**TRANG THÔNG TIN LUẬN ÁN**

Tên đề tài luận án: "Nghiên cứu chế tạo dẫn xuất chitosan - glucosamine trên cơ sở phản ứng Maillard bằng chiếu xạ gamma Co-60 và đánh giá một số hoạt tính sinh học"

Ngành: Hóa sinh học

Mã số ngành: 62420116

Họ tên nghiên cứu sinh: Lê Anh Quốc

Khóa đào tạo: 2016

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. NGUYỄN QUỐC HIẾN

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG.HCM

**1. TÓM TẮT NỘI DUNG LUẬN ÁN (SUMMARY)**:

 Chitosan (CTS) là một polymer sinh học có tính tương hợp sinh học, phân hủy sinh học, không độc, cùng với đó là khả năng kháng khuẩn, kháng oxi hóa, giảm cholesterol, kháng viêm, v.v. . Do đó chitosan có tiềm năng ứng dụng rất lớn trong nhiều lĩnh vực khác nhau, đặc biệt là trong công nghiệp thực phẩm. Tuy nhiên, đặc tính tan kém cùng với hoạt tính sinh học phụ thuộc nhiều vào yếu tố môi trường đã làm hạn chế khả năng mở rộng ứng dụng của chitosan. Để khắc phục nhược điểm này, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành nhằm gia tăng tính tan và hoạt tính sinh học của chitosan thông qua các phương pháp biến đổi hóa học hoặc enzyme. Trong số các phương pháp cải biến chitosan, phản ứng Maillard (MR) được xem là một "phương pháp xanh", do phản ứng dễ thực hiện, không cần các chất xúc tác hóa học, đặc biệt là các sản phẩm Maillard (MRP) của chitosan với các loại đường khử thu được có tính tan, hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxi hóa vướt trội hơn chitosan ban đầu. Ngoài ra, MRP của chitosan với glucosamine (GA) được ghi nhận là thể hiện hoạt tính kháng khuẩn cao hơn các loại đường khử khác. Gần đây, phương pháp chiếu xạ gamma Co-60 đã được ghi nhận là có thể xúc tác cho MR giữa CTS với đường khử tương tự như phương pháp gia nhiệt. Nổi bật là MR theo phương pháp chiếu xạ gamma Co-có thể xảy ra nhanh nhanh chóng ở nhiệt độ phòng và sinh ra 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), một sản phẩm phụ gây độc thường được hình thành bởi MR theo phương pháp gia nhiệt. Tuy nhiên cho đến nay, số lượng các công bố khoa học về ứng dụng MR theo phương pháp chiếu xạ gamma để chế tạo MRP dùng trong bảo quản thực phẩm vẫn còn hạn chế, đặc biệt là các MRP CTS-GA. Vì vậy nghiên cứu chế tạo MRP CTS-GA trên cơ sở MR bằng chiếu xạ gamma Co-60 và đánh giá một số hoạt tính sinh học cùng với khả năng bảo quản thực phẩm của chúng là rất cần thiết.

Trong nghiên cứu này, các mẫu chitosan có khối lượng phân tử (KLPT) khác nhau bao gồm CTSLMw (KPLT ~40,7 kDa) và COS (KPLT ~6,1 kDa) đã được chế tạo từ nguyên liệu CTS (KLPT ~123,6 kDa) bằng phương pháp cắt mạch bởi H2O2 và H2O kết hợp với chiếu xạ gamma Co-60. Song song với đó, các điều kiện thực hiện MR như: tổng nồng độ CTS+GA, tỷ lệ nồng độ CTS:GA, liều xạ,.. cũng được nghiên cứu. Từ đó, vác điều kiện của MR bao gồm hỗn hợp dung dịch 1,6% chitosan và 0,4% GA; liều xạ 25 kGy và hiệu suất phản ứng đạt ~80% đã được lựa chọn để chế tạo các dung dịch MRP của chitosan có KLPT khác nhau với GA và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxi hóa. Hoạt tính kháng khuẩn của các MRP được đánh giá bởi phương pháp khuếch tán đĩa thạch, xác định nồng độ ức chế/diệt khuẩn tối thiểu (giá trị MIC, MBC) đối với 4 chủng vi khuẩn: *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa* và *Staphilococcus aureus*. Trong khi đó, hoạt tính kháng oxi hóa của các MRP được xác định thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH•. Kết quả thí nghiệm cho thấy MRP CTS-GA có hoạt tính có hoạt tính kháng oxy hóa và hoạt tính kháng khuẩn mạnh phù hợp với mục tiêu ứng dụng trong bảo quản thịt tươi nên được lựa chọn. Tiếp theo, MRP CTS-GA được phân tích các tính đặc trưng tính chất như ghi phổ FTIR, H1-NMR; xác định KLPT bằng phương pháp GPC; đánh giá khả năng hình thành 5-HMF bằng phương pháp HPLC; xác định độ tan trong nước, đánh giá khả gây độc đối với tế bào L292 và khả năng gây độc tính cấp qua đường uống trên chuột nhắt trắng. Qua đó, MRP CTS-GA được xác định là không chứa sản phẩm phụ 5-HMF, tan hoàn toàn trong nước tại nồng độ thử nghiệm 0,05 g/mL, không gây độc đối với tế bào L929 và không gây độc tính cấp qua đường uống trên chuột ở các nồng độ thử nghiệm. Ngoài ra, dung dịch MRP CTS-GA cũng đã được minh chứng cơ chế kháng vi khuẩn *E. coli* là tương tác với màng tế bào, gây ra biến đổi màng và gây vỡ tế bào thông qua phương pháp chụp ảnh FESEM. Bên cạnh đó, dung dịch MRP CTS-GA được xác định là có khả năng bảo vệ các thành phần tế bào thịt thăn lợn bao gồm lipid màng, protein màng, và DNA khỏi gốc tự do hydroxyl, trước khi khảo sát khả năng kéo dài thời gian bảo quản thịt thăn lợn ở nồng độ 500 và 1000 mg/L trong điều kiện kín khí/hở khí, tại 28 ℃ và 4 ℃. Kết thử nghiệm khả năng bảo quản thịt thăn cho thấy dung dịch MRP CTS-GA tại nồng độ 1000 mg/L có thể kéo dài thêm thời gian bảo quản thịt thăn lợn trong điều kiện hở khí ở 28 ℃ và 5 ℃ lần lượt là 6 giờ và 8 ngày, và trong điều kiện kín khí ở 5 ℃ là 14 ngày.

**2. NHỮNG KẾT QUẢ MỚI CỦA LUẬN ÁN:**

- Luận án đã xác định được hiệu suất phản ứng trên cơ sở phân tích hàm lượng GA chưa phản ứng và xác định tỷ lệ nồng độ CTS:GA phù hợp (hay 1,6% CTS và 0,4% GA) để thực hiện phản ứng Maillard bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60 đạt hiệu suất phản ứng cao (~80%).

- Cơ chế kháng vi khuẩn *E. coli* của dung dịch MRP CTS-GA đã được minh chứng là tương tác với màng tế bào, gây ra biến đổi màng và gây vỡ tế bào bằng phương pháp chụp ảnh FESEM.

- Luận án đã minh chứng khả năng bảo vệ các thành phần tế bào thịt thăn lợn của dung dịch MRP CTS-GA cụ thể là lipid màng, protein màng, và DNA khỏi tác động của gốc tự do. Từ đó đề xuất khả năng kéo dài thời gian bảo quản thịt thăn lợn của dung dịch MRP CTS-GA.

- Luận án đã xác định thời gian bảo quản của thịt thăn lợn sau khi xử lý với dung dịch MRP CTS-GA tại nồng độ 1000 mg/L được kéo dài thêm 6 giờ và 8 ngày lần lượt trong điều kiện hở khí ở 28 ℃ và 5 ℃; và 14 ngày trong điều kiện kín khí ở 5 ℃.

**3.** **CÁC ỨNG DỤNG/ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG THỰC TIỄN HAY NHỮNG VẤN ĐỀ CÒN BỎ NGỎ CẦN TIẾP TỤC NGHIÊN CỨU** **(APPLICATIONS/ APPLICABILITY/ PERSPECTINE)**

- Nghiên cứu điều chỉnh tăng tỷ lệ CTS:GA để phản ứng Maillard bằng phương chiếu xạ gamma Co-60 đạt hiệu suất cao hơn 80%.

- Tiếp tục nghiên cứu các đặc trưng tính chất của MRP CTS-GA như thế zeta, giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD),.. .

- Nghiên cứu gia tăng thể tích dung dịch CTS-GA để chế tạo MRP CTS-GA trên máy chiếu xạ gamma Co-60 công nghiệp hướng tới sản xuất ứng dụng.

- Tiếp tục thử nghiệm khả năng kéo dài thời gian bảo quản của MRP CTS-GA trên một số đối tượng thực phẩm khác.

|  |  |
| --- | --- |
| **TẬP THỂ CÁN BỘ HƯỚNG DẪN** | **NGHIÊN CỨU SINH** |

 **GS.TS. Nguyễn Quốc Hiến Lê Anh Quốc**

**XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO**

**THESIS INFORMATION**

Thesis title: Study on the preparation of chitosan - glucosamine derivatives by Co-60 gamma ray-induced Maillard reaction and investigation of some biological activities

Specialty: Biochemistry

Code: 62420116

Name of Ph.D. Student: Le Anh Quoc

Academic year: 2016

Supervisor: Professor NGUYEN QUOC HIEN

At: VNUHCM - University of Science

**1. SUMMARY**:

 Chitosan (CTS) is a biocompatible, biodegradable and non-toxic biopolymer with other remarkable properties, including antimicrobial, antioxidant, cholesterol reduction, anti-inflammatory activities, etc. Therefore, chitosan has great potential for application in many different fields, especially in the food industry. However, the application of CTS in many fields is still restricted because of its insolubility in water as well as a reduction in biological activities at neutral or basic pH. Hence, there have been many efforts to improve the solubility and biological activities of CTS based on chemical modifications. Among the chitosan modification methods, Maillard reaction (MR) is considered a "green method" because this reaction is easy to perform without chemical catalysts, especially the Maillard reaction products (MRP) obtained from chitosan and reducing sugars exhibit better solubility in water, higher antibacterial and antioxidant activities than those of original chitosan. Notably, MRP of chitosan with glucosamine (GA) has recorded with higher antibacterial activity than MRPs from other reducing sugars. Recently, it has been recorded that Co-60 gamma-ray irradiation could induce MR like heating method. More interestingly, the gamma ray-induced MR can take place rapidly at room temperature without forming 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), a known cytotoxic byproduct formed by heat-induced MR. However, up to now, the number of publications on the preparation of gamma ray-induced MRPs of chitosan-glucosamine for food applications is still limited. Therefore, study on the preparation of CTS-GA MRP by gamma-induced method and evaluation of its biological actitivies as well as food-preservative ability is necessary.

 In this study, chitosan samples with different molecular weights (Mw) including CTSLMw (Mw ~40.7 kDa) and COS (Mw ~6.1 kDa) were prepared from the original CTS (Mw ~123.6 kDa) by H2O2 degradation without and with Co-60 gamma irradiation, respectively. Concurrently, the factors affecting the MR including total concentration of CTS+GA, concentration ratio of CTS:GA, irradiation dose, etc. were also studied. As a result, MR parameters including a mixture of 1.6% chitosan solution and 0.4% GA solution; irradiation dose of 25 kGy and reaction efficiency of ~80% were selected to prepare MRP solutions of GA and chitosan with different Mw before evaluate their antibacterial and antioxidant activities. The antibacterial activity of MRPs was evaluated by the disc diffusion method and by the minimum inhibitory/bactericidal concentrations (MIC/MBC) determination against four bacterial strains: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphilococcus aureus*. Meanwhile, the antioxidant activity of MRPs was determined by employing DPPH• radical scavenging assay. Consequently, CTS-GA MRP was selected due to its high antioxidant and antibacterial activities which are suitable for use as a fresh meat preservative. The CTS-GA MRP properties then was characterized including structure analysis by FTIR and H1-NMR spectroscopy; Mw determination by GPC method; 5-HMF detection by HPLC method; solubility determination in water; cytoxicity evaluation on L292 cells and acute oral toxicity determination in white mice. Thereby, the CTS-GA MRP was determined to be free 5-HMF, completely soluble in water at the test concentration of 0.05 g/mL, non-cytoxic on L929 cells and non-acute oral toxicity in mice at the test concentrations. In addition, the antibacterial mechanism of the CTS-GA MRP against *E. coli* was also investigated by cell morphology observation method via FESEM images and proposed as that the MRP interacts with baterial cell membrane, cause membrane changes lead to cell rupture. Moreover, the CTS-GA MRP solution was demontrated to be able to protect pork tenderloin cell components including membrane lipids, membrane proteins and DNA from damage by hydroxyl free radicals. Furthermore, results of the experiment to determine preservative effect of CTS-GA MRP on fresh pork tenderloin at concentrations of 500 and 1000 mg/L under aerobic/anaerobic packaging conditions, at 28 ℃ and 4 ℃ showed that the MRP solution at a concentration of 1000 mg/L could extend the storage time of pork loin under aerobic pakaging at 28 ℃ and 5 ℃ by 6 hours and 8 days, and under anaerobic packaging at 5 ℃ by 14 days, respectively,

**2. NOVELTY OF THESIS**:

- The study determined the Maillard reaction efficiency based on the conten of unreacted GA and established the suitable concentration ratio of CTS:GA (1.6% CTS and 0.4% GA) with the dose of 25 kGy to perform the gamma ray-induced Maillard reaction with high reaction efficiency (~80%).

- The antibacterial mechanism of the CTS-GA MRP against *E. coli* was proposed as that the MRP interacts with baterial cell membrane, cause membrane changes lead to cell rupture by cell morphology observation method via FESEM images.

- The study demonstrated that CTS-GA MRP solution was able to protect pork tenderloin cell components including membrane lipids, membrane proteins and DNA from damage by hydroxyl free radicals and revealed the action mechanism to extend storage time of pork tenderloind using CTS-GA MRP.

- The study determined the storage time of pork tenderloin after treated by CTS-GA MRP solution at a concentration of 1000 mg/L under aerobic packaging conditions at 28 ℃ and 5 ℃ was extended by 6 hours and 8 days respectively; and 14 days under under anaerobic packaging conditions at 5 ℃.

**3**. **APPLICATIONS/ APPLICABILITY/ PERSPECTIVE**

- Increasing the CTS:GA ratio to achieve a gamma-induced Maillard reaction efficiency higher than 80%.

- Expanding the characterization study of CTS-GA MRP such as zeta potential, X-ray diffraction (XRD) pattern,.. .

- Enlarging the volume of CTS-GA solution to produce CTS-GA MRP by industrial Co-60 irradiators towards large scale production.

- Broadening food subjects in the experiment to determine preservative effect of CTS-GA MRP.

|  |  |
| --- | --- |
|  **SUPERVISOR** | **PhD STUDENT** |

 **Prof. NGUYEN QUOC HIEN LE ANH QUOC**

**CERTIFICATION**

**UNIVERSITY OF SCIENCE**

**PRESIDENT**