

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG

LÊ XUÂN SƠN

**NGHIÊN CỨU THU NHẬN FUCOIDAN KHỐI LƯỢNG
PHÂN TỬ THẤP TỪ RONG MỎ *SARGASSUM* TẠI NHA
TRANG - KHÁNH HÒA BẰNG PHƯƠNG PHÁP HÓA HỌC**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

KHÁNH HÒA - 2018

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG

LÊ XUÂN SƠN

**NGHIÊN CỨU THU NHẬN FUCOIDAN KHỐI LƯỢNG
PHÂN TỬ THẤP TỪ RONG MƠ *SARGASSUM* TẠI NHA
TRANG - KHÁNH HÒA BẰNG PHƯƠNG PHÁP HÓA HỌC**

Chuyên ngành: Công nghệ chế biến thủy sản

Mã số: 9540105

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- 1. PGS. TS. Vũ Ngọc Bội**
- 2. TS. Nguyễn Duy Nhứt**

KHÁNH HÒA - 2018

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi. Một số kết quả trong luận án này được tài trợ kinh phí từ đề tài cấp tỉnh “*Nghiên cứu qui trình sản xuất fucoidan khối lượng phân tử thấp và ứng dụng trong hỗ trợ điều trị rối loạn chuyển hóa lipid máu*” và đề tài cấp Nhà nước “*Nghiên cứu quy trình công nghệ tạo nguyên liệu hỗ trợ điều trị ung thư từ rong nâu Việt Nam*” Thuộc “Chương trình nghiên cứu khoa học công nghệ trọng điểm quốc gia phát triển công nghiệp hoá dược đến năm 2020” mà tôi là một trong những thành viên thực hiện và đã được Chủ nhiệm đề tài đồng ý cho phép sử dụng một số kết quả trong báo cáo Luận án. Các kết quả, số liệu nêu trong luận án là trung thực, chưa từng được ai công bố trong bất kì công trình nào.

Tác giả luận án

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành Luận án này

Trước hết tôi xin gửi tới Ban Giám hiệu Trường Đại học Nha Trang, Ban Chủ nhiệm Khoa Công nghệ Thực phẩm sự kính trọng, niềm tự hào được học tập và nghiên cứu tại Trường trong những năm qua.

Sự biết ơn sâu sắc nhất tôi xin được giành cho các thầy: PGS. TS. Vũ Ngọc Bội - Trưởng khoa Công nghệ Thực phẩm - Trường Đại học Nha Trang và TS. Nguyễn Duy Nhứt - Giám đốc Trung tâm Ứng dụng Công nghệ - Viện nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và động viên tôi trong suốt quá trình thực hiện Luận án.

Xin cảm ơn: TS. Đặng Xuân Cường - Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, ThS. Nguyễn Hồng Phong - Trưởng phòng Đào tạo - Trường Cao đẳng Nghề Phú Yên, TS. Trần Vĩnh Thiện - Trường Đại học Phú Yên và TS. Đào Trọng Hiếu - Bộ NN &PTNT đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện Luận án.

Xin chân thành cảm ơn: PGS. TS. Ngô Đăng Nghĩa, PGS. TS. Nguyễn Anh Tuấn - Trường Đại học Nha Trang và các thầy cô phản biện đã cho tôi những lời khuyên quý báu để công trình nghiên cứu được hoàn thành có chất lượng.

Đặc biệt xin được ghi nhớ tình cảm, sự giúp đỡ của: Ban Giám hiệu - Trường Cao đẳng nghề Phú Yên, quý thầy cô giáo trong Khoa Công nghệ Thực phẩm - Trường Đại học Nha Trang, Ban lãnh đạo Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, Gia đình và bạn bè thân thiết đã giúp đỡ, chia sẻ cùng tôi trong quá trình nghiên cứu.

MỤC LỤC

MỤC LỤC.....	I
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	V
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	VII
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	IX
TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN.....	XIV
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN.....	4
1.1. GIỚI THIỆU VỀ RONG MƠ	4
1.1.1. Phân loại rong mơ	4
1.1.2. Cấu trúc thành tế bào rong nâu	5
1.2. GIỚI THIỆU VỀ FUCOIDAN	6
1.2.1. Fucoidan tự nhiên.....	6
1.2.2. Fucoidan khối lượng phân tử thấp	10
1.2.3. Phương pháp phân tích đặc tính cấu trúc của fucoidan	11
1.2.4. Hoạt tính sinh học và tiềm năng ứng dụng của fucoidan.....	15
1.3. PHƯƠNG PHÁP THU NHẬN FUCOIDAN KHỐI LƯỢNG PHÂN TỬ THẤP	20
1.3.1. Phương pháp tách chiết fucoidan tự nhiên.....	20
1.3.2. Phương pháp cắt mạch fucoidan	27
1.3.3. Tình hình nghiên cứu fucoidan ở Việt Nam	31
1.3.4. Giới thiệu một số sản phẩm từ fucoidan	32
1.4. KHẢ NĂNG SỬ DỤNG FUCOIDAN TRONG ĐIỀU TRỊ LÀM GIẢM LIPID MÁU ..	34
1.4.1. Hiện tượng tăng lipid máu.....	34
1.4.2. Phương pháp đánh giá chế phẩm có khả năng làm giảm lipid máu ở động vật thí nghiệm.....	36
1.4.3. Khả năng sử dụng fucoidan trong điều trị làm giảm lipid máu	37
CHƯƠNG II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	40
2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU	40
2.1.1. Rong mơ nguyên liệu	40

2.1.2. Động vật thử nghiệm.....	41
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	41
2.2.1. Phương pháp thu và xử lý mẫu	41
2.2.2. Phương pháp xác định hiệu suất chiết.....	41
2.2.3. Tách phân đoạn fucoidan và tính hiệu suất cắt mạch fucoidan.....	42
2.2.4. Các phương pháp phân tích về fucoidan.....	42
2.2.4. Phương pháp xác định vi sinh vật	45
2.2.5. Phương pháp định lượng một số thành phần khác.....	45
2.2.6. Phương pháp bố trí thí nghiệm.....	45
2.3. THIẾT BỊ VÀ HÓA CHẤT DÙNG TRONG NGHIÊN CỨU	61
2.4. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU	62
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	63
3.1. ĐÁNH GIÁ HÀM LƯỢNG FUCOIDAN CÓ TRONG 05 LOÀI RONG MỎ SARGASSUM THU MẪU TẠI KHÁNH HÒA.....	63
3.2. NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT FUCOIDAN TỰ NHIÊN TỪ RONG MỎ S. POLYCYSTUM.....	64
3.2.1. Xác định phương thức chiết fucoidan	64
3.2.2. Xác định tỉ lệ dung môi: nguyên liệu rong.....	66
3.2.3. Xác định pH dung môi chiết	68
3.2.4. Xác định nhiệt độ chiết	69
3.2.5. Xác định thời gian chiết	71
3.3. TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH CHIẾT FUCOIDAN TỪ RONG MỎ S. POLYCYSTUM THEO PHƯƠNG PHÁP BOX-WILSON	73
3.4. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA FUCOIDAN TỰ NHIÊN	78
3.5. ĐỀ XUẤT QUY TRÌNH SẢN XUẤT FUCOIDAN TỰ NHIÊN	78
3.6. NGHIÊN CỨU TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN CẮT MẠCH FUCOIDAN TỰ NHIÊN TẠO THÀNH FUCOIDAN KHỐI LƯỢNG PHÂN TỬ THẤP	81
3.6.1. Xác định nồng độ H ₂ O ₂ /axit ascorbic	81
3.6.3. Xác định thời gian cắt mạch fucoidan.....	85

3.7. TỐI ƯU HÓA CÔNG ĐOẠN CẮT MẠCH FUCOIDAN TỰ NHIÊN THÀNH FUCOIDAN KHỐI LƯỢNG PHÂN TỬ THẤP	87
3.8. ĐÁNH GIÁ SỰ BIẾN ĐỔI CỦA SẢN PHẨM FUCOIDAN KLPTT TỪ RONG MƠ <i>S. POLYCYSTUM</i> THEO THỜI GIAN BẢO QUẢN	91
3.9. ĐỀ XUẤT QUY TRÌNH CẮT MẠCH FUCOIDAN TỰ NHIÊN TẠO THÀNH FUCOIDAN KLPTT	100
3.10. CÁC ĐẶC TÍNH CỦA SẢN PHẨM FUCOIDAN KHỐI LƯỢNG PHÂN TỬ THẤP	102
3.10.1. Thử nghiệm sản xuất sản phẩm F-KLPTT	102
3.10.2. Đặc trưng cấu trúc sản phẩm fucoidan KLPTT	103
3.11. ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA SẢN PHẨM F- KLPTT	116
3.11.1. Đánh giá độc tính cấp của sản phẩm F- KLPTT	116
3.11.2. Đánh giá độc tính bán trường diễn	118
3.12. ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH LÀM GIẢM LIPID MÁU CỦA CÁC PHÂN ĐOẠN F- KLPTT TỪ CÁC LOÀI RONG KHÁC NHAU	123
3.12.1. Đánh giá các chỉ số lipid máu của chuột dùng thử nghiệm	123
3.12.2. Đánh giá hoạt tính làm giảm lipid máu của sản phẩm F- KLPTT	126
3.13. PHÂN TÍCH ĐẶC TÍNH CẤU TRÚC CỦA PHÂN ĐOẠN FUCOIDAN Pol.H10 CÓ HOẠT TÍNH LÀM GIẢM LIPID MÁU	133
3.13.1. Thành phần hóa học của phân đoạn fucoidan Pol.H10 từ rong mơ <i>S. polycystum</i>	133
3.13.1. Đặc trưng cấu trúc của phân đoạn fucoidan Pol.H10 thể hiện qua phổ NMR	133
3.13.3. Đặc trưng cấu trúc phân đoạn fucoidan Pol.H10 thể hiện qua phổ IR	137
3.13.4. Đặc trưng cấu trúc phân đoạn fucoidan Pol.H10 thể hiện qua phổ khối MS ⁺	138
3.14. ĐỀ XUẤT QUY TRÌNH SẢN XUẤT FUCOIDAN KHỐI LƯỢNG PHÂN TỬ THẤP TỪ RONG MƠ <i>S. POLYCYSTUM</i>	140

3.15. SẢN XUẤT THỦ VÀ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG SẢN PHẨM FUCOIDAN KHỐI LƯỢNG PHÂN TỬ THẤP	144
3.15.1. Phân tích chỉ tiêu kim loại nặng và vi sinh của sản phẩm F- KLPTT	144
3.15.2. Sơ bộ tính giá chi phí nguyên vật liệu.....	145
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT KIẾN NGHỊ	147
DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA LUẬN ÁN	149
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	150

Tailieu.vn

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ANOVA	: Analysis Of Variance: Phân tích phương sai
BASO	: Bạch cầu đa nhân ái kiềm
CPC	: Cetyl pyridium chlorid
DF	: Degree of Freedom: Số bậc tự do
F	: Giá trị F (kiểm định Fisher), có độ tin cậy 95%
F- KLPTT	: Fucoidan khối lượng phân tử thấp
GC	: Sắc ký khí (Gas Chromatography)
KLPT	: Khối lượng phân tử
Hb	: Hemoglobin
HDL	: High density lipoprotein
HDL-C	: High density lipoprotein-cholesterol
HL	: Hepatic lipase (lipase gan)
HPLC	: High-performance liquid chromatography (Sắc ký lỏng hiệu năng cao)
IDL	: Intermediate-density lipoprotein
KLPT	: Khối lượng phân tử
LYM	: Bạch cầu Lymphô
LDL	: Low density lipoprotein
LDL-C	: Low density lipoprotein-cholesterol
LDLr	: Receptor LDL
LPL	: Enzyme lipoprotein lipase
MCH	: Số lượng hemoglobin trung bình trong một hồng cầu
MONO	: Mono bào
MCV	: Thể tích hồng cầu trung bình
NEU	: Bạch cầu trung tính
PL	: Phospholipid

PLC	: Số lượng tiểu cầu
Q^2	: Hệ số đánh giá mức độ dự đoán trước kết quả Y của mô hình hồi quy
R^2	: Hệ số xác định: trong 100% sự biến động của biến phụ thuộc Y thì có bao nhiêu % sự biến động là do biến độc lập X ảnh hưởng, còn lại là do sai số ngẫu nhiên
RBC	: Số lượng hồng cầu
Regression	: Sai số do hồi quy
Residual	: Sai số do ngẫu nhiên
SS	: Sum of Square: Tổng bình phương của mức độ (sai lệch) giữa các giá trị quan sát của Y (ký hiệu là Y_i) và giá trị bình quân của chúng
TCVN	: Tiêu chuẩn Việt Nam
TG	: Triglyceride
VKHK	: Vi khuẩn hiếu khí
VLDL	: Very low density lipoprotein
VSV	: Vi sinh vật
WBC	: Số lượng bạch cầu

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.2. Một số phương pháp tách chiết fucoidan	24
Bảng 2.1. Loài rong, thời gian và địa điểm thu mẫu dùng cho nghiên cứu.....	41
Bảng 2.2. Ma trận quy hoạch thực nghiệm và số lượng thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện chiết fucoidan từ rong mơ <i>S. polycystum</i>	54
Bảng 2.3. Ma trận quy hoạch thực nghiệm và số lượng thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện cắt mạch fucoidan tự nhiên tạo thành F- KLPTT.....	58
Bảng 2.4. Kí hiệu các phân đoạn F- KLPTT đánh giá hoạt tính kháng rối loạn lipid máu.....	61
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của phương thức chiết đến hiệu suất chiết fucoidan từ rong mơ <i>S. polycystum</i>	65
Bảng 3.2. Hiệu suất chiết fucoidan ở các điều kiện khác nhau.....	73
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của các biến độc lập đến hiệu suất chiết fucoidan.....	74
Bảng 3.4. Kết quả thực nghiệm kiểm tra kết quả tối ưu	77
Bảng 3.5. Thành phần hóa học của mẫu fucoidan từ <i>S. polycystum</i>	78
Bảng 3.6. Hiệu suất thu nhận F-KLPTT tại các điều kiện khác nhau.....	87
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của các biến độc lập đến hiệu suất cắt mạch F-KLPTT có ý nghĩa	89
Bảng 3.8. Kết quả thực nghiệm kiểm tra kết quả tối ưu công đoạn phân cắt fucoidan tự nhiên thành F- KLPTT.....	91
Bảng 3.9. Khối lượng phân tử và kí hiệu của các phân đoạn F- KLPTT từ 5 loài rong mơ <i>Sargassum</i>	102
Bảng 3.10. Một số vân phổ đặc trưng trong phổ hồng ngoại IR của các mẫu fucoidan	103
Bảng 3.11. Khối lượng chuột các thời điểm trước và sau khi cho uống F- KLPTT	116
Bảng 3.12. Khối lượng nội tạng của chuột sau 7 ngày uống F- KLPTT	116
Bảng 3.13. So sánh các chỉ số huyết học ban đầu của chuột thử nghiệm.....	119

Bảng 3.14. So sánh các chỉ số huyết học ban đầu của chuột thử nghiệm.....	119
Bảng 3.15. So sánh các chỉ số huyết học của chuột thử nghiệm sau 30 ngày.....	120
Bảng 3.16. So sánh các chỉ số huyết học của chuột sau 30 ngày.....	120
Bảng 3.17. So sánh các chỉ số huyết học của chuột sau 90 ngày.....	121
Bảng 3.18. So sánh các chỉ số huyết học của chuột sau 90 ngày.....	121
Bảng 3.19. Sự biến đổi khối lượng chuột trong thời gian nuôi thử nghiệm	122
Bảng 3.20. Sự biến đổi khối lượng nội tạng chuột sau 90 ngày nuôi	123
Bảng 3.21. Các chỉ số lipid ban đầu của các nhóm chuột thí nghiệm	124
Bảng 3.22. So sánh các chỉ số lipid của nhóm trắng, nhóm chứng và nhóm uống sản phẩm F- KLPTT Pol.H10	127
Bảng 3.23. So sánh các chỉ số lipid của nhóm trắng, nhóm chứng với chuột uống sản phẩm F- KLPTT Oli.H10 và Oli.L10	128
Bảng 3.24. So sánh các chỉ số lipid của nhóm trắng, nhóm chứng với chuột uống sản phẩm F- KLPTT Mcc.H10 và Mcc.L10	129
Bảng 3.25. Kết quả so sánh các chỉ số lipid của nhóm trắng, nhóm chứng với chuột uống Den.H10 và Den.L10	130
Bảng 3.26. Kết quả so sánh các chỉ số lipid của nhóm trắng, nhóm chứng với chuột uống Swa.H10 và Swa.L10	132
Bảng 3.27. Thành phần hóa học của mẫu F-KLPTT từ rong mơ <i>S. polycystum</i> ...	133
Bảng 3.28. Kết quả phân tích kim loại nặng của sản phẩm F- KLPTT	144
Bảng 3.29. Kết quả phân tích vi sinh của sản phẩm F- KLPTT	145
Bảng 3.30. Chi phí nguyên vật liệu cho sản phẩm F- KLPTT có hoạt tính làm giảm lipid máu.....	146

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Mô hình cấu trúc của thành tế bào rong nâu	5
Hình 1.2. Cấu trúc của fucoidan từ <i>F. vesiculosus</i> mô tả vào năm 1950.....	7
Hình 1.3. Cấu trúc của fucoidan từ <i>F. vesiculosus</i> mô tả vào năm 1993.....	7
Hình 1.4. Cấu trúc của fucoidan từ rong <i>Chorda filum</i>	8
Hình 1.5. Cấu trúc của fucoidan từ rong <i>C. okamuranus</i>	8
Hình 1.6. Cấu trúc của fucoidan từ rong <i>A. nodosum</i>	8
Hình 1.7. Cấu trúc fucoidan từ <i>F. distichus</i>	9
Hình 1.8. Cấu trúc fucoidan từ <i>F. serratus</i>	9
Hình 1.9. Sơ đồ phản ứng xác định thành phần các gốc đường của fucoidan	11
Hình 1.10. Sơ đồ xác định axit uronic.....	12
Hình 1.11. Cơ chế phân mảnh hydratecacbon	14
Hình 1.12. Sơ đồ phân mảnh của fucose sulfate	15
Hình 1.13. Một số lợi ích và tiềm năng ứng dụng của fucoidan	16
Hình 2.1. Hình ảnh về <i>S. polycystum</i>	40
Hình 2.2. Hình ảnh về <i>S. oligocystum</i>	40
Hình 2.3. Hình ảnh về <i>S. mcclurei</i>	40
Hình 2.4. Hình ảnh về <i>S. denticarpum</i>	40
Hình 2.5. Hình ảnh về <i>S. swartzii</i>	40
Hình 2.6. Sơ đồ phản ứng tạo màu của L-fucose và L-cystein.....	43
Hình 2.7. Sơ đồ bố trí thí nghiệm tổng quát.....	46
Hình 2.8. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định hàm lượng fucoidan trong 05 loài rong mơ <i>Sargassum</i> thu mẫu tại biển Nha Trang – Khánh Hòa	48
Hình 2.9. Xác định phương thức chiết fucoidan	50
Hình 2.10. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/rong đến khả năng chiết	51
Hình 2.11. Khảo sát ảnh hưởng của pH dung môi chiết đến khả năng chiết	51

Hình 2.12. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến khả năng chiết.....	52
Hình 2.13. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết đến khả năng chiết.....	53
Hình 2.14. Sơ đồ bố trí thí nghiệm khảo sát nồng độ H_2O_2 /axit ascorbic	56
Hình 2.15. Sơ đồ bố trí thí nghiệm khảo sát nhiệt độ cắt mạch.....	56
Hình 2.16. Sơ đồ bố trí thí nghiệm khảo sát thời gian cắt mạch.....	57
Hình 3.1. Hàm lượng fucoidan có trong 05 loài rong mơ <i>Sargassum</i>	63
Hình 3.2. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu đến hiệu suất chiết fucoidan từ rong <i>S. polycystum</i>	66
Hình 3.3. Ảnh hưởng của pH dịch chiết đến hiệu suất chiết fucoidan từ rong mơ <i>S. polycystum</i>	68
Hình 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết fucoidan.....	70
Hình 3.5. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hiệu suất chiết fucoidan từ rong mơ <i>S. polycystum</i> thu mẫu tại vùng biển Nha Trang - Khánh Hòa.....	71
Hình 3.6. Mô hình 3D bề mặt đáp ứng tối ưu hóa của các yếu tố tới hiệu suất chiết fucoidan từ rong mơ <i>S. polycystum</i>	76
Hình 3.7. Sơ đồ quy trình thu nhận fucoidan tự nhiên từ rong mơ <i>S. polycystum</i>	79
Hình 3.8. Ảnh hưởng của nồng độ H_2O_2 /Axit ascorbic đến quá trình cắt mạch fucoidan tự nhiên thành F-KLPTT.....	82
Hình 3.9. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình cắt mạch fucoidan tự nhiên thành F-KLPTT	84
Hình 3.10. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình cắt mạch fucoidan tự nhiên thành F-KLPTT	86
Hình 3.11. Mặt đáp ứng tối ưu thực nghiệm của các yếu tố tới hiệu suất cắt mạch fucoidan tự nhiên tạo F- KLPTT	90
Hình 3.12. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> ở thời điểm ban đầu.....	92

Hình 3.13. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> sau 24 tháng bảo quản ở nhiệt độ 4 ⁰ C.....	92
Hình 3.14. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> tại tháng thứ 2 ở nhiệt độ thường.....	93
Hình 3.15. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> tại tháng thứ 4 ở nhiệt độ thường.....	93
Hình 3.16. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> tại tháng thứ 7 ở nhiệt độ thường.....	94
Hình 3.17. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ <i>S. polycystum</i> tại tháng thứ 9 ở nhiệt độ thường.....	94
Hình 3.18. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> tại tháng thứ 11 ở nhiệt độ thường.....	95
Hình 3.19. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> tại tháng thứ 13 ở nhiệt độ thường.....	95
Hình 3.20. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> tại tháng thứ 15 ở nhiệt độ thường.....	96
Hình 3.21. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> tại tháng thứ 17 ở nhiệt độ thường.....	96
Hình 3.22. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> tại tháng thứ 19 ở nhiệt độ thường.....	97
Hình 3.23. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> tại tháng thứ 20 ở nhiệt độ thường.....	97
Hình 3.24. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> tại tháng thứ 21 ở nhiệt độ thường.....	98
Hình 3.25. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> tại tháng thứ 22 ở nhiệt độ thường.....	98
Hình 3.26. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> tại tháng thứ 23 ở nhiệt độ thường.....	99

Hình 3.27. Sắc ký đồ HPLC của mẫu sản phẩm fucoidan KLPTT từ rong <i>S. polycystum</i> tại tháng thứ 24 ở nhiệt độ thường	99
Hình 3.28. Quy trình phân cắt fucoidan tự nhiên tạo thành fucoidan KLPTT .	101
Hình 3.29. Phổ IR của mẫu Pol.H10	104
Hình 3.30. Phổ IR của mẫu Pol.L10	104
Hình 3.31. Phổ IR của mẫu Oli.H10	105
Hình 3.32. Phổ IR của mẫu Oli.L10 từ rong mơ <i>S. oligocystum</i>	105
Hình 3.33. Phổ IR của mẫu Mcc.H10 từ rong mơ <i>S. mcclurei</i>	106
Hình 3.34. Phổ IR của mẫu Mcc.L10 từ rong mơ <i>S. mcclurei</i>	106
Hình 3.35. Phổ IR của mẫu Den.H10 từ rong mơ <i>S. denticarpum</i>	107
Hình 3.36. Phổ IR của mẫu Den.L10 từ rong mơ <i>S. denticarpum</i>	107
Hình 3.37. Phổ IR của mẫu Swa.H10 từ rong mơ <i>S. swartzii</i>	108
Hình 3.38. Phổ IR của mẫu Swa.L10 từ rong mơ <i>S. swartzii</i>	108
Hình 3.39. Phổ ^1H -NMR của mẫu Pol.H10 từ rong mơ <i>S. polycystum</i>	110
Hình 3.40. Phổ ^1H -NMR của mẫu Pol.L10 từ rong mơ <i>S. polycystum</i>	110
Hình 3.41. Phổ ^1H -NMR của mẫu Oli.H10 từ rong mơ <i>S. oligocystum</i>	111
Hình 3.42. Phổ ^1H -NMR của mẫu Oli.L10 từ rong mơ <i>S. oligocystum</i>	111
Hình 3.43. Phổ ^1H -NMR của mẫu Mcc.H10 từ rong mơ <i>S. mcclurei</i>	112
Hình 3.44. Phổ ^1H -NMR của mẫu Mcc.L10 từ rong mơ <i>S. mcclurei</i>	112
Hình 3.45. Phổ ^1H -NMR của mẫu Den.H10 từ rong mơ <i>S. denticarpum</i>	113
Hình 3.46. Phổ ^1H -NMR của mẫu Den.L10 từ rong mơ <i>S. denticarpum</i>	113
Hình 3.47. Phổ cấu trúc ^1H -NMR của mẫu Swa.H10 từ rong mơ <i>S. swartzii</i>	114
Hình 3.48. Phổ ^1H -NMR của mẫu Swa.L10 từ rong mơ <i>S. swartzii</i>	114
Hình 3.49. Phổ ^{13}C -NMR của mẫu Pol.H10 từ rong <i>S. polycystum</i>	134
Hình 3.50. Phổ ^1H -NMR của mẫu Pol.H10 từ rong mơ <i>S. polycystum</i>	135
Hình 3.51. Phổ H-HCOSY của mẫu Pol.H10 từ rong mơ <i>S. polycystum</i>	136

Hình 3.52. Phổ IR của mẫu Pol.H10 từ rong mơ <i>S. polycystum</i>	137
Hình 3.53. Phổ MS ⁺ⁿ của mẫu fucoidan Pol.H10.....	138
Hình 3.54. Phổ khối MS ² của mảnh 251.....	139
Hình 3.55. Phổ khối MS ² của mảnh 233.....	139
Hình 3.56. Quy trình sản xuất F- KLPTT từ rong mơ <i>S. polycystum</i>	141
Hình 3.57. Hình ảnh sản phẩm F- KLPTT từ rong mơ <i>S. polycystum</i>	146

Tailieu.vn

TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Đề tài luận án: “Nghiên cứu quy trình thu nhận fucoidan phân tử thấp từ rong mơ *Sargassum* tại Nha Trang - Khánh Hòa bằng phương pháp hóa học”

Ngành: Công nghệ chế biến thủy sản

Mã số: 9540105

Nghiên cứu sinh: Lê Xuân Sơn

Khóa: 2011

Người hướng dẫn:

PGS. TS. Vũ Ngọc Bội

TS. Nguyễn Duy Nhứt

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Nha Trang

Luận án đã thu được một số kết quả mới bổ sung vào lĩnh vực nghiên cứu, sản xuất fucoidan và fucoidan khối lượng phân tử thấp từ rong mơ:

1) Luận án đã đánh giá được hàm lượng fucoidan từ 5 loài rong mơ *Sargassum* thu mẫu ở vùng biển Nha Trang - Khánh Hòa và nhận thấy rong mơ *S. polycystum* có hàm lượng fucoidan cao nhất và đạt mức $3,54 \pm 0,02\%$, tiếp đến là các loài rong: *S. oligocystum*, với hàm lượng $3,23 \pm 0,02\%$, *S. swartzii*, với hàm lượng $2,94 \pm 0,01\%$, *S. deticarpum*, với hàm lượng: $2,04 \pm 0,00\%$ và *S. mcclurei*, với hàm lượng fucoidan là $1,34 \pm 0,06\%$.

2) Luận án xác định được các điều kiện tối ưu cho quá trình chiết fucoidan từ rong *S. polycystum* theo phương thức xay - chiết: chiết bằng dung dịch HCl 2M ở pH 3,4, nhiệt độ 77°C , trong thời gian 48 phút và hiệu suất chiết đạt 84,17%.

3) Luận án xác định được các điều kiện thích hợp cho quá trình phân cắt fucoidan tự nhiên từ rong *S. polycystum* tạo thành F-KLPTT, có khối lượng phân tử từ $10 \div 100\text{kDa}$ và có hoạt tính sinh học làm giảm lipid máu: phân cắt bằng hỗn hợp H_2O_2 /axit ascorbic với nồng độ tối ưu là 37,5/37,5 (mmol/mmol, ở nhiệt độ 68° , thời gian cắt mạch 96 phút và hiệu suất cắt mạch đạt 85,18%.

4) Luận án đã đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của sản phẩm F-KLPTT từ rong *S. polycystum* cho thấy ở liều dùng F-KLPTT 2580 mg/kg/ngày và sử dụng liên tục trong 7 ngày thì sản phẩm fucoidan khối lượng phân tử thấp không gây độc với chuột thí nghiệm, ở liều dùng 1.400mg/kg khối lượng/ngày trong thời gian 90 ngày không gây bất cứ một ảnh hưởng nào tới trạng thái sinh lý của chuột lang thí nghiệm.

5) Kết quả đánh giá hoạt tính làm giảm lipid máu của fucoidan khối lượng phân tử thấp từ 05 loài rong mơ (*S. polycystum*, *S. oligocystum*, *S. mcclurei*, *S. denticarpum*, *S. swartzii*) cho thấy fucoidan khối lượng phân tử thấp 10 ÷ 100kDa từ 03 loài *S. polycystum*, *S. oligocystum*, *S. mcclurei* có hoạt tính sinh học làm giảm lipid máu của chuột lang sau 28 ngày nuôi thử nghiệm.

6) Luận án đã xác định cấu trúc của fucoidan khối lượng phân tử thấp từ rong mơ *S. polycystum* sinh trưởng ở vịnh Nha Trang, Khánh Hòa và nhận thấy cấu trúc một mảnh đại diện của phân đoạn là: fuc-uro-hexSO₃H-hex.

7) Luận án đã đề xuất quy trình sản xuất sản phẩm fucoidan khối lượng phân tử thấp từ rong mơ *S. polycystum* Nha Trang và sản phẩm fucoidan khối lượng phân tử thấp sản xuất theo quy trình đề xuất đạt tiêu chuẩn an toàn thực phẩm về kim loại nặng và vi sinh vật, với có chi phí nguyên vật liệu là 12.803.000 đồng/1kg sản phẩm.

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN

NGHIÊN CỨU SINH

PGS. TS. Vũ Ngọc Bội TS. Nguyễn Duy Nhứt

Lê Xuân Sơn

MỞ ĐẦU

Việt Nam có bờ biển dài 3.260 km, nằm trong vùng nhiệt đới, nên có điều kiện tự nhiên thuận lợi cho rong biển phát triển. Theo thống kê chưa đầy đủ, Việt Nam có khoảng 794 loài rong biển, phân bố ở vùng biển phía Bắc 310 loài, miền Nam 484 loài và 156 loài tìm thấy ở cả hai miền [1]. Chỉ tính riêng rong mơ *Sargassum* thuộc ngành *Phaeophyta*, lớp *Phaeophyceae*, bộ *Fucales*, họ *Sargassaceae*, chi *Sargassum*, theo công bố của Nguyễn Hữu Dinh (1998), Việt Nam có hơn 70 loài với sản lượng ước tính khoảng 12.500 tấn khô/năm [8].

Rong mơ có chứa nhiều hợp chất sinh học có giá trị dược dụng cao. Trong số đó, fucoidan là polysaccharid có nhiều hoạt tính sinh học có giá trị như hoạt tính chống đông máu [41], [148], khả năng kháng khuẩn [52], kháng vi rút [65], chống ung thư [26], [76], [58], khả năng chống oxy hóa [88], [159] kháng viêm [67], miễn dịch [162], làm giảm lipid máu [82],.... Mặc dù fucoidan có nhiều hoạt tính sinh học và có tiềm năng ứng dụng rất lớn trong nhiều lĩnh vực nhưng hiện nay fucoidan vẫn chưa được phát triển thương mại ở quy mô lớn do hàm lượng và hoạt tính của fucoidan phụ thuộc vào loài rong, vị trí địa lý, mùa thu hoạch, phương thức khai thác,... và đặc biệt là phụ thuộc vào khối lượng phân tử và công nghệ sản xuất fucoidan.

Những nghiên cứu mới hiện nay cho thấy từ fucoidan tự nhiên người ta có thể phân cắt thành fucoidan khối lượng phân tử thấp. Quá trình phân cắt fucoidan thành fucoidan khối lượng phân tử thấp có thể được thực hiện bằng một số phương pháp như phương pháp enzyme sử dụng enzyme fucoidanase và phương pháp hóa học sử dụng axit hoặc sử dụng H_2O_2 hay sử dụng H_2O_2 kết hợp với các tác nhân khác. Trong đó, phương pháp phân cắt fucoidan bằng phương pháp hóa học sử dụng tác nhân H_2O_2 kết hợp với các tác nhân khác tỏ ra có nhiều ưu điểm như không ảnh hưởng đến cấu trúc tự nhiên của fucoidan và quan trọng hơn không làm tách nhóm sulphate nên không ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của fucoidan khối lượng phân tử thấp tạo thành. Sở dĩ các