

# NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG ENDO- $\beta$ -1,4-GLUCANASE CHIẾT XUẤT FUCOIDAN TỪ *Sargassum* sp. VÀ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH SINH HỌC

Nguyễn Thị Minh Nga<sup>1</sup>, Nguyễn Trâm Anh<sup>2</sup>, Võ Thị Hồng Ngân<sup>2</sup>, Phan Thị Thúy Hằng<sup>3</sup>,  
Đặng Thị Thanh Hà<sup>4</sup>, Trần Thúy Lan<sup>1</sup>, Trương Thị Phương Lan<sup>5</sup>, Nguyễn Đức Chung<sup>2</sup>, Nguyễn Đức Huy<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

<sup>2</sup>Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

<sup>4</sup>Trường Đại học Tây Nguyên

<sup>5</sup>Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

## TÓM TẮT

Fucoidan là một polysaccharide sunfat có ở tảo được ứng dụng trong các ngành công nghiệp dược phẩm, thực phẩm và mỹ phẩm. Quá trình chiết xuất các hoạt chất sinh học từ tảo bằng enzyme được chứng minh hiệu quả vì chúng làm suy giảm thành tế bào mà không ảnh hưởng đến các thành phần bên trong. Nghiên cứu này đã xác định điều kiện thủy phân tối ưu của rong mơ *Sargassum* sp. bằng endo- $\beta$ -1,4-glucanase để thu nhận fucoidan. *Sargassum* sp. xử lý với endo- $\beta$ -1,4-glucanase ở tỷ lệ 1/25 (w/v) cho lượng fucoidan thu được lớn nhất tương ứng 0,0026g. Khảo sát điều kiện chiết suất cho thấy fucoidan thu được cao nhất ở điều kiện nhiệt độ 50°C, thời gian chiết suất 24 giờ. Hiệu suất chiết fucoidan bằng endo- $\beta$ -1,4-glucanase cao gấp 2,8 lần so với phương pháp hóa học sử dụng HCl 0,1 M. Fucoidan thu được có khả năng ức chế vi khuẩn *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*. Kết quả nghiên cứu này là tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về tách chiết fucoidan từ rong mơ và các loại rong biển khác sử dụng enzyme để thủy phân, từ đó ứng dụng trong các ngành thực phẩm, dược phẩm.

*Từ khóa:* Chiết xuất dựa trên enzyme, endo- $\beta$ -1,4-glucanase, fucoidan, kháng khuẩn, *Sargassum*.

## MỞ ĐẦU

Rong mơ *Sargassum* là loại rong giàu các chất có hoạt tính sinh học, thành phần chính của rong mơ là các polysaccharide (cellulose, alginate, laminaran, fucoidan), ngoài ra còn có mannitol, gibberellin, cytokinin,... và nhiều loại vitamin (Vũ Ngọc Bội *et al.*, 2015). Fucoidan là một polysaccharide sunfat có trong thành tế bào của rong mơ *Sargassum* với nhiều công dụng như chống đông máu, kháng vi-rút, chống ung thư, chống viêm và chống oxy hóa (Hanjabam *et al.*, 2019; Alboofetileh *et al.*, 2019; Rhein-Knudsen *et al.*, 2023). Fucoidan có thể được chiết xuất từ rong biển bằng nhiều quy trình và các giai đoạn khác nhau bằng cách sử dụng các phương pháp hóa học, vật lý và enzyme nhưng vẫn giữ được các đặc tính sinh học tự nhiên (Suprunchuk, 2019).

Chiết xuất dựa trên enzyme (EAE) là một phương pháp xanh sử dụng các enzyme thủy phân tế bào như protease, cellulase, hemicellulase,... (Heo *et al.*, 2005). Chiết xuất fucoidan từ rong biển bằng enzyme có hiệu quả vì phá vỡ thành tế bào mà không ảnh hưởng đến các thành phần bên trong rong biển. Quá trình chiết xuất fucoidan bằng phương pháp EAE phụ thuộc vào loại enzyme sử dụng thích hợp, điều kiện chiết xuất (nhiệt độ, pH) và nguyên liệu sử dụng (Rhein-Knudsen *et al.*, 2023; Adadi *et al.*, 2018). Nghiên cứu của Rhein-Knudsen và đồng tác giả (2023) chứng minh EAE giảm thời gian chiết, nâng cao hiệu quả thu hồi, duy trì hoạt tính sinh học của fucoidan và giảm thiểu sử dụng dung môi hữu cơ (Rhein-Knudsen *et al.*, 2023). Vì vậy, EAE hiện được nghiên cứu sử dụng trong chiết xuất các hoạt chất sinh học nói chung và fucoidan từ tảo biển nói riêng.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Rong mơ sử dụng cho thí nghiệm được thu thập tại các vùng biển Khánh Hòa của Việt Nam vào tháng 7/2023. Mẫu rong mơ sau khi thu về được rửa sạch và loại bỏ tạp chất, sau đó đem sấy khô ở 55-60°C đến khối lượng không đổi thì tiến hành xay nhỏ bằng máy xay sinh tố, phần bột rong được bảo quản ở ống falcon trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu.

Endo- $\beta$ -1,4-glucanase được sản xuất từ chủng tái tổ hợp *Pichia pastoris* trên môi trường YP (Huy *et al.*, 2016).

### Xác định hoạt tính enzyme

Hoạt độ endo- $\beta$ -1,4-glucanase tái tổ hợp được xác định bằng phản ứng với cơ chất carboxymethyl cellulose và phát hiện sản phẩm thủy phân bằng đo mật độ hấp phụ ở bước sóng 540 nm sử dụng thuốc thử DNS

(Miller, 1972). Đường chuẩn được xây dựng sử dụng glucose tinh khiết và với phương trình tuyến tính  $y = 2.8986 - 0,0574x$  ( $R^2 = 0.9873$ ), trong đó  $y$  là độ hấp phụ (OD) ở bước sóng 540 nm,  $x$  là nồng độ glucose (mg/mL). Một đơn vị enzyme được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết nhằm giải phóng 1  $\mu\text{mol}$  đường khử ở điều kiện phản ứng.

### Chiết xuất fucoidan bằng enzyme

Quá trình tách chiết fucoidan dựa theo quy trình tách chiết của Nguyễn Thị Thuận và đồng tác giả (2020) (Nguyen *et al.*, 2020). Nguyên liệu bột rong mơ cho vào ống falcon bổ sung dd HCl 0,1M hoặc dung dịch enzyme với tỉ lệ cân khảo sát. Hỗn hợp được lắc đều ở nhiệt độ 40°C trong 24 giờ. Tiến hành ly tâm trong 5 phút ở 10.000 vòng/phút. 500  $\mu\text{L}$  dịch nổi được thu nhận và bổ sung thêm 200  $\mu\text{L}$  CaCl<sub>2</sub> ly tâm 15 phút ở 10.000 vòng/phút để loại bỏ kết tủa alginate. Bổ sung 700  $\mu\text{L}$  ethanol 72°, ly tâm 15 phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút, loại bỏ phần dịch và sấy khô kết tủa để xác định khối lượng fucoidan.

### Khảo sát ảnh hưởng điều kiện phản ứng

Tỷ lệ nguyên liệu: Enzyme được tiến hành khảo sát trong ống falcon 10 mL chứa 0,05 g bột rong mơ và enzyme. Thêm enzyme vào với tỉ lệ rong/enzyme khảo sát lần lượt là 1/20; 1/25; 1/30; 1/35; 1/40 (lượng enzyme tương ứng là 1 mL; 1,25 mL; 1,5 mL; 1,75 mL và 2 mL). Hỗn hợp được lắc đều ở nhiệt độ 40°C trong 24 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được đun sôi trong 5 phút để bất hoạt enzyme và tiến hành ly tâm trong 5 phút ở 10.000 vòng/phút. 500  $\mu\text{L}$  dịch nổi được thu nhận và bổ sung thêm 200  $\mu\text{L}$  CaCl<sub>2</sub> ly tâm 15 phút ở 10.000 vòng/phút để loại bỏ kết tủa alginate. Thu dịch nổi, bổ sung 700  $\mu\text{L}$  ethanol 72°, ly tâm 15 phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút, loại bỏ phần dịch và sấy khô kết tủa để xác định khối lượng fucoidan.

Tỷ lệ nguyên liệu: Enzyme tối ưu ở thí nghiệm trên được chọn để tiếp tục khảo sát nhiệt độ phản ứng. Ống falcon chứa 0,05 g bột rong mơ và enzyme được lắc đều ở nhiệt độ ở 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C trong 24 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được đun sôi trong 5 phút để bất hoạt enzyme và tiến hành ly tâm trong 5 phút ở 10.000 vòng/phút. 500  $\mu\text{L}$  dịch nổi được thu nhận và bổ sung thêm 200  $\mu\text{L}$  CaCl<sub>2</sub> ly tâm 15 phút ở 10.000 vòng/phút để loại bỏ kết tủa alginate. Thu dịch nổi, bổ sung 700  $\mu\text{L}$  ethanol 72°, ly tâm 15 phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút, loại bỏ phần dịch và sấy khô kết tủa để xác định khối lượng fucoidan.

Ống falcon chứa 0,05 g bột rong mơ và enzyme được lắc đều ở nhiệt độ tối ưu ở trên trong các khoảng thời gian 12, 18, 24, 30 và 36 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được đun sôi trong 5 phút để bất hoạt enzyme và tiến hành ly tâm trong 5 phút ở 10.000 vòng/phút. 500  $\mu\text{L}$  dịch nổi được thu nhận và bổ sung thêm 200  $\mu\text{L}$  CaCl<sub>2</sub> ly tâm 15 phút ở 10.000 vòng/phút để loại bỏ kết tủa alginate. Thu dịch nổi, bổ sung 700  $\mu\text{L}$  ethanol 72°, ly tâm 15 phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút, loại bỏ phần dịch và sấy khô kết tủa để xác định khối lượng fucoidan.

### Chiết xuất fucoidan bằng acid

Quá trình tách chiết fucoidan bằng dung dịch HCl 0.1M dựa theo quy trình tách chiết của Nguyễn Thị Thuận và đồng tác giả (2020) (Nguyen *et al.*, 2020) với một số thay đổi. Ống falcon chứa 0,05 g bột rong mơ, bổ sung HCl 0,1M với tỉ lệ rong mơ/HCl (0,1M) là 1/20. Hỗn hợp được lắc đều ở nhiệt độ 40°C trong 24 giờ. Tiến hành ly tâm trong 5 phút ở 10.000 vòng/phút. 500  $\mu\text{L}$  dịch nổi được thu nhận và bổ sung thêm 200  $\mu\text{L}$  CaCl<sub>2</sub> ly tâm 15 phút ở 10.000 vòng/phút để loại bỏ kết tủa alginate. Bổ sung 700  $\mu\text{L}$  ethanol 72°, ly tâm 15 phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút, loại bỏ phần dịch và sấy khô kết tủa để xác định khối lượng fucoidan.

### Khảo sát hoạt tính sinh học của fucoidan

Hoạt tính kháng khuẩn của fucoidan được xác định theo nguyên lý của phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu. Phương pháp được mô tả bởi Ayrapetyan và đồng tác giả (2021) (Ayrapetyan *et al.*, 2021) và với một số thay đổi. Vi sinh vật được nuôi lỏng qua đêm trong môi trường LB ở 37°C. Các mẫu fucoidan được hòa tan trong nước đến nồng độ cuối cùng là 10, 20, 30, 40, 50 mg/mL. 10  $\mu\text{L}$  dung dịch chứa vi khuẩn ở mật độ khoảng  $10^3$  CFU/mL được trộn với 90  $\mu\text{L}$  dung dịch fucoidan và ủ trong 4 giờ ở 37°C. Sau đó, 100  $\mu\text{L}$  dung dịch được trải đều trên đĩa petri chứa môi trường LB, ủ ở 37°C trong 16 giờ. Số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa được đếm và so sánh giữa các nghiệm thức khác nhau.

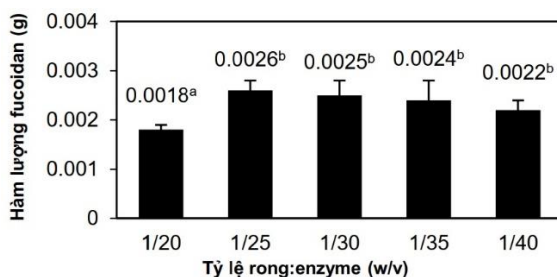
### Phương pháp xử lý số liệu

Phần mềm Microsoft Office Excel được sử dụng để xử lý số liệu thô thu được từ các thí nghiệm và sử dụng phép phân tích phương sai (ANOVA) kết hợp so sánh Duncan test trong SPSS nhằm xác định sự sai khác giữa các trung bình của các công thức thí nghiệm.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Xác định tỷ lệ nguyên liệu rong: enzyme

Các mẫu rong mơ *Sargassum* sp. xử lý với endo- $\beta$ -1,4-glucanase ở nhiệt độ 40°C trong 24 giờ với các tỉ lệ khác nhau. Khối lượng fucoidan thu được từ các mẫu nghiệm thức được thể hiện trong Hình 1.



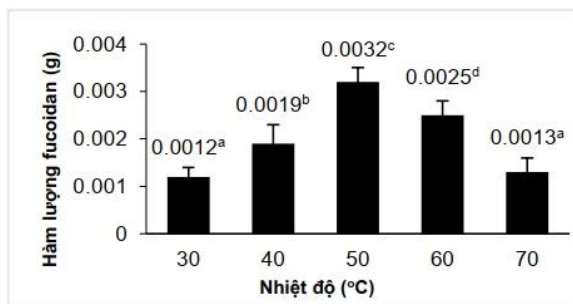
Hình 1. Hàm lượng fucoidan thu nhận với tỷ lệ nguyên liệu rong/enzyme khác nhau

Kết quả ở Hình 1 cho thấy, mẫu rong mơ *Sargassum* sp. xử lý với endo- $\beta$ -1,4-glucanase ở tỷ lệ 1/20 (w/v) có lượng fucoidan thu được là 0,0018 g và lượng fucoidan thu hồi tăng lên 0,0026 g khi tỷ lệ nguyên liệu rong mơ và enzyme đạt 1/25 (w/v). Như vậy, khi tăng tỷ lệ nguyên liệu rong mơ và endo- $\beta$ -1,4-glucanase thì hàm lượng fucoidan thu được cũng tăng theo. Tuy nhiên, khi tăng tỷ lệ nguyên liệu rong mơ và endo- $\beta$ -1,4-glucanase sử dụng lên 1/30 (w/v), 1/35 (w/v) và 1/40 (w/v) thì hàm lượng fucoidan thu được lại giảm chỉ đạt giá trị tương ứng là 0,0025 g; 0,0024 g và 0,0022 g. Có thể thấy khi tỷ lệ nguyên liệu rong mơ và enzyme đạt đến ngưỡng giới hạn thì dù có tăng tỷ lệ lên hàm lượng fucoidan thu được cũng không thay đổi và cũng không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Do đó, để tiết kiệm enzyme và chiết xuất kinh tế hơn thì chọn tỷ lệ nguyên liệu rong mơ và enzyme là 1/25 cho các khảo sát tiếp theo.

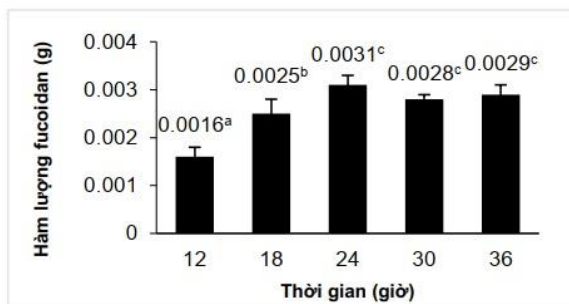
Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Cao Thị Thúy Hằng và đồng tác giả (2022) khi tiến hành khảo sát tỷ lệ dịch chiết trên rong nguyên liệu đến hiệu suất của fucoidan từ rong nâu *S. mcclurei*. Kết quả tỷ lệ rong nguyên liệu trên dịch chiết là 1/25 thì hàm lượng fucoidan thu được đạt 4,22% và không thay đổi nhiều cho đến khi tăng tỷ lệ dịch chiết lên 1/30. Ngoài ra, nghiên cứu của Võ Phan Tuấn Vũ và đồng tác giả (2023) cũng đã khảo sát các tỉ lệ chiết 1/5; 1/10; 1/15; 1/20 và 1/25 dùng để chiết *S. oligocystum* bằng Viscoenzyme L cho thấy tỉ lệ 1/20 và 1/25 (w/v) không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê và cho hiệu suất thu hồi lipid là  $57.34 \pm 3.44\%$  và  $62.14 \pm 2.52\%$ .

### Ảnh hưởng điều kiện lên chiết xuất fucoidan

Mỗi loại enzyme có một khoảng nhiệt độ tối ưu khác nhau vì vậy để xác định được khoảng nhiệt độ phù hợp cho quá trình ủ rong mơ nhằm thu được khối lượng fucoidan cao nhất, thí nghiệm được thực hiện ở các mức nhiệt độ là 30°C, 40°C, 50°C, 60°C và 70°C trong 24 giờ. Kết quả khối lượng fucoidan thu được từ các mẫu nghiệm thức được thể hiện trong Hình 2.



Hình 2. Biến thiên khối lượng fucoidan thu nhận ở nhiệt độ chiết xuất khác nhau



Hình 3. Biến thiên khối lượng fucoidan thu nhận với thời gian chiết xuất khác nhau

Khi nhiệt độ tăng từ 30°C lên đến 50°C, lượng fucoidan thu hồi được tăng đáng kể từ 0,0012 g lên 0,0032 g và đạt ở mức cao nhất ở nhiệt độ 50°C. Khi hỗn hợp phản ứng tăng lên 60°C và 70°C thì lượng fucoidan thu được giảm lần lượt là 0,0025 g và 0,0013 g. Nhiệt độ là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thu hồi fucoidan vì mỗi enzyme đều có nhiệt độ tối ưu riêng, khi thay đổi nhiệt độ tối ưu thì sẽ làm giảm khả năng hoạt động của enzyme, thậm chí có thể làm biến tính enzyme. Endo- $\beta$ -1,4-glucanase tái tổ hợp được sử dụng trong nghiên cứu này có nhiệt độ hoạt động tối ưu trong khoảng 50-60°C (Huy *et al.*, 2016), do đó đây cũng là nhiệt độ thích hợp cho việc chiết fucoidan từ rong mơ sử dụng endo- $\beta$ -1,4-glucanase. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Hoàng Thị Ngọc Nhon và Lê Thị Thanh Thủy (2020) khi tiến hành nghiên cứu chiết rong *Ceratophyllum submersum* bằng cellulase ở 50°C, lượng fucoidan thu được là 1022,22  $\mu$ g/gck. Theo nghiên cứu của Trần Thị Ngọc Mai (2020) ở nhiệt độ tối ưu 50°C tỉ lệ thu hồi cao chiết lần lượt là 7,5% và 8% cho rong nâu *S. feldmannii* và *S. polycystum*, khi sử dụng dung môi chiết là có bổ sung Viscozyme L. Do vậy, sẽ lựa chọn nhiệt độ 50°C để làm thông số cố định cho các thí nghiệm tiếp theo.

**Xác định thời gian ủ thích hợp**

Để xác định hàm lượng fucoidan thu được theo thời gian thì hỗn hợp phản ứng được ủ trong thời gian 12 giờ, 18 giờ, 24 giờ, 30 giờ và 36 giờ. Hỗn hợp thí nghiệm tiến hành với các điều kiện cố định tương ứng tỷ lệ chiết giữa nguyên liệu rong mơ/enzyme là 1/25 (w/v) và nhiệt độ của mẫu chứa endo-β-1,4-glycanase là 50°C. Kết quả thu hồi fucoidan được thể hiện ở Hình 3.

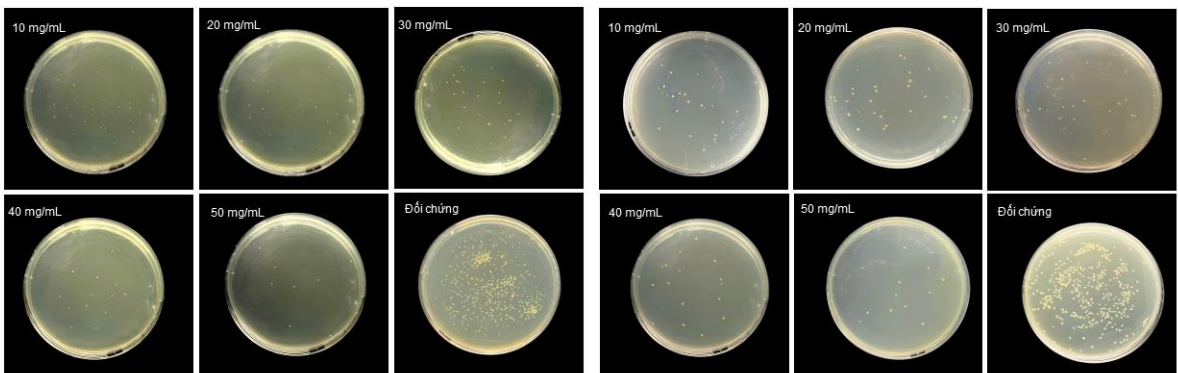
Kết quả ở Hình 3 cho thấy, lượng fucoidan thu được tăng dần khi tăng thời gian ủ 12 giờ, 18 giờ và 24 giờ với lượng fucoidan thu được tương ứng là 0,0016 g; 0,0025 g và 0,0031 g. Tuy nhiên, khi tăng thời gian ủ lên 30 giờ và 36 giờ lượng fucoidan thu được lại giảm dần còn 0,0028 g và 0,0029 g. Kết quả này cho thấy, thời gian ủ ở 24 giờ thì hàm lượng fucoidan thu được cao nhất có hàm lượng 0,0031 g. Endo-β-1,4-glycanase phá vỡ thành tế bào của rong mơ, tăng sự giải phóng các hoạt chất sinh học bên trong. Khi thời gian xúc tác quá dài, cơ chất đã được phân giải đến cực đại, thì sản phẩm thu được hầu như không thay đổi. Do khi thời gian ủ quá dài thì hoạt tính enzyme có thể bị ảnh hưởng bởi chính thành phần các chất có trong dịch chiết. Không những thế còn làm tăng khả năng trích ly các hợp chất không mong muốn, tiêu tốn năng lượng, thời gian không cần thiết. Kết quả nghiên cứu phù hợp với nghiên cứu của Cao Thị Thuý Hằng và đồng tác giả (2022) khi khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất của fucoidan trên rong nâu *S. mcclurei* bằng Viscozyme. Kết quả sau 24 giờ thì hàm lượng chiết fucoidan đạt cao nhất với hàm lượng là 4,31%.

**So sánh hiệu quả chiết fucoidan của phương pháp enzyme với phương pháp hóa học**

Quy trình chiết xuất fucoidan sử dụng HCl (0,1 M) để tách chiết fucoidan từ rong *Sargassum* sp. dựa theo mô tả của Nguyễn Thị Thuận và đồng tác giả (2020) với một số thay đổi, kết quả thu hồi được 2,2% fucoidan thô. Với phương pháp tách chiết bằng enzyme với các điều kiện đã tối ưu tỷ lệ rong: enzyme là 1/25, nhiệt độ 50°C, thời gian chiết ở 24 giờ lượng fucoidan thu nhận được đạt 0,0031 g tương ứng 6,2%. Kết quả này cho thấy phương pháp tách chiết bằng enzyme có hiệu quả hơn gấp 2,8 lần so với phương pháp hóa học. Kết quả này cũng khá tương đồng với nghiên cứu của Phạm Đức Thịnh và đồng tác giả (2013) đã sử dụng HCl để chiết fucoidan từ rong *S. mcclurei* với hàm lượng fucoidan thô là 2,7%. Kết quả này cao hơn so với hàm lượng fucoidan thu được từ rong mơ *S. glaucescens*, *S. horneri* và *L. japonica* lần lượt là 4,20%, 4,80% và 4,64% bằng phương pháp chiết bằng nước nóng (Wang & Chen, 2016).

**Hoạt tính kháng khuẩn dịch chiết fucoidan**

Hoạt tính kháng khuẩn đã được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc có trên đĩa peptri ở 5 mức nồng độ của fucoidan là 10 mg/mL; 20 mg/mL; 30 mg/mL; 40 mg/mL và 50 mg/mL, kết quả được thể hiện trong Hình 4; Hình 5.



Hình 4. Khả năng kháng *E. coli* của chiết xuất fucoidan

Hình 5. Khả năng kháng *S. aureus* của chiết xuất fucoidan

Kết quả ở Hình 4 và 5 cho thấy fucoidan có khả năng đối kháng với hai dòng vi khuẩn là *E. coli* thuộc Gram âm và *S. aureus* thuộc Gram dương. Tăng nồng độ fucoidan cũng đồng thời tăng khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn thể hiện qua sự giảm của số khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa nuôi cấy. Đối với *E. coli* là vi khuẩn Gram âm thì số khuẩn lạc phát triển trung bình từ mẫu kháng ở nồng độ 10 mg/mL là 39 khuẩn lạc/đĩa và khi tăng nồng độ lên 20 mg/mL thì số khuẩn lạc giảm xuống còn 32 khuẩn lạc /đĩa. Khi nồng độ fucoidan tăng lên 30 mg/mL, 40 mg/mL và 50 mg/mL thì số khuẩn lạc trung bình xuất hiện trên đĩa peptri lần lượt là 25; 21 và 13 khuẩn lạc/đĩa. Kết quả này chứng minh hiệu quả ức chế của fucoidan sau tách chiết lên sự sinh trưởng và phát triển *E. coli*. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận khi thử nghiệm hiệu quả đối kháng của fucoidan trên vi khuẩn Gram dương *S. aureus* cho thấy có sự tương quan giữa nồng độ fucoidan và khả năng ức chế vi khuẩn. Số khuẩn lạc trung bình phát triển khi được xử lý ở nồng độ 10 mg/mL là 33 khuẩn lạc/đĩa và giảm dần về 27; 23; 14 và 8 khuẩn lạc/đĩa sau khi được xử lý với dung dịch chứa fucoidan ở nồng độ theo tuần tự 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL. Tương đồng với kết quả đạt được ở nghiên cứu này, Marudhupandi và Kumar (2013) trong nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của fucoidan từ *S. wightii* cho thấy fucoidan ức chế tốt *E. coli* và

*Salmonella* (Marudhupandi & Kumar, 2013). Chotigeat và đồng tác giả (2004) đã chiết xuất fucoidan thô từ *S. polycystum* và sử dụng để kiểm soát nhóm vi sinh vật gây hại bao gồm *Vibrio harveyi*, *S. aureus* và *E. coli* (Chotigeat *et al.*, 2004). Fucoidan tách chiết từ *Fucus vesiculosus* cũng cho thấy khả năng ức chế tốt các dòng vi khuẩn Gram âm là *E. coli* và vi khuẩn Gram dương là *Bacillus subtilis* và *Listeria innocua* (Cabral *et al.*, 2021).

## KẾT LUẬN

Endo- $\beta$ -1,4-glucanase tăng hiệu quả chiết xuất fucoidan từ rong mơ *Sargassum* sp. với tỷ lệ rong: enzyme là 1/25 (w/v), nhiệt độ chiết xuất là 50°C, thời gian chiết xuất là 24 giờ. Ở điều kiện này, hàm lượng fucoidan thu nhận được bằng enzyme là 6,2% cao hơn khi tách chiết bằng phương pháp hóa học là 2,2%. Kết quả cho thấy fucoidan thu nhận được có khả năng kháng khuẩn đối với cả hai loại vi khuẩn Gram âm (*E. coli*) và Gram dương (*S. aureus*) với nồng độ ức chế tối thiểu là 10 mg/mL.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adadi P, Barakova NV, Krivoschapkina EF (2018). Selected methods of extracting carotenoids, characterization and health concerns: a review. *J Agric Food Chem*, 66(24): 5925-5947.
- Alboofetileh M, Rezaei M, Tabarsa M (2019). Enzyme-assisted extraction of *Nizamuddinina zanardinii* for the recovery of sulfated polysaccharides with anticancer and immune-enhancing activities. *J Appl Phycol*, 31: 1391-1402.
- Ayrapetyan ON, Obluchinskaya ED, Zhurishkina EV, Skorik YA, Lebedev DV, Kulminskaya AA, Lapina IM (2021). Antibacterial properties of fucoidans from the brown algae *Fucus vesiculosus* of the barents sea. *Biology*, 10(67): 1-17.
- Cabral EM, Mondala JRM, Oliveira M, Przyborska J, Fitzpatrick S, Rai DK, Sivagnanam SP, Garcia-Vaquero M, O'Shea D, Devereux M, Tiwari B K, Curtin J (2021). Influence of molecular weight fractionation on the antimicrobial and anticancer properties of a fucoidan rich-extract from the macroalgae *Fucus vesiculosus*. *Int J Biol Macromol*, 186: 994-1002.
- Vũ Ngọc Bội, Nguyễn Thị Mỹ Trang, Đặng Xuân Cường (2015). Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian chần tiền sấy đến hàm lượng, hoạt tính sinh học của dịch chiết từ rong mơ *Sargassum polycystum* Ninh Thuận. *Tạp chí Khoa Học - Công nghệ Thủy sản*, 3: 9-16.
- Cao Thị Thủy Hằng, Trần Thị Thanh Vân, Nguyễn Thị Khánh Vy, Nguyễn Thị Thuận, Trần Nguyễn Hà Vy, Võ Mai Như Hiếu, Phạm Đức Thịnh (2022). Khảo sát điều kiện hoạt động của Viscozyme trên rong nâu *Sargassum mcclurei* để thu nhận fucoidan. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 64(8): 22-26.
- Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K, Phongdara A (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, 233 (1-4): 23-30.
- Hanjabam MD, Kumar A, Tejpal CS, Krishnamoorthy E, Kishore P, Ashok Kumar K (2019). Isolation of crude fucoidan from *Sargassum wightii* using conventional and ultra-sonication extraction methods. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 20: 100200.
- Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technol*, 96(14): 1613-1623.
- Hoàng Thị Ngọc Nhơn, Lê Thị Thanh Thủy (2020). Nghiên cứu ảnh hưởng của enzyme cellulase và vi sóng đến trích ly fucoidan từ rong *Ceratophyllum submersum*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng*, 18(3): 5-9.
- Huy ND, Nguyen CL, Park HS, Loc NH, Choi MS, Kim DH, Seo JW, Park SM (2016). Characterization of a novel manganese dependent endoglucanase belongs in GH family 5 from *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biosci Bioeng*, 121(2): 154-159.
- Marudhupandi T, Kumar TTA (2013). Antibacterial effect of fucoidan from *Sargassum wightii* against the chosen human bacterial pathogens. *Inter Cur Pharma J*, 2(10):156-158.
- Trần Thị Ngọc Mai (2020). So sánh quá trình thu nhận cao chiết rong nâu *Sargassum* bằng các phương pháp chiết khác nhau và đánh giá khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 62(6): 34 - 38.
- Nguyen TT, Mikkelsen MD, Tran VHN, Trang VTD, Rhein-Knudsen N, Holck J, Meyer AS (2020). Enzyme-assisted fucoidan extraction from brown macroalgae *Fucus distichus* subsp. *evanescens* and *Saccharina latissima*. *Marine drugs*, 18(6): 296.
- Rhein-Knudsen N, Reyes-Weiss D, Horn SJ (2023). Extraction of high purity fucoidans from brown seaweeds using cellulases and alginate lyases. *Int J Biol Macromol*, 229: 199-209.
- Suprunchuk VE (2019). Low-molecular-weight fucoidan: Chemical modification, synthesis of its oligomeric fragments and mimetics. *In Carbohydrate Research*, 485: 107806.
- Thinh PD, Menshova RV, Ermakova SP, Anastuyuk SD, Ly BM, Zvyagintseva TN (2013). Structural characteristics and anticancer activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum mcclurei*. *Marine Drugs*, 11(5): 1456-1476.
- Võ Phan Tuấn Vũ, Trần Thị Yến Nhi, Nguyễn Ngọc Thư, Thành Hoàng Phi Yến, Hoàng Thị Ngọc Nhơn (2023). So sánh hiệu quả chiết xuất lipid từ rong *Sargassum oligocystum* bằng phương pháp enzyme và siêu âm. *Tạp chí Khoa học công nghệ và thực phẩm*, 23(2): 150-157.
- Wang CY, Chen YC (2016). Extraction and characterization of fucoidan from six brown macroalgae. *Journal of Marine Science and Technology*, 24(2): 319- 328.

## APPLICATION OF ENDO- $\beta$ -1,4-GLUCANASE FOR FUCOIDAN EXTRACTION FROM *Sargassum* sp. AND EVALUATION ITS BIOACTIVITY

Nguyen Thi Minh Nga<sup>1</sup>, Nguyen Tram Anh<sup>2</sup>, Vo Thi Hong Ngan<sup>2</sup>, Phan Thi Thuy Hang<sup>3</sup>, Dang Thi Thanh Ha<sup>4</sup>, Tran Thuy Lan<sup>1</sup>, Truong Thi Phuong Lan<sup>5</sup>, Nguyen Duc Chung<sup>2</sup>, Nguyen Duc Huy<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Hue University*

<sup>2</sup>*University of Agriculture and Forestry, Hue University*

<sup>3</sup>*University of Sciences, Hue University*

<sup>4</sup>*Tay Nguyen University*

<sup>5</sup>*University of Medicine and Pharmacy, Hue University*

### SUMMARY

Fucoidan is a sulfated polysaccharide found in algae which is widely applied in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries. The extraction process of bioactive compounds from algae by enzyme-assisted has been demonstrated to have high effective because it hydrolyzed the cell walls with less effect on biological substances. This study investigated the effect on using endo- $\beta$ -1,4-glucanase to extract fuoidan from brown algae *Sargassum* sp.. The treatment at a ratio of 1/25 (w/v) of biomass:enzyme yielded the highest fucoidan, reaching 0.0026g. The optimal conditions for the extraction was temperature of 50°C and incubation time of 24 hours. The extraction efficiency of fucoidan by endo- $\beta$ -1,4-glucanase was 2.8 times higher than the chemical method using HCl 0.1M. The extracted fucoidan exhibited *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* inhibitory activities. The present results provide helpful information for fucoidan extraction process from *Sargassum* sp. in intergration with enzyme-assisted which are further applicable in food and pharmaceutical industries.

*Keywords:* Enzyme-assisted extraction, endo- $\beta$ -1,4-glucanase, fucoidan, antibacterial, *Sargassum*.

---

\* Author for correspondence: Tel: 916066357; Email: ndhuy@hueuni.edu.vn;