái tháo đường, chống vi rút, chống khối u và kháng khuẩn. Trong đó, hoạt tính sinh học của hợp chất phenolic được công bố nhiều nhất là hoạt tính chống oxy hóa. Hoạt tính này được nghiên cứu thông qua khảo sát khả năng quét các gốc DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), gốc hydroxyl ($\cdot\text{OH}$), các anion như superoxide anion (O_2^-), khử sắt (III), tạo phức chelat với các ion hóa trị (II) và oxy hóa lipid.

Quy trình tách chiết phlorotannin thông thường có 03 bước chính sau: xử lý nguyên liệu; chiết xuất phlorotannin thô; tinh chế phlorotannin.

Xử lý rong Nâu thường có 02 cách. Cách thứ nhất là rong tươi vừa thu thập về rửa sạch bằng nước biển, bảo quản lạnh -20°C sau đó loại chất béo rồi mới đem chiết, cách này chỉ áp dụng với quy trình chiết với nguyên liệu rong nhiều nhất là 300g nguyên liệu. Cách thứ hai là rong Nâu rửa sạch sạn cát bằng nước biển rồi đem phơi khô trong bóng mát tại nhiệt độ 38°C sau đó loại chất béo rồi mới đem chiết.

Giai đoạn quan trọng nhất là quá trình chiết xuất phlorotannin. Do bản chất của nguyên liệu và thành phần hóa học và các dạng phlorotannin trong nguyên liệu mẫu khác nhau nên không có công bố nào đưa ra quy trình chuẩn để có thể tách chiết được hoàn toàn phlorotannin. Việc chọn dung môi chiết phụ thuộc vào loại nguyên liệu, thành phần carbohydrate và hàm lượng các chất chuyển hóa thứ cấp có trong nguyên liệu. Với các loài rong Nâu mà thành phần của chúng không có hoặc có rất ít carbohydrate tan trong nước như laminaran, fucoidan và polyuromanin thì dung môi dùng để chiết là nước và nhiệt độ chiết là 80°C . Ngược lại với rong Nâu có hàm lượng carbohydrate tan trong nước cao thì dung môi dùng để chiết là

metanol, etanol, axeton và hydrocarbon được clo hóa hoặc là hỗn hợp các dung môi với nhau (metanol và clometan; metanol và cloroform) và chiết ở nhiệt độ phòng. Thời gian chiết có thể kéo dài từ 20 giờ đến 10 ngày tùy theo khối lượng nguyên liệu rong và nhiệt độ chiết.

Hợp chất phenolic là những chất chống oxy hóa nên được quan tâm và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như mỹ phẩm, thực phẩm và dược phẩm.

Trong ngành thực phẩm, do đặc điểm xuất phát từ thiên nhiên, đảm bảo tính an toàn nên chúng được sử dụng chủ yếu như một chất phụ gia chống oxy hóa, nhằm thay thế cho các phụ gia tổng hợp thường dùng như: BHA (butyl hydroxy anisol), BHT (butyl hydroxyl toluen), v.v., những chất này dễ gây tác dụng phụ không có lợi cho sức khỏe người sử dụng. Hợp chất phenolic chủ yếu được ứng dụng để làm bền chất béo trong các sản phẩm bánh, kẹo. Hợp chất phenolic chiết từ rong biển được sử dụng như chất chống oxy hóa tự nhiên mới trong việc nâng cao chất lượng hải sản.

Nghiên cứu lâm sàng về sản phẩm chứa phlorotanin chiết xuất từ rong biển cho thấy nó an toàn trong điều trị các bệnh: tiểu đường, rối loạn giấc ngủ, an thần, mạch máu, viêm khớp xương mãn tính, thậm chí ung thư.

Fucoidan: Fucoidan là một polysacarit được sulfat hóa phân lập từ rong Nâu lần đầu tiên bởi Kylin vào năm 1913. Theo danh pháp carbohydrat, vì các polysacarit được tạo nên bởi fucozơ và sulfat được đặt tên là sulfat fucan. Polysacarit được sulfat hóa có nguồn gốc từ rong Nâu và động vật trên thực tế chỉ có mặt trong ngành Da gai (Echinoderms), cụ thể là cầu gai và hải sâm. Nhưng ngược lại, cấu trúc của các polysacarit được sulfat hóa từ rong Nâu phức tạp hơn nhiều trong thành phần. Ngoài fucozơ và sulfat, chúng còn có thể chứa thêm các monosacarit khác như: galactozơ, xylozơ, manozơ, axit glucuronic, v.v., đồng thời có thể bị axetyl hóa một phần. Cấu trúc hóa học chi tiết của các polyme sinh học phức tạp này trong nhiều trường hợp còn chưa được biết đến. Chính vì vậy, tên gọi thông thường “fucoidan” là thích hợp nhất nhằm dùng cho tất cả các polysacarit được sulfat hóa từ rong Nâu, độc lập với thành phần của chúng, nhưng hiển nhiên nó không được sử dụng cho fucan được sulfat hóa có nguồn gốc động vật.

Polysacarit được sulfat hóa (Fucoidan) là hợp chất được đặc biệt quan tâm nghiên cứu nhờ các hoạt tính sinh học đa dạng và đặc thù của chúng như: chống đông tụ máu, chống huyết khối, kháng virus, kháng dính, kháng tạo mạch (antiangiogenic), kháng viêm, kháng u, kháng bổ thể (anticomplementary), điều biến hệ miễn dịch, ngừa thai. Vì vậy, mà fucoidan trở thành một nguồn tiềm năng cho các ứng dụng làm thực phẩm chức năng, thực phẩm bổ dưỡng, dược liệu, v.v..

Alginat: Axit alginic là một loại polysacarit đặc biệt có nhiều trong các loài rong Nâu. Trong rong Nâu thường tồn tại các dạng muối của axit alginic với một số ion kim loại như Ca, Fe, Mg gọi là alginat. Chúng tham gia vào cấu trúc của thành và màng tế bào (Baraskov, 1963). Alginat là một polysacarit có tính axit, loại axit này rất khó hoà tan. Alginic phản ứng kiềm hóa tạo muối sẽ làm thay đổi tính hòa tan, có độ nhớt cao và có nhiều công dụng hơn.

Hàm lượng alginic trong rong phụ thuộc vào từng loài, với chi *Sarrgassum*, hàm lượng alginic giao động trong khoảng 25-43%, loài *Sarrgassum mcclurei* với hàm lượng lên đến 40% khối lượng chất khô.

Alginic nằm trong hệ thống gian bào ở dạng gel chứa các ion natri, canxi, magie, stronti và bari. Chức năng chính của chúng được cho là bộ khung, tạo nên cả độ bền vững lẫn độ mềm dẻo của mô rong. Vật liệu polyme ngoại bào tương tự alginat trong rong nâu cũng được sản xuất nhờ các vi khuẩn đất như *Azotobacter vinelandii* (Gorin; Spencer, 1966), *A. crococcum* (Sutherland, 1977) và vài loài của *Pseudomonas* (Linker và Jones, 1966). Tuy nhiên, toàn bộ alginat thương phẩm hiện nay vẫn được tách chiết từ rong biển.

Tình hình nghiên cứu và sản xuất Alginat từ rong biển trên thế giới:

Nhà hóa học người Anh E.C.C Standford là người đầu tiên mô tả alginat (tách axit alginic từ rong nâu) trong bằng sáng chế ngày 12/01/1881 (Stanford, 1881). Những nghiên cứu của ông sau đó được đưa ra thảo luận trong các bài báo năm 1883 (Standford, 1883a,b). Theo đó Standford cho rằng phân tử axit alginic chứa nitơ và đã đóng góp nhiều trong việc làm sáng tỏ cấu trúc hóa học của nó.

Năm 1926, một số nhóm nghiên cứu độc lập (Atsuki và Tomoda, 1926; Schmidt và Vocke, 1926) đã khám phá ra rằng axit uronic là một hợp phần của axit alginic. Trạng thái tồn tại của các axit uronic được nghiên cứu sau đó không lâu bởi 3 nhóm nghiên cứu khác nhau cho rằng axit uronic trong phân tử axit alginic là axit D-mannuronic và bản chất của liên kết giữa các gốc mannuronic được xác định là β -1,4 tương tự như trong phân tử xenlulozơ. Năm 1955, các công trình nghiên cứu của Fischer và Dorfel đã phá vỡ quan niệm đơn giản trên. Khi nghiên cứu sắc ký giấy của các axit uronic và các polyuronic, hai ông đã nhận thấy sự có mặt của một axit uronic khác trong dịch thủy phân của axit alginic, không phải là axit mannuronic. Axit uronic mới này được xác định là axit L-guluronic có hàm lượng đáng kể trong dịch thủy phân và một phương pháp định lượng axit mannuronic và guluronic đã được đưa ra. Alginat, vì thế, phải được xem là một copolyme tạo bởi các gốc β -D-mannuronic và α -L-guluronic. Các kết quả nghiên cứu sau đó được thực hiện chủ yếu bởi Haug và đồng sự, đã cho thấy thành phần axit uronic của Alginat phụ thuộc nguồn nguyên liệu dùng để tách. Baraknow và cộng sự (1963) đã nghiên cứu tác dụng của Iot trong rong Mơ được dùng để chữa bệnh biểu cổ, một số saccharit trong rong biển mang tính đặc trưng của các loài như agar, carrageenan từ tảo đỏ, axit alginic, manitol trong rong Nâu.

Năm 1927, Thornley lập công ty sản xuất alginat tại San Diego, Mỹ; năm 1929, alginat được sản xuất bởi công ty Kelco; tại Vương quốc Anh, alginat được sản xuất bởi Công ty TNHH Công nghiệp Alginat trong khoảng thời gian 1934-1939. Gần đây, hai công ty lớn nhất là Kelco và TNHH Công nghiệp Alginat được mua lại bởi Merk&Co Ind Mỹ. Họ sản xuất khoảng 70% sản lượng alginat trên thế giới. Tiếp theo đó phải kể đến Protan A/S của Nauy, theo sau là Nhật và Pháp. Ở Trung Quốc, alginat sản xuất trong những năm 1957 đã được khởi xưởng ở Thanh Đảo từ rong *Sargassum pallidum*.

Hàng năm, sản xuất alginat của nhiều quốc gia khoảng 20.000 tấn/năm; hiện nay khoảng 30.000 tấn, trong đó có 6000 tấn tại Trung Quốc.

Khả năng đào thải kim loại nặng của các hợp chất alginat:

Do sự phát triển của các ngành công nghiệp nặng cũng như ngành năng lượng nguyên tử làm gia tăng nguy cơ nhiễm phóng xạ và nhiễm độc kim loại nặng ở người, một tính chất của alginat được chú ý đặc biệt là khả năng tóm bắt các nguyên tố kim loại nặng như chì, thủy ngân, Cadimi và các Nuclit phóng xạ. Bắt đầu từ 1957, đã có nhiều công trình nghiên cứu trên động vật thí nghiệm và quan trắc trên các tình nguyện viên đã chứng minh rằng, alginat natri và canxi ức chế sự hút vào Strontium (Sr) phóng xạ trong đường ruột – dạ dày một cách tính cực hơn so với nhựa trao đổi ion và các chất tạo chelate-chelat. Ngay cả dùng một lần, alginat natri được làm giàu bởi các phần dư của axit L-guluronic, cũng làm giảm sự giữ lại trong cơ thể người nguyên tố Sr ít nhất là 4 lần. (Sutton 1971). Khi đó hiệu ứng của alginat tăng lên với sự tăng của tỷ số guluronid/mannuronid, trong đó ghi nhận không có ảnh hưởng đáng kể đến sự hút vào các ion canxi (Patrick 1967) hơn nữa alginat được làm giàu ảnh hưởng lên sự chuyển hóa Sr lưu trú trong xương, tăng cường việc loại ra khỏi cơ thể cùng với phân Sr “bên trong” (endon) (Waldron – Edward 1965). Các tác giả đã đưa ra đề nghị rằng, giữa hàm lượng Sr-85 trong máu và trong xương tồn tại một sự cân bằng. Hiệu ứng được phát hiện trên của alginat là do sự tóm-hút các nuclit phóng xạ trong ruột khi các nuclit này bị loại ra khỏi máu. Sự giảm Sr trong màng nhày ruột gây ra sự bổ sung nó từ máu và tương ứng và từ xương. Việc huy động Sr-90 từ các khu trú trong xương ở động vật, mà trước đó đã đưa vào Sr phóng xạ, và sau đó cho dùng alginat với liều 5% khẩu phần chuẩn, kéo theo sự tăng mức nuclit phóng xạ trong phân lên 2 lần, trong máu 5 lần, trong gan 4 lần, trong huyết thanh 6 lần, và trong thận 5 lần so với các động vật đối chứng không dùng alginat natri (Van der Borgh 1978). Alginat natri cũng gia tăng hiệu quả việc loại bỏ Ra-222 (Schoeters 1983).

Cần nhấn mạnh rằng, alginat natri có khả năng ức chế (kìm hãm) sự hấp thụ Sr phóng xạ trong ruột các động vật thí nghiệm cao hơn đáng kể các muối canxi, phosphat, krakhmal, pectin, các dẫn xuất của axit pectic, các chế phẩm xenlulo, các nhựa trao đổi ion, EDTA và các chất tạo bên trong. Dubrovina và cộng sự đã đi đến kết luận: các chế phẩm của axit alginic làm giảm hấp thụ Sr -90, Ba và Ra-226 20-25 lần, là phương tiện hiệu quả nhất trong các phương tiện phòng tránh nhiễm độc nuclit phóng xạ.

Vào năm 1972 đã công bố các kết quả quan trắc lâm sàng đầu tiên, chứng minh khả năng của alginat loại khỏi cơ thể các đồng vị phóng xạ (Van der Borgh 1972). Trước đó, quan trắc trên các tình nguyện viên, việc uống 10g alginat natri 20 phút trước khi chịu liều 0,36- 0,48mkCi Sr-85 đã kìm giữ sự hút vào nuclit phóng xạ, khi đó nồng độ đồng vị trong nước tiểu là nhỏ hơn so với đối chứng là 9,5 lần, trong máu 9,2 lần. (Hesp 1967). Các kết luận tương tự cũng được các nhà nghiên cứu khác rút ra đối với Sr phóng xạ (Hodg- Kinson 1967), với radi (Van der Borgh 1972), với Bari (Sutton 1972). Cách sử dụng alginat thuận lợi nhất là dưới dạng dung dịch lỏng 5-10% cùng với siro và sữa. Các quan trắc trên người và trên động vật chỉ ra rằng, ở mức độ lớn, sự ức chế hút vào các đồng vị phóng xạ từ ruột được xác định bằng tỷ lệ guluroid/mannuroid (Van der Borgh 1972; Shepherd 1973).

Các nghiên cứu muộn hơn đã chỉ rõ rằng, trong các điều kiện *in vitro*, tính bám của alginat natri cao hơn vài lần so với axit alginic và alginat canxi, còn trong điều kiện *in vivo* hiệu quả của alginat natri loại bỏ Sr phóng xạ ra khỏi cơ thể chuột thấp hơn so với axit alginic và alginat canxi (Aminhina 1994). Điều này được giải thích bởi ảnh hưởng của canxi ổn định lên sự gia tăng việc loại bỏ Sr phóng xạ. Trong các nghiên cứu so sánh tính hiệu quả của các dạng alginat lấy từ *Laminaria digitata* đã chỉ ra rằng các chế phẩm alginat canxi vượt alginat natri về khả năng loại bỏ phóng xạ khỏi cơ thể (Korotaev 1992).

Một trong các cách phòng tránh nhiễm xạ bên trong bởi Sr phóng xạ, và tất nhiên cả các đồng vị phóng xạ khác liên quan tới việc soạn ra một đơn thuốc các thực phẩm có nồng độ alginat natri và canxi cao (Korzun 1992). Hướng này rất có tiềm năng trong việc giải quyết tích tụ Sr phóng xạ trong cơ thể người, sống trong các vùng lãnh thổ có mức Sr-90 cao trong đất. Trong công trình kinh điển của Haug năm 1964 đã chỉ ra rằng, tính năng của axit alginic đối với các chất ô nhiễm phóng xạ giảm đi theo dãy sau đây: Ba>Pb>Cu>Sr>Cd>Ca>Zn>Ni>Co>Mn>Fe>Mg. Muộn hơn dãy này có một ít thay đổi: Pb>Cu>Ba>Sr>Ca>Co>Mn>Zn>Fe. Nhưng trong mọi trường hợp thì các số liệu đó nói lên rằng, việc sử dụng alginat kích thích sự hút bám và loại bỏ Sr, Ba, và chì cũng như các đồng vị của chúng và hầu như không vi phạm sự trao đổi canxi và chuyển hóa các chất vi lượng và đa lượng có ích cho cơ thể người.

Trên các động vật thí nghiệm đã xác định rằng khi đưa vào đồng thời alginat canxi cùng với axetat chì, việc kim loại thâm nhập vào các cơ quan bên trong và xương chậm lại: mức chì trong gan động vật, có dùng alginat và muối chì nhỏ hơn ở các động vật kiểm chứng chỉ được dùng axetat chì 1,4-3,2 lần, trong thận 1,8-2,6 lần, trong xương 1,4-2,3 lần. Alginat canxi có hiệu quả phòng và chữa bệnh khi bị nhiễm độc chì ở các động vật thí nghiệm (Cavchenko 1994).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình chế biến rong Mơ (*Sargassum* sp.) để thu các sản phẩm fucoxanthin, phlorotannin, fucoidan và alginat theo phương pháp sử dụng sóng siêu âm cường độ cao kết hợp enzym phân giải xenlulozơ.

Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất quy trình bao gồm các bước: sơ chế nguyên liệu, siêu âm phá vỡ tế bào nguyên liệu bằng cách sử dụng siêu âm cường độ cao để phá vỡ cấu trúc tế bào rong Mơ, thủy phân xenlulozơ trong rong bằng cách sử dụng enzym xenluloza kết hợp sóng siêu âm ở cường độ thấp để thủy phân thành các oligosacarit hòa tan, chiết thu hồi fucoxanthin, chiết thu hồi phlorotannin bằng cách sử dụng kỹ thuật chiết với các dung môi hữu cơ có độ phân cực khác nhau kết hợp ly tâm, chiết xuất fucoidan bằng cách bổ sung nước khử ion vào pha rắn, siêu âm với cường độ mạnh để thu nhận fucoidan; và chiết xuất alginat bằng dung dịch kiềm, sử dụng kỹ thuật điện hóa để tẩy màu, thu được alginat sạch.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình chế biến rong Mơ (*Sargassum* sp.) để thu các sản phẩm fucoxanthin, phlorotannin, fucoidan và alginat theo phương pháp sử dụng sóng siêu âm cường độ cao kết hợp enzym bao gồm các bước:

Bước 1: Sơ chế nguyên liệu

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

Bước 2: Siêu âm phá vỡ tế bào nguyên liệu

Rong Mơ sau sơ chế sạch được bổ sung nước theo tỉ lệ 4/1 (nước/rong: thể tích/trọng lượng); nghiền nhỏ bằng máy nghiền chuyên dụng đến kích thước <0,1mm.

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

Bước 3: Thủy phân xenlulozơ trong rong

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

Bước 4: Chiết thu hồi fucoxanthin

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

Bước 5: Chiết thu hồi phlorotanin

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

Bước 6: Chiết xuất fucoidan

Hỗn hợp A2 được ly tâm ở tốc độ 9000 vòng/phút thu được phần chất rắn B1 và phần lỏng C1. Phần chất rắn B1 được bổ sung nước khử ion theo tỉ lệ 10/1 (ml/g), khuấy đều sau đó siêu âm ở mức công suất 30W/cm² trong 5 phút ở 50°C,

lọc thu dung dịch; tiến hành lặp lại 2 lần thu được dịch lọc và phần chất rắn A3. Gom phần dịch lọc, bổ sung CaCl_2 theo tỉ lệ 0,8g/lít, ly tâm được phần chất rắn B2 và phần lỏng C2. Phần chất lỏng C2 sau đó cô cạn còn 1/3 thể tích dưới áp suất giảm. Bổ sung etanol 96° theo tỉ lệ 7/10 (thể tích/thể tích), ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút thu được phần chất rắn B3, sấy khô thu được sản phẩm là fucoidan với hàm lượng > 90%.

Bước 7: Chiết xuất alginat

Phần chất rắn A3 gom chung với phần chất rắn B2 được chất rắn A4. Khấy đều chất rắn A4 trong dung dịch Na_2CO_3 5% với tỷ lệ 1/4 (mg/ml), siêu âm ở mức công suất $10\text{W}/\text{cm}^2$ ở 60°C trong 10 phút sau đó lọc loại bỏ chất rắn thu lấy phần chất lỏng. Phần chất lỏng được đưa vào bình điện phân với điện cực titan trong điều kiện 1,5V và $0,3\text{mA}/\text{cm}^2$ trong 2 giờ. Dung dịch thu được đem rót từ từ vào dung dịch CaCl_2 1,8% với tỷ lệ 2/1 (thể tích/thể tích) trong điều kiện khuấy mạnh ở nhiệt độ thường. Sau đó để lắng dung dịch trong 2 giờ, lọc thu lấy phần kết tủa và sấy khô thu được sản phẩm là canxi alginat.

Hiện nay có hai phương pháp cơ bản để tách chiết alginic. Cả hai phương pháp đều giống nhau ở giai đoạn chiết xuất axit alginic, chỉ khác nhau ở giai đoạn kết tinh alginat.

Phương pháp 1: Rong khô hoặc rong tươi được ngâm trong dung dịch axit loãng để loại bỏ các ion kim loại và trương nở hoàn toàn. Sau đó rong được thủy phân được hoà tan trong dung dịch kiềm, tạo ra một dung dịch alginat natri dạng keo. Lọc thu dịch và loại bã rong. Dịch lọc được làm sạch và xử lý màu.

Tiếp đến là giai đoạn kết tinh canxi alginat. Có nhiều phương pháp kết tinh canxi alginat khác nhau. Trong giai đoạn này, dung dịch natri alginat tan được cho kết tinh với muối của canxi để tạo ra kết tủa dạng sợi. Lọc lấy phần kết tủa thu được canxi alginat thô.

Để thu axit alginic, người ta hoà tan canxi alginat với axit để loại bỏ ion canxi và tạo ra axit alginic dạng sợi không tan. Axit alginic sau đó được sử dụng để tạo ra hàng loạt các muối alginat khác nhau.

Phương pháp thứ 2: kết tủa trực tiếp axit alginic bằng cách sử dụng axit vô cơ. Ưu điểm của phương pháp này là không sử dụng muối canxi và bỏ qua các bước lọc trong quá trình sử dụng canxi làm cho phương pháp trở nên đơn giản hơn rất nhiều. Đối với một số loài rong nâu *Ascophyllum* thì không thể sử dụng phương pháp này do kết tủa axit alginic tạo thành quá mềm và keo rất khó để tách nước.

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Quy trình chế biến *Sargasum mcclurei* thuộc *Sargasum* sp. để thu các sản phẩm fucoxanthin, phlorotannin, fucoidan và alginat theo phương pháp sử dụng sóng siêu âm cường độ cao kết hợp enzym. Quy trình này bao gồm các bước:

Bước 1: Sơ chế nguyên liệu

Mẫu rong *Sargasum mcclurei* thu hoạch tại vùng biển Nha Trang – Khánh Hòa vào tháng 4, 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. Lấy 10kg để chế biến.

Bước 2: Siêu âm phá vỡ tế bào nguyên liệu

10kg rong sau sơ chế sạch được bổ sung 40 lít nước, nghiền nhỏ bằng máy nghiền chuyên dụng đến kích thước $<0,1\text{mm}$.

Rong sau khi nghiền được đưa vào thiết bị siêu âm chuyên dụng với đầu phát siêu âm dạng thanh (chất liệu Titan) dung tích 120 lít, tiến hành siêu âm ở mức công suất $30\text{-}40\text{W}/\text{cm}^2$ trong 30 phút ở nhiệt độ 50°C sau đó tắt hệ thống siêu âm.

Bước 3: Thủy phân xenlulozơ trong rong.

Hỗn hợp sau siêu âm được bổ sung 6g enzym Viscozyme L (Novozyme, hoạt độ 50000IU), điều chỉnh độ pH 5-6 bằng hệ đệm axetat, siêu âm xuống còn $2\text{-}4\text{W}/\text{cm}^2$, tiến hành trong 40 phút ở nhiệt độ $40\text{-}42^\circ\text{C}$ sau đó nâng công suất siêu âm

lên $50\text{W}/\text{cm}^2$ trong vòng 5 phút để bất hoạt enzym. Hạ nhiệt độ hỗn hợp về nhiệt độ phòng.

Bước 4: Chiết thu hồi fucoxanthin

Bổ sung 10 lít diethylene vào hỗn hợp sau thủy phân, khuấy đều sau đó đưa vào hệ thiết bị ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, thu lấy pha hữu cơ; lặp lại quá trình 3 lần. Gom pha hữu cơ, làm khan bằng 200g Na_2SO_4 , đuổi dung môi dưới áp suất giảm thu được 52g dầu chứa $\sim 1\%$ fucoxanthin. Phần còn lại sau khi chiết diethylene là hỗn hợp bao gồm phần nước và chất rắn (hỗn hợp A1).

Bước 5: Chiết thu hồi phlorotannin

Hỗn hợp A1 sau khi chiết diethylene được bổ sung 10 lít ethyl axetat, khuấy đều trong 10 phút sau đó đưa vào ống ly tâm ở tốc độ 3500 vòng/phút trong 15 phút, thu lấy pha hữu cơ; lặp lại quá trình 3 lần. Gom pha hữu cơ làm khan bằng 200g Na_2SO_4 , cô cạn thu được 98g cặn chiết chứa $\sim 15\%$ phlorotannin. Phần còn lại sau khi chiết ethyl axetat là hỗn hợp bao gồm phần nước và chất rắn (hỗn hợp A2).

Bước 6: Chiết xuất fucoidan

Hỗn hợp A2 được ly tâm ở tốc độ 9000 vòng/phút thu được phần chất rắn B1 và phần lỏng C1. Phần chất rắn B1 được bổ sung 50 lít nước khử ion, khuấy đều sau đó siêu âm ở mức công suất $30\text{W}/\text{cm}^2$ trong 5 phút ở 50°C , lọc thu dung dịch; tiến hành lặp lại 2 lần thu được dịch lọc và phần chất rắn A3. Gom phần dịch lọc, bổ sung 120g CaCl_2 , ly tâm được phần chất rắn B2 và phần lỏng C2. Phần chất lỏng C2 sau đó cô cạn còn 50 lít dưới áp suất giảm. Bổ sung 35 lít ethanol 96° , ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút thu được phần chất rắn B3, sấy khô thu được 28,5g sản phẩm là fucoidan với hàm lượng $\sim 90\%$.

Bước 7: Chiết xuất alginat

Phần chất rắn A3 gom chung với phần chất rắn B2 được chất rắn A4. Khấy đều chất rắn A4 trong 4 lít dung dịch Na_2CO_3 5%, siêu âm ở mức công suất $10\text{W}/\text{cm}^2$ ở 60°C trong 10 phút sau đó lọc loại bỏ chất rắn thu lấy phần chất lỏng. Phần chất lỏng được đưa vào bình điện phân với điện cực titan trong điều kiện 1,5V

và $0,3\text{mA}/\text{cm}^2$ trong 2 giờ. Dung dịch thu được đem rót từ từ vào 2 lít dung dịch CaCl_2 1,8% trong điều kiện khuấy mạnh ở nhiệt độ thường. Sau đó để lắng dung dịch trong 2 giờ, lọc thu lấy phần kết tủa và sấy khô ta thu được 297g sản phẩm là canxi alginat đạt tiêu chuẩn Codex 2017.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế này đưa ra quy trình công nghệ chế biến toàn diện rong Mơ thành các sản phẩm có giá trị cao như fucoxanthin, phlorotanin, fucoidan và alginat. Quy trình được mô tả bởi sáng chế là hiệu quả với khả năng thu hồi đồng bộ và hiệu suất cao các sản phẩm lên tới $>90\%$, hạn chế tối đa chất thải. Các quy trình khác đã được mô tả thường chỉ thu hồi được 1 vài sản phẩm. Vì vậy đây là một quy trình hiệu quả để sản xuất các sản phẩm có giá trị sử dụng cao mà có giá thành thấp từ nguồn nguyên liệu rong Mơ rất dồi dào, có sẵn trong tự nhiên.

Quy trình sáng chế này dựa trên đặc tính của nguyên liệu và các sản phẩm, sử dụng nền tảng công nghệ sóng siêu âm để phá hủy các cấu trúc tế bào và sử dụng sóng siêu âm kết hợp enzym – áp dụng trên đối tượng rong Mơ để thu được các sản phẩm fucoxanthin, phlorotanin, fucoidan và alginat. Việc sử dụng sóng siêu âm cường độ cao trong giai đoạn đầu và sự kết hợp sóng siêu âm cường độ thấp với enzym ở giai đoạn tiếp theo đã giúp giảm một lượng lớn enzym cần sử dụng (3-4 lần), đồng thời thời gian cần để thủy phân cũng giảm từ 6 giờ xuống còn 40 phút. Chính điều này đã hạn chế được sự oxy hóa một số thành phần nhạy cảm như fucoxanthin và phlorotanin. Mặt khác, quy trình sử dụng sóng siêu âm và enzym trong giai đoạn xử lý nguyên liệu giúp phá vỡ được mạng lưới liên kết giữa alginat, fucoidan với xenlulozơ; do đó không cần sử dụng axit trong giai đoạn xử lý nguyên liệu trước khi chiết tách fucoidan và alginat nên các cấu trúc của fucoidan và alginat được bảo toàn, tránh sự cắt đứt mạch polime một phần bởi axit. Ngoài ra, quá trình chiết tách fucoxanthin và phlorotanin trước khi chiết tách alginat đã làm giảm một lượng lớn các chất màu, bên cạnh đó việc sử dụng quá trình điện phân để tẩy màu cũng giúp tránh được việc phải sử dụng một lượng lớn các chất oxy hóa để tẩy màu như javen hoặc H_2O_2 nên tránh được việc tồn dư các hóa chất không mong muốn cũng như hạ giá thành sản phẩm alginat.

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

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chế biến rong Mơ (*Sargassum* sp.) để thu các sản phẩm fucoxanthin, phlorotannin, fucoidan và alginat theo phương pháp sử dụng sóng siêu âm cường độ cao kết hợp enzym, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) sơ chế nguyên liệu: làm sạch mẫu rong *Sargassum* sp. sau khi thu hoạch, loại bỏ rong lạ và sinh vật bám trên rong, rửa sạch bằng nước biển sau đó rửa sạch lại bằng nước ngọt, bảo quản ở nhiệt độ -20°C trước khi sử dụng;

(ii) siêu âm phá vỡ tế bào nguyên liệu: bổ sung nước vào mẫu rong được sơ chế sạch theo tỉ lệ 4/1 (nước/rong, thể tích/trọng lượng), nghiền nhỏ bằng máy nghiền chuyên dụng đến kích thước $<0,1\text{mm}$, tiếp đó sau khi nghiền mẫu rong, tiến hành siêu âm ở mức công suất $30\text{-}40\text{W}/\text{cm}^2$ trong 30 phút ở nhiệt độ 50°C ;

(iii) thủy phân xenlulozơ trong mẫu rong: bổ sung enzym phân giải xenlulozơ có nguồn gốc từ chủng nấm men *Aspergillus aculeatus* (Enzym Viscozyme L) vào hỗn hợp sau siêu âm theo tỉ lệ 0,06% (enzym/cơ chất) tại độ pH 5-6, hạ mức công suất siêu âm xuống còn $2\text{-}4\text{W}/\text{cm}^2$, tiến hành siêu âm trong 40 phút ở nhiệt độ $40\text{-}42^{\circ}\text{C}$, sau đó nâng công suất siêu âm lên $50\text{W}/\text{cm}^2$ trong vòng 5 phút để bất hoạt enzym, cuối cùng làm nguội nhiệt độ hỗn hợp về nhiệt độ phòng;

(iv) chiết thu hồi fucoxanthin: bổ sung diethylete vào hỗn hợp sau thủy phân với tỷ lệ 1/4 (thể tích/thể tích), lắc đều sau đó đưa vào ống ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng và thu lấy pha hữu cơ, lặp lại quá trình 3 lần, gom pha hữu cơ, làm khan bằng Na_2SO_4 , cô cạn thu được phần cặn chiết dạng dầu chứa $\sim 1\%$ fucoxanthin, và phần còn lại sau khi chiết bằng diethylete là hỗn hợp bao gồm phần nước và chất rắn (hỗn hợp A1);

(v) chiết thu hồi phlorotannin: bổ sung etyl axetat vào hỗn hợp A1 sau khi chiết bằng diethylete với tỷ lệ 1/4 (thể tích/thể tích), khuấy đều trong 10 phút sau đó đưa vào ống ly tâm ở tốc độ 3500 vòng/ phút trong 15 phút và thu lấy pha hữu cơ, lặp lại quá trình 3 lần, gom pha hữu cơ và làm khan bằng Na_2SO_4 , cô pha hữu cơ để thu được phần cặn chiết chứa phlorotannin, và phần còn lại sau khi chiết bằng etyl axetat là hỗn hợp bao gồm phần nước và chất rắn (hỗn hợp A2);

(vi) chiết xuất fucoidan: ly tâm hỗn hợp A2 ở tốc độ 9000 vòng/ phút thu được phần chất rắn B1 và phần lỏng C1, bổ sung nước khử ion vào phần chất rắn B1 theo tỉ lệ 10/1 (ml/g), khuấy đều và siêu âm ở mức công suất $30\text{W}/\text{cm}^2$ trong 5 phút ở 50°C để thu được dịch lọc và phần chất rắn A3, tiến hành lặp lại 2 lần, gom phần dịch lọc, bổ sung CaCl_2 theo tỉ lệ 0,8g/lít, ly tâm để thu được phần chất rắn B2 và phần lỏng C2, cô phần chất lỏng C2 này tới còn 1/3 thể tích dưới áp suất giảm và bổ sung etanol 96 độ theo tỉ lệ 7/10 (thể tích/thể tích), ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/ phút thu được phần chất rắn B3, sấy khô B3 để thu được sản phẩm là fucoidan với hàm lượng $> 90\%$; và

(vii) chiết xuất alginat: gom chung phần chất rắn A3 với phần chất rắn B2 được chất rắn A4, khuấy đều chất rắn A4 trong dung dịch Na_2CO_3 5% với tỷ lệ 1/4, (mg/ml), siêu âm ở mức công suất $10\text{W}/\text{cm}^2$ ở 60°C trong 10 phút, sau đó lọc loại bỏ chất rắn thu lấy phần chất lỏng, tiếp đó cho phần chất lỏng này vào bình điện phân với điện cực titan và điện phân trong điều kiện 1,5V và $0,3\text{mA}/\text{cm}^2$ trong 2 giờ, sau khi điện phân rót từ từ dung dịch thu được vào dung dịch CaCl_2 1,8% với tỷ lệ 2/1 (thể tích/thể tích) trong điều kiện khuấy mạnh ở nhiệt độ thường, sau đó để lắng dung dịch trong 2 giờ, lọc thu lấy phần kết tủa và sấy khô để thu được sản phẩm là canxi alginat.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước (v) còn bao gồm công đoạn thu phần nước bao gồm các thành phần như khoáng vi lượng, carbohydrat, axit amin, peptit và kích thích tố thực vật hòa tan để sử dụng ngay làm phân bón lá.

