

THÔNG BÁO KHOA HỌC

**ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME  $\alpha$ -GLUCOSIDASE CỦA DỊCH CHIẾT TỪ MỘT SỐ LOÀI RONG BIỂN**  
**EVALUATION OF  $\alpha$ -GLUCOSIDASE INHIBITORY ACTIVITY OF SOME SELECTED SEAWEED EXTRACTS**

Nguyễn Thế Hân<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Kim Ngân<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Minh<sup>1</sup>

Ngày nhận bài: 28/2/2017; Ngày phản biện thông qua: 16/4/2018; Ngày duyệt đăng: 27/4/2018

**TÓM TẮT**

Một trong những giải pháp hiệu quả để ngăn ngừa và điều trị bệnh tiểu đường là làm chậm quá trình hấp thu glucose bằng cách ức chế sự hoạt động của enzyme tiêu hóa tinh bột như  $\alpha$ -glucosidase. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của dịch chiết từ 5 loài rong (*Turbinaria ornate*, *Sargassum oligocystem*, *Sargassum microcystem*, *Porphyra sp.* và *Caulerpa lentilliferathu* hoạch tại vùng biển Khánh Hòa. Khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của rong *T. ornate* là cao nhất trong các loài rong nghiên cứu. Tiếp theo, ảnh hưởng của điều kiện chiết (nhiệt độ chiết, thời gian chiết, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết) đến khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của rong *T. ornate* được nghiên cứu. Điều kiện chiết thích hợp được xác định như sau: thời gian chiết là 75 phút, nhiệt độ chiết là 90°C và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml) là 1/40, sử dụng dung môi nước. Dựa trên kết quả đạt được, dịch chiết từ rong *T. ornate* có tiềm năng lớn sử dụng trong việc ngăn ngừa và điều trị bệnh tiểu đường.

Từ khóa: Rong biển, chất ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase, bệnh tiểu đường, *Turbinaria ornate*

**ABSTRACT**

One of the therapeutic approaches for preventing diabetes mellitus is to retard the absorption of glucose via inhibition of  $\alpha$ -glucosidase (the key enzyme for starch digestion). The objective of this study was to evaluate the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of extracts from five different seaweed species (*Turbinaria ornate*, *Sargassum oligocystem*, *Sargassum microcystem*, *Porphyra sp.* and *Caulerpa lentillifera*) harvested from the Khanh Hoa coast, Vietnam. Among the seaweed species studied, the *T. ornate* extract showed the highest  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. The effect of extraction conditions including extraction time, extraction temperature and solid to liquid ratio on the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of the *T. ornate* extract was investigated. The best extraction conditions were found to be the extraction time of 75 min, the extraction temperature of 90°C and the solid to liquid ratio (g/ml) of 1/40. Based on the findings, the *T. ornate* extract can be considered as a potential candidate for the management of type 2 diabetes mellitus.

Keywords: Seaweeds,  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, diabetes mellitus, *Turbinaria ornate*

**I. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Bệnh tiểu đường là sự rối loạn chuyển hóa carbohydrate do sự thiếu hụt hormone insulin của tuyến tụy hoặc do sự giảm tác động của chúng trong cơ thể. Tiểu đường là một trong

những bệnh nguy hiểm nhất và đang trở thành vấn đề sức khỏe của toàn cầu trong giai đoạn hiện nay. Theo tổ chức y tế thế giới (WHO), số người mắc bệnh tiểu đường từ năm 2008 đến năm 2014 đã tăng từ 108 đến 422 triệu.

<sup>1</sup> Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

Theo dự báo, vào năm 2030 bệnh tiểu đường sẽ đứng đầu về các bệnh gây tử vong trên thế giới. Một trong những khó khăn với bệnh nhân tiểu đường đó là chi phí điều trị cao. Vấn đề này đòi hỏi phải tìm kiếm các nguồn nguyên liệu mới hiệu quả với giá thành hợp lý.

Một trong những cách hiệu quả để kiểm soát đường huyết sau bữa ăn là ức chế hoạt động của enzyme  $\alpha$ -glucosidase có khả năng tiêu hóa carbohydrate và hấp thụ glucose. Các chất ức chế enzyme này có tác dụng làm chậm quá trình hấp thụ carbohydrate ở ruột non, qua đó làm giảm nồng độ đường glucose trong máu. Rong biển được biết đến là nguồn nguyên liệu giàu các hợp chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt là chất ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase. Việt Nam có một hệ tạo biển phong phú với khoảng 1.000 loài, trong đó có 638 loài rong biển đã được định danh [4]. Rong biển đã được thu hoạch và sử dụng từ lâu như là một nguồn thực phẩm, thức ăn cho động vật và một số bài thuốc truyền thống. Tuy nhiên, ở Việt Nam rong biển chủ yếu được sử dụng ở dạng nguyên liệu thô hoặc chế biến thành những sản phẩm đơn giản, với giá thành thấp. Trong những năm gần đây, một số nghiên cứu đã bước đầu quan tâm đến việc tách chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học từ rong biển. Tuy nhiên, phần lớn tập trung vào chiết rút các hợp chất chống oxy hóa và ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm. Cuong và cộng sự [3] đã đánh giá khả năng chống oxy hóa của một số loài rong biển thu hoạch tại vùng biển Khánh Hòa, Việt Nam. Thịnh và cộng sự [12] đã tách chiết fucoidan và thử nghiệm khả năng kháng tế bào ung thư từ một số loài rong nâu ở Việt Nam.

Ở Việt Nam, cho đến nay, hầu hết những công trình nghiên cứu về hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase được thực hiện trên thực vật [1, 2]. Chưa có công trình nghiên cứu nào được công bố về khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của rong thu hoạch ở

vùng biển Khánh Hòa nói riêng và Việt Nam nói chung. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của một số loài rong tại vùng biển Khánh Hòa. Từ đó, xác định điều kiện chiết thích hợp để thu nhận dịch chiết có hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase từ loài rong tiềm năng.

## II. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng 5 loài rong biển (3 loài rong nâu: *Sargassum oligocystem*, *Sargassum microcystem* và *Turbinaria ornata*; 1 loài rong lục: *Caulerpa lentillifera* và 1 loài rong đỏ: *Porphyrasp.*). Các mẫu rong nâu và rong đỏ được thu hoạch tại vùng biển Sông Lô và Hòn Chồng (Nha Trang, Khánh Hòa) vào tháng 5/2016, mẫu rong lục *Caulerpa lentillifera* ở giai đoạn từ 35 đến 40 ngày tuổi thu mua từ Công ty THNN Trí Tín (Nha Trang, Khánh Hòa). Các mẫu rong sau thu hoạch được rửa sạch và làm khô tự nhiên dưới ánh nắng mặt trời đến độ ẩm khoảng 15%. Nguyên liệu khô được nghiền nhỏ bằng máy nghiền (Supper Blender, MXT2GN, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd, Nhật Bản) và sàng bằng lưới sàng có đường kính 0,1 mm. Bột nguyên liệu khô được bao gói chân không trong bao bì PA và bảo quản ở nhiệt độ  $-40^{\circ}\text{C}$  cho đến khi tiến hành các thí nghiệm.

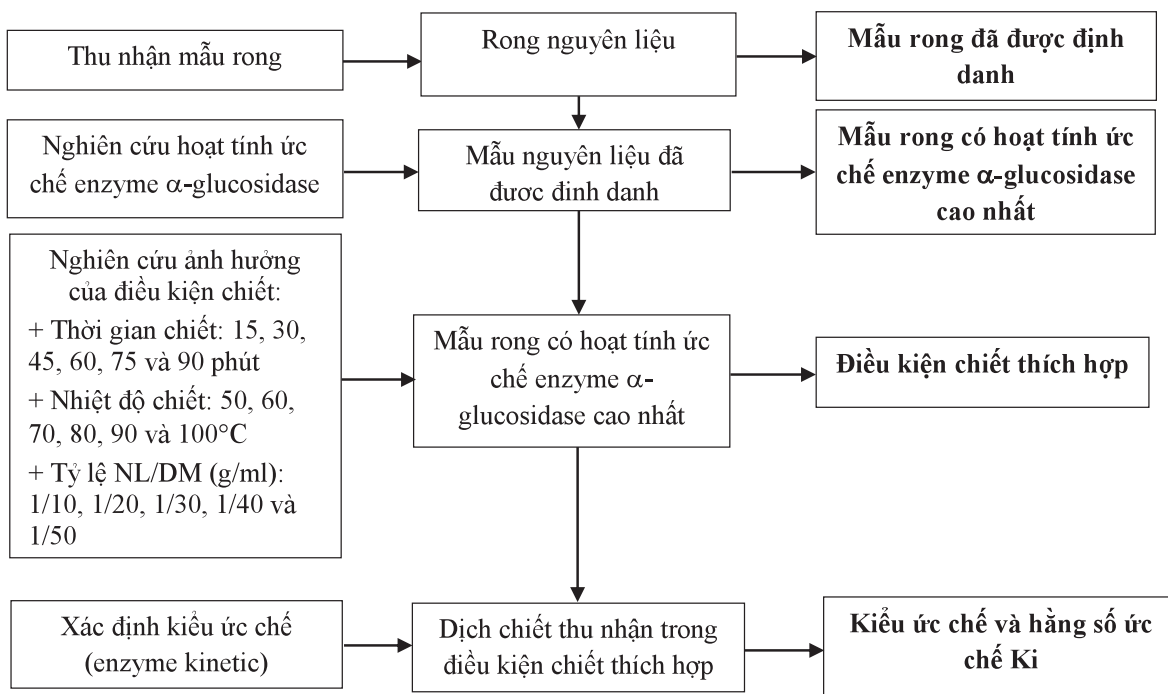
### 2. Hóa chất

Enzyme  $\alpha$ -glucosidase từ nấm men, cơ chất p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid và  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  được cung cấp bởi công ty Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ). Tất cả các hóa chất, thuốc thử khác sử dụng trong nghiên cứu đều đạt tiêu chuẩn sử dụng trong phân tích.

### 3. Phương pháp nghiên cứu và kỹ thuật phân tích

#### 3.1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm

Sơ đồ bố trí thí nghiệm được thể hiện ở Hình 1.



Hình 1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm

### 3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của dung môi chiết

Để nghiên cứu ảnh hưởng của dung môi chiết, các điều kiện chiết khác được giữ cố định bao gồm: thời gian chiết là 60 phút, nhiệt độ chiết là 60°C và tỷ lệ NL/DM (g/ml) là 1/50. 1 g rong nguyên liệu khô được chiết bằng 3 loại dung môi khác nhau là nước, methanol và ethanol. Sau quá trình chiết, hỗn hợp được lọc bằng giấy lọc Whatman No.40 để thu dịch chiết. Dịch chiết được cô quay chân không ở nhiệt độ  $\leq 40^\circ\text{C}$  để loại hết dung môi chiết và đánh giá khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase. Dung môi chiết cho khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase cao nhất sẽ được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Sau khi xác định được dung môi chiết thích hợp, các mẫu rong được chiết trong một điều kiện chiết như nhau (dung môi chiết được lựa chọn từ thí nghiệm trên, nhiệt độ chiết: 60°C, thời gian chiết: 60 phút và tỷ lệ NL/DM (g/ml): 1/50) để so sánh khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase và chọn ra loài rong cho hoạt

tính ức chế cao nhất để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

### 3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian chiết

Để nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian chiết, các điều kiện chiết khác được giữ cố định bao gồm: dung môi chiết được lựa chọn từ thí nghiệm trên, nhiệt độ chiết là 60°C và tỷ lệ NL/DM (g/ml) là 1/50. 1 g rong nguyên liệu khô được chiết trong điều kiện này ở các khoảng thời gian khác nhau là 15, 30, 45, 60, 75 và 90 phút. Sau quá trình chiết, hỗn hợp được lọc bằng giấy lọc Whatman No.40 để thu dịch chiết. Dịch chiết được cô quay chân không ở nhiệt độ  $\leq 40^\circ\text{C}$  để loại hết dung môi chiết và đánh giá khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase. Thời gian chiết cho hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase cao nhất sẽ được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

### 3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

Để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ chiết, các điều kiện chiết khác được giữ cố định bao gồm: dung môi chiết và thời gian chiết

được lựa chọn từ thí nghiệm trên, tỷ lệ NL/DM (g/ml) là 1/50. 1 g rong nguyên liệu khô được chiết trong điều kiện này ở các nhiệt độ khác nhau là 50, 60, 70, 80, 90 và 100°C. Sau quá trình chiết, hỗn hợp được lọc bằng giấy lọc Whatman No.40 để thu dịch chiết. Dịch chiết được cô quay chân không ở nhiệt độ ≤40°C để loại hết dung môi chiết và đánh giá khả năng ức chế enzyme α-glucosidase. Nhiệt độ cho hoạt tính ức chế enzyme cao nhất sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

### 3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi

Để nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ NL/DM chiết, các điều kiện chiết khác được giữ cố định bao gồm: dung môi chiết, thời gian chiết và nhiệt độ chiết được lựa chọn từ thí nghiệm trước. 1g rong nguyên liệu khô được chiết trong điều kiện này ở các tỷ lệ NL/DM (g/ml) khác nhau là 1/10, 1/20, 1/30, 1/40 và 1/50. Sau quá trình chiết, hỗn hợp được lọc bằng giấy lọc Whatman No.40 để thu dịch chiết. Dịch chiết được cô quay chân không ở nhiệt độ ≤40°C để loại hết dung môi chiết và đánh giá khả năng ức chế enzyme α-glucosidase. Tỷ lệ NL/DM cho hoạt tính ức chế enzyme cao nhất sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

### 3.6. Xác định hoạt tính ức chế enzyme α-glucosidase

Khả năng ức chế enzyme α-glucosidase được xác định theo phương pháp của Kim và cộng sự [9]. Cho 0,05 ml mẫu vào hỗn hợp gồm 0,1 ml enzyme (0,2 U/ml) và 2,3 ml đệm phosphate (0,01 M; pH 7,0). Hỗn hợp được lắc đều và ủ ở 37°C trong 5 phút. Tiếp theo, cho 0,1 ml dung dịch cơ chất p-nitrophenyl-α-D-glucopyranosid (3 mM) vào hỗn hợp để thực hiện quá trình phản ứng. Hỗn hợp được giữ ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Cuối cùng, thêm 1,5 ml dung dịch Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(0,1 M) và độ hấp thụ quang học của hỗn hợp được đo ở bước sóng 401 nm. Khả năng ức chế enzyme α-glucosidase được tính theo công thức sau:

Khả năng ức chế enzyme α-glucosidase

$$(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A1: Độ hấp thụ quang của mẫu thí nghiệm (có chứa dịch chiết).

A0: Độ hấp thụ quang của mẫu trắng (không bổ sung dịch chiết).

Khả năng ức chế enzyme α-glucosidase cũng được đánh giá dựa trên giá trị IC<sub>50</sub> (mg/ml). Giá trị này là nồng độ chất ức chế (dịch chiết) cho hoạt tính ức chế là 50%.

### 3.7. Xác định kiểu ức chế enzyme α-glucosidase của dịch chiết

Dịch chiết thu nhận trong điều kiện chiết thích hợp được sử dụng để nghiên cứu kiểu ức chế enzyme (enzyme kinetic). Kiểu ức chế enzyme được xác định theo phương pháp của Kellogg và cộng sự [6]. Phương pháp xác định hoạt tính ức chế enzyme được thực hiện theo Kim và cộng sự [9]. Trong nghiên cứu này, sử dụng các nồng độ cơ chất khác nhau từ 1 - 4 mM, nồng độ chất ức là 0 và 1 mg/ml. Kiểu ức chế được xác định dựa vào đồ thị Lineweaver-Burk, biểu diễn mối liên hệ giữa nồng độ cơ chất và tốc độ phản ứng.

### 4. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả của thí nghiệm được biểu diễn bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn của 3 lần thí nghiệm độc lập. Kết quả được tính toán và vẽ đồ thị bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Statistical Product and Services Solutions (SPSS) 16.0. Giá trị trung bình được phân tích ANOVA theo phép thử Duncan, giá trị p < 0,05 chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa thống kê.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 1. Ảnh hưởng của dung môi chiết đến khả năng ức chế enzyme α-glucosidase

Dung môi là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của 3 loại dung môi chiết khác nhau bao gồm nước, methanol và ethanol đến

hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của 5 loài rong biển được đánh giá. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở Bảng 1.

Hai loài rong không có khả năng ức chế (đến nồng độ 2mg/ml) là rong nhỏ *C. lentillifera* và rong mút *Porphyra sp.*. Đối với 3 loài rong còn lại, khả năng ức chế khi chiết bằng dung môi nước là cao nhất, tiếp theo là methanol và thấp nhất là ethanol. Khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase khi chiết bằng nước của *S. oligocystem*, *S. microcystem* và *T. ornata* lần lượt là 93,99; 96,37 và 95,39%; trong khi đó chiết bằng methanol lần lượt là 40,57; 75,41 và 89,1% và ethanol lần lượt là 19,78; 64,66 và 79,95%. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với một số báo cáo trước đây. Theo kết quả nghiên cứu Lordan và cộng sự [12] trên một số loài rong biển thu hoạch tại vùng biển Iceland cho thấy, khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -amylase và  $\alpha$ -glucosidase của dịch chiết nước cao hơn so với dịch chiết ethanol. Ví dụ, dịch chiết nước và ethanol của *Fucus vesiculosus* có giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 0,32 và 0,49  $\mu$ g/ml. Tuy nhiên, theo kết quả nghiên cứu của Hwang [5], dịch chiết ethanol và acetone của rong nâu *Sargassum hemiphyllum* lại cho khả năng ức

chế  $\alpha$ -amylase và  $\alpha$ -glucosidase cao hơn so với dịch chiết nước. Sự khác nhau này là do thành phần và bản chất của nguyên liệu rong. Kết quả nghiên cứu này cho thấy nhóm chất có khả năng ức chế mạnh enzyme  $\alpha$ -glucosidase trong một số loài rong thu hoạch tại vùng biển Khánh Hòa có khả năng tan tốt trong nước. Theo kết quả nghiên cứu của Kim và cộng sự [7], fucoidan (hợp chất thuộc nhóm polysaccharides, có khả năng tan tốt trong nước) thu nhận từ hai loài rong nâu *Fucus vesiculosus* và *Ascophyllum nodosum*, có khả năng ức chế mạnh enzyme  $\alpha$ -glucosidase. Trước đó, theo kết quả nghiên cứu của Zhang và cộng sự [13], dịch chiết nước giàu polysaccharides từ loài rong này có khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase trên cả mô hình *in vitro* và *in vivo*. Do đó, các chất chính có khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase trong dịch chiết của một số loài rong tại vùng biển Khánh Hòa có thể thuộc nhóm polysaccharides. Kết quả của nghiên cứu hiện tại giúp việc ứng dụng dịch chiết trong các lĩnh vực khác nhau được dễ dàng và hiệu quả, vì nước là dung môi rẻ tiền, dễ kiếm và an toàn.

**Bảng 1. Ảnh hưởng của dung môi chiết đến khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của 5 loài rong biển**

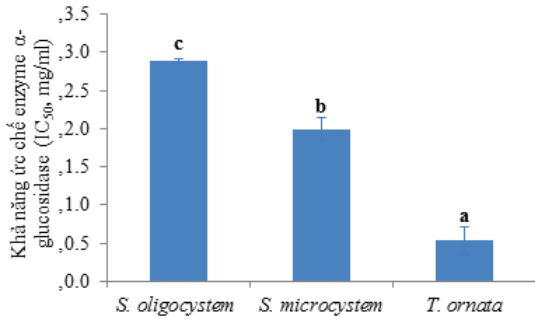
Dung môi	Khả năng ức chế enzyme $\alpha$ -glucosidase (%) <sup>*</sup>				
	<i>S. oligocystem</i>	<i>S. microcystem</i>	<i>T. ornata</i>	<i>Porphyrasp.</i>	<i>C.lentillifera</i>
Ethanol	19,78 ± 3,28 <sup>a</sup>	64,66 ± 4,47 <sup>a</sup>	79,95 ± 9,67 <sup>a</sup>	K	K
Methanol	40,57 ± 6,00 <sup>b</sup>	75,41 ± 7,66 <sup>a</sup>	89,15 ± 4,00 <sup>a</sup>	K	K
Nước	93,99 ± 1,38 <sup>c</sup>	96,37 ± 1,18 <sup>b</sup>	95,39 ± 0,59 <sup>a</sup>	K	K

<sup>\*</sup>Hoạt tính ức chế enzyme ở nồng độ 2 mg/ml. “K”: Không ức chế. Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Sau khi lựa chọn được nước là dung môi thích hợp để thu nhận dịch chiết có khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase từ một số loài rong, tiếp tục đánh giá khả năng ức chế enzyme của dịch chiết nước từ 3 loài rong *S. microcystem*, *S. oligocystem* và *T. ornata* thông

qua giá trị  $IC_{50}$  (Hình 2). Giá trị  $IC_{50}$  của dịch chiết của *S. oligocystem*, *S. microcystem* và *T. ornata* lần lượt là 2,89; 1,99 và 0,53 mg/ml. Như vậy, loài rong *T. ornata* có khả năng ức chế enzyme mạnh nhất trong các loài rong nghiên cứu.





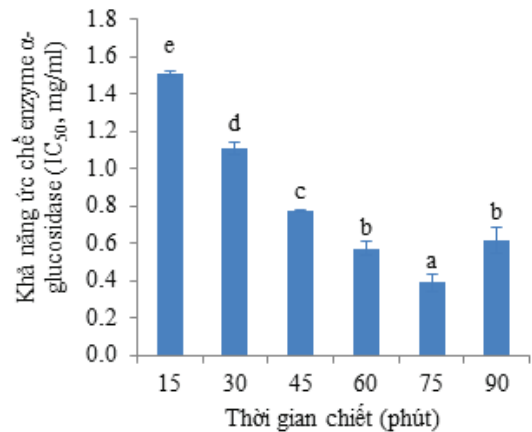
**Hình 2.** Khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase (giá trị  $IC_{50}$ ) của 3 loài rong *S. microcystem*, *S. oligocystem* và *T. ornata*. Các chữ cái khác nhau chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

Theo kết quả nghiên cứu của Hwang và cộng sự [5], hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase và  $\alpha$ -amylase thông qua giá trị  $IC_{50}$  của rong mơ *Sargassum hemiphyllum* thu hoạch từ vùng biển Đà Loan dao động từ 0,09 đến 3,47 mg/ml. Kết quả nghiên cứu của Lordan [11], khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của 15 loài rong thu hoạch tại vùng biển Iceland ở mức nhỏ hơn 0,1 mg/ml. Khả năng ức chế enzyme của rong biển phụ thuộc vào nhiều yếu tố như giống loài, khu vực sinh sống, thời tiết, khí hậu, thời điểm thu hoạch,... Theo kết quả nghiên cứu hiện tại, loài rong nâu *T. ornata* cho khả năng ức chế mạnh nhất trong các loài rong nghiên cứu. Do vậy, loài rong này được lựa chọn để nghiên cứu tìm điều kiện chiết (thời gian chiết, nhiệt độ chiết và tỷ lệ NL/DM) thích hợp.

**2. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase**

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian chiết đến khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của rong *T. Ornata* được thể hiện ở Hình 3. Theo đó, khả năng ức chế enzyme tăng dần theo thời gian chiết từ 15 phút đến 75 phút. Cụ thể, giá trị  $IC_{50}$  của dịch chiết khi chiết trong khoảng thời gian 15 phút là 1,51 mg/ml, tăng thời gian chiết lên 30 và 75 phút

thì giá trị này lần lượt là 1,11 và 0,39 mg/ml. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng thời gian chiết lên 90 phút thì hoạt tính ức chế enzyme giảm (giá trị  $IC_{50}$  là 0,62 mg/ml). Chiết là quá trình thẩm thấu và khuếch tán; nếu thời gian chiết ngắn thì các chất sẽ không kịp hòa tan ra môi trường chiết, còn khi tăng thời gian chiết thì dung môi sẽ có nhiều thời gian để thẩm thấu vào trong từng tế bào của rong biển thông qua hệ thống mao quản của rong. Vì vậy, cần thời gian chiết đủ dài để các chất được hòa tan một cách hiệu quả. Tuy nhiên, cũng không chiết với thời gian quá dài vì khi quá trình khuếch tán đạt trạng thái cân bằng thì tăng thời gian chiết lên, lượng chất chiết vẫn không thay đổi mà còn ảnh hưởng xấu đến chất chiết, làm giảm hoạt tính sinh học. Ngoài ra, thời gian chiết kéo dài còn tiêu tốn nhiều năng lượng và chi phí khác. Do đó thời gian chiết 75 phút được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



**Hình 3.** Ảnh hưởng của thời gian chiết đến khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase (giá trị  $IC_{50}$ ) của dịch chiết từ rong *T. ornata*. Các chữ cái khác nhau chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

**3. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase**

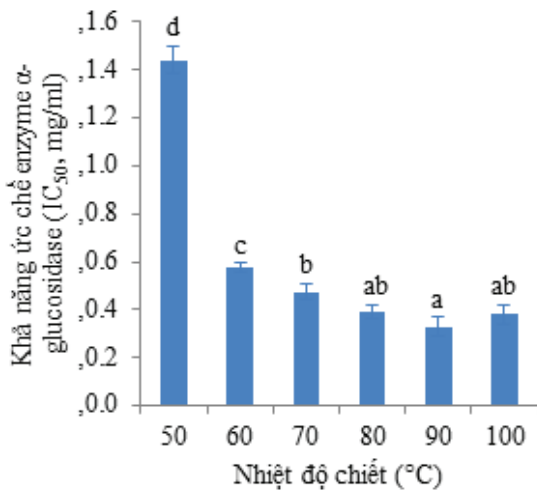
Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của dịch chiết rong *T. ornata*

được thể hiện ở Hình 4. Khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase tăng theo chiều tăng của nhiệt độ chiết từ 50 đến 90°C; giá trị  $IC_{50}$  của dịch chiết khi chiết ở nhiệt độ 90°C là thấp nhất (0.22 mg/ml), trong khi đó giá trị này khi chiết ở nhiệt độ 50°C là 1,44 mg/ml. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nhiệt độ chiết lên 100°C, hoạt tính ức chế enzyme có xu hướng giảm xuống (giá trị  $IC_{50}$  là 0,38 mg/ml). Sự ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến khả năng ức chế enzyme của dịch chiết được giải thích như sau: Hệ số khuếch tán và khả năng hòa tan của chất tan sẽ tăng khi nhiệt độ chiết tăng. Ngoài ra, khi nhiệt độ tăng sẽ làm phá vỡ màng tế bào, tạo điều kiện cho các chất chiết tách ra khỏi nguyên liệu. Trong nghiên cứu này, khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của dịch chiết nước tăng lên đến 90°C. Như vậy, các chất trong dịch chiết rong *T. ornata* có khả năng ức chế  $\alpha$ -glucosidase rất bền với nhiệt, kết quả này cho thấy dịch chiết có thể ứng dụng trong

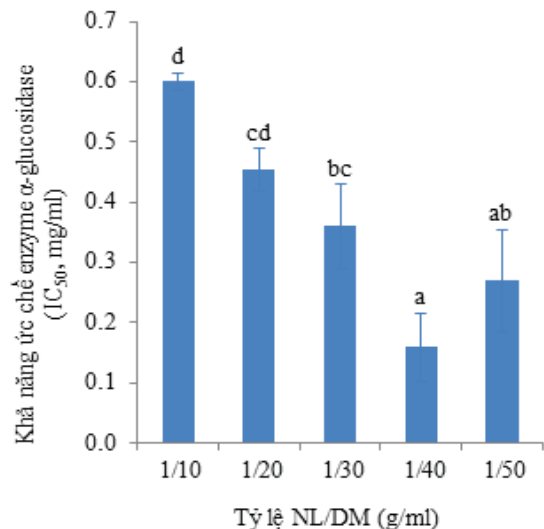
các sản phẩm sử dụng quá trình chế biến nhiệt.

**4. Ảnh hưởng của tỷ lệ NL/DM đến khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase**

Kết quả nghiên cứu sự ảnh hưởng của tỷ lệ NL/DM đến khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của dịch chiết rong *T. ornata* được thể hiện ở Hình 5. Giá trị  $IC_{50}$  giảm dần khi tỷ lệ NL/DM (g/ml) giảm từ 1/10 (g/ml) xuống 1/40 (g/ml) và tăng lên khi tiếp tục giảm tỷ lệ NL/DM xuống 1/50 (g/ml). Cụ thể, chiết ở tỷ lệ 1/10 (g/ml) thì giá trị  $IC_{50}$  là 0,6 mg/ml, chiết ở tỷ lệ 1/20 (g/ml) thì giảm còn 0,46 mg/ml, tiếp tục giảm tỷ lệ này xuống 1/30 và 1/40 g/ml thì giá trị  $IC_{50}$  lần lượt 0,36 mg/ml và 0,16 mg/ml. Tuy nhiên, khi giảm tỷ lệ NL/DM từ 1/40 xuống 1/50 (mg/ml) thì giá trị  $IC_{50}$  lại tăng lên (0,27 mg/ml), nhưng không có sự khác nhau về thống kê so với chiết ở tỷ lệ 1/40. Như vậy, dịch chiết thu nhận ở tỷ lệ NL/DM 1/40 (g/ml) cho khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase mạnh nhất.



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase (giá trị  $IC_{50}$ ) của dịch chiết từ rong *T. ornata*. Các chữ cái khác nhau chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )



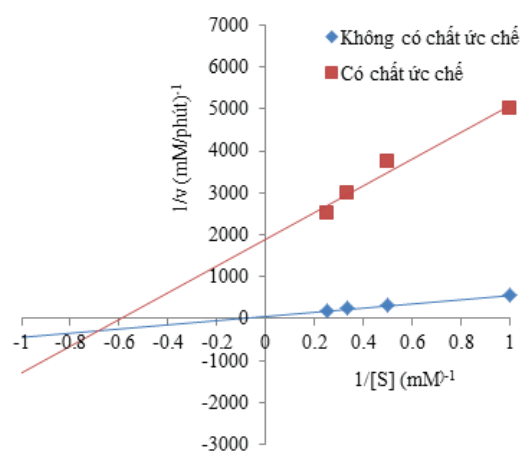
Hình 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ NL/DM (g/ml) đến khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase (giá trị  $IC_{50}$ ) của dịch chiết từ rong *T. ornata*. Các chữ cái khác nhau chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

Tỷ lệ NL/DM ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả chiết tách các hợp chất tự nhiên. Nếu tỷ lệ NL/DM quá thấp dẫn đến tốc độ khuếch tán cơ chất chậm, dẫn đến hiệu suất chiết thấp. Ngược lại, khi tăng tỷ lệ NL/DM thì tăng hiệu quả chiết, giảm thời gian; tuy nhiên, lại tăng lượng dung môi chiết sử dụng. Theo định luật Fick, quá trình chiết dựa trên cơ sở là quá trình thẩm thấu khuếch tán. Theo đó, các phân tử chất tan có xu hướng khuếch tán từ nơi có nồng độ cao đến nơi có nồng độ thấp. Như vậy, khi tăng lượng dung môi chiết lên thì sự chênh lệch nồng độ chất tan tăng, nên các chất tan có trong rong (nơi nồng độ chất tan cao) sẽ tăng cường khuếch tán ra ngoài môi trường dung môi (nơi có nồng độ chất tan thấp); làm cho hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học có trong dịch chiết thu được càng nhiều, từ đó khả năng ức chế enzyme tăng. Tuy nhiên, lượng dung môi chỉ tăng đến một lúc nào đó thì khả năng ức chế enzyme sẽ không tăng nữa vì khi đó các chất tan đã có đủ lượng dung môi để hòa tan hay nói các khác lúc đó sự chênh lệch nồng độ chất tan là không đáng kể, nếu ta cứ tiếp tục tăng lượng dung môi thì chỉ làm cho hàm lượng chất tan trong dịch chiết bị loãng ra. Khi đó, quá trình cô quay chân không để loại bỏ dung môi sẽ kéo dài hơn, có thể ảnh hưởng đến hoạt tính ức chế enzyme của một số thành phần có trong dịch chiết. Dựa trên kết quả nghiên cứu, tỷ lệ NL/DM là 1/40 (g/ml) được lựa chọn.

**5. Kiểu ức chế của enzyme  $\alpha$ -glucosidase của dịch chiết từ rong *Turbinaria ornata***

Kết quả kiểu ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của dịch chiết loài rong *T. ornata* được thể hiện ở Hình 6. Kiểu ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase từ nấm men *S. cerevisiae* của dịch chiết từ rong *T. ornata* được đánh giá bằng phân tích enzyme, sử dụng cơ chất có nồng độ khác nhau từ 1 - 4 mM. Dịch chiết ức chế enzyme theo kiểu hỗn hợp (mixed type of inhibi-

tion) với  $K_i$  là 0,89 mg/ml. Kiểu ức chế này phù hợp với một số nghiên cứu trước đây trên các đối tượng rong biển khác nhau. Ví dụ, theo kết quả nghiên cứu của Kellogg và cộng sự [6], dịch chiết và phân đoạn dịch chiết từ rong nâu *Fucus distichus* ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase theo kiểu hỗn hợp, với giá trị  $K_i$  nhỏ hơn 0,2 mg/ml. Tương tự, Kim và cộng sự [8] và cũng chỉ ra rằng, một số hợp chất thu nhận từ rong đỏ có khả năng ức mạnh enzyme  $\alpha$ -glucosidase theo kiểu ức chế hỗn hợp. Kiểu ức chế hỗn hợp của dịch chiết rong biển có thể được giải thích bằng một số cơ chế khác nhau [10]. Thứ nhất, dịch chiết *T. ornata* có các thành phần có khả năng liên kết với enzyme  $\alpha$ -glucosidase và làm thay đổi cấu hình của enzyme; sự thay đổi này làm giảm hoạt độ của enzyme. Thứ hai, thành phần trong dịch chiết có thể gây ra quá trình biến tính bất thuận nghịch của enzyme và hoạt độ của chúng. Thứ ba, thành phần trong dịch chiết rong biển có thể liên kết với sản phẩm trung gian (enzyme-cơ chất) mà không phải liên kết với enzyme ở dạng tự do; dẫn đến sự thay đổi hằng số cân bằng của phản ứng.



**Hình 6. Kiểu ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của dịch chiết từ rong *T.ornata***



#### IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu hiện tại cho thấy loài rong đỏ *T. ornata* có hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase cao nhất trong số các loài rong nghiên cứu. Nghiên cứu đã xác định được điều kiện chiết thích hợp để thu nhận dịch chiết có hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase từ rong *T. ornata*: dung môi chiết là nước, nhiệt độ chiết là 90°C, thời gian chiết là 75 phút, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml) là 1/40. Dịch chiết rong *T. ornata* ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase theo kiểu hỗn hợp (mixed inhibition mode) với giá trị  $K_i$  là 0,89 mg/ml. Như vậy, loài rong *T. ornata* thu hoạch tại vùng biển Khánh Hòa có tiềm năng rất lớn sử dụng trong ngăn ngừa và điều trị bệnh tiểu đường.

Dựa trên kết quả nghiên cứu hiện tại, những nghiên cứu tiếp theo cần thực hiện các nội dung sau: (1) nghiên cứu tinh sạch và xác định cấu trúc các hợp chất có khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase từ rong *T. ornata* bằng các kỹ thuật sắc ký và phổ, (2) thử nghiệm hoạt tính ngăn chặn bệnh tiểu đường của dịch chiết rong *T. ornata* trên mô hình động vật.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.05-2016.73 và đề tài sinh viên nghiên cứu khoa học trường Đại học Nha Trang (mã số: SV2015-13-04).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

##### Tiếng Việt

1. Nguyễn Thị Thanh Mai, Phan Nguyễn Hữu Trọng, Nguyễn Xuân Hải, Nguyễn Trung Nhân, 2011. Hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase và thành phần hóa học của cây huyết rồng hoa nhỏ, *Satholobus parviflorus* (Roxb.). Tạp chí Khoa học và Phát triển Khoa học & Công nghệ, 14, 43-49.
2. Đái Thị Xuân Trang, Phạm Thị Lan Anh, Trần Thanh Mến, Bùi Tấn Anh, 2012. Khảo sát khả năng điều trị bệnh tiểu đường của cao chiết lá ổi (*Psidium guajava* L.). Tạp chí Khoa học – Trường Đại học Cần Thơ, 22b, 163-171.

##### Tiếng Anh

3. Cuong, D. X., Boi, V. N., Van, T. T. T., 2016. Effect of storage time on phlorotannin content and antioxidant activity of six Sargassum species from Nhatrang Bay, Vietnam. Journal of Applied Phycology, 28, 567-572.
4. Dang, D. H., Hoang, T. M. H., 2004. Nutritional analysis of Vietnamese seaweeds for food and medicine. Biofactors, 22, 323-325.
5. Hwang, P. A., Hung, Y. L., Tsai, Y. K., Chien, S. Y., Kong, Z. L., 2015. The brown seaweed *Sargassum hemiphyllum* exhibits  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity and enhances insulin release in vitro. Cytotechnology, 67, 653-660.
6. Kellogg, J., Grace, M. H., Lila, M. A., 2014. Phlorotannins from Alaskan seaweed inhibit carbolytic enzyme activity. Marine Drugs, 12, 5277-5294.
7. Kim, K. T., Rioux, L. E., Turgeon, S. L., 2014. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differ-

entially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, 98, 27-33.

8. Kim, K. Y., Nam, K. A., Kurihara, H., Kim, S. M., 2008. Potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry*, 69, 2820-2825.

9. Kim, K. Y., Nguyen, T. H., Kurihara, H., Kim, S. M., 2010.  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activity of Bromophenol Purified from the Red Alga *Polyopes lancifolia*. *Journal of Food Science*, 75, H145-H150.

10. Li, B., Huang, Y., Paskewitz, S. M., 2006. Hen egg white lysozyme as an inhibitor of mushroom tyrosinase. *FEBS Letters*, 580, 1877-1882.

11. Lordan, S., Smyth, T. J., Soler-Vila, A., Stanton, C., Ross, R. P., 2013. The  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry*, 141, 2170-2176.

12. Thinh, P. D., Menshova, R. V., Ermakova, S. P., Anastyuk, S. D., Ly, B. M., Zvyagintseva, T. N. (2013). Structural characteristics and anticancer activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum mcclurei*. *Marine Drugs*, 2013, 11, 1456-1476.

13. Zhang, J., Tiller, C., Shen, J., Wang, C., Girouard, G. S., Dennis, D., Barrow, C.J., Miao, M., Ewart, HS., 2007. Antidiabetic properties of polysaccharide-and polyphenolic-enriched fractions from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 85, 1116-1123.