

ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HỒ CHÍ MINH
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

NGUYỄN THỊ ÁI VÂN

NGHIÊN CỨU THỦY PHÂN TRIGLYCERIDE TRONG DẦU
DỪA ĐỂ THU NHẬN CÁC PHÂN ĐOẠN ACID BÉO TỰ DO
CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm
Mã số chuyên ngành: 62540101

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT

TP. HỒ CHÍ MINH NĂM 2019

Công trình được hoàn thành tại **Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM**

Người hướng dẫn khoa học 1: **PGS. TS Phan Ngọc Hòa**

Người hướng dẫn khoa học 2: **TS Trần Bích Lam**

Phản biện độc lập 1:

Phản biện độc lập 2:

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án họp tại

.....
.....
vào lúc giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Khoa học Tổng hợp Tp. HCM
- Thư viện Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

Tap chí quốc tế

1. Van T.A. Nguyen, Truong D. Le, Hoa N. Phan, and Lam B. Tran, "Antibacterial Activity of Free Fatty Acids from Hydrolyzed Virgin Coconut Oil Using Lipase from *Candida rugosa*," *J. Lipids*, vol. 2017, pp. 1–7, 2017. (Scopus)
2. Van T.A. Nguyen, Truong D. Le, Hoa N. Phan, and Lam B. Tran, "Hydrolysis Activity of Virgin Coconut Oil Using Lipase from Different Sources," *Scientifica*, vol. 2018, pp. 1–7, 2018. (Scopus)
3. Van T. A. Nguyen, Truong D. Le, Hoa N. Phan, and Lam B. Tran, "Isolating free fatty acid from virgin coconut oil using lipase from different sources," *Jurnal Teknologi*, vol. 3, pp. 55–59, 2018. (Scopus)

Tap chí trong nước

4. Van T.A. Nguyen, Tuan M. Pham, Duy H. Truong, and Hoa N. Phan, "Antibacterial activity of hydrolyzed virgin coconut oil by immobilized lipase," *Journal of Science and Technology*, vol. 54, 2016.

Kỹ yếu hội nghị quốc tế

1. Van T. A. Nguyen, Hoa N. Phan, and Lam B. Tran, "Enzymatic hydrolysis of coconut oil using lipases from *Candida rugosa* and porcine pancreas", The 2nd International Conference on Chemical Engineering, Food and Biotechnology 2015, ISBN: 978-604-63-1598-8.
2. Van T. A. Nguyen, Hoa N. Phan, and Lam B. Tran, "Hydrolysis of virgin coconut oil using free and immobilized lipase from *Apergillus Oryzae*" proceeding of the 2016 International Conference on Advanced Technology and Sustainable Development, ISBN: 978-604-920-040-3.

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Việt Nam có sản lượng dầu thực vật thấp, nhập khẩu nhiều, nhưng một số nguồn dầu trong nước chưa được khai thác chế biến tốt, nhiều nơi vẫn còn bán nguyên liệu thô, trong khi từ các nguyên liệu này có thể tạo ra các sản phẩm có giá trị sử dụng cao. Dầu dừa là một nguồn dầu béo chính của Việt Nam. Dầu dừa có thành phần acid béo mạch cacbon từ C6 đến C18, chủ yếu là các acid béo bão hòa, có đặc điểm là hàm lượng lớn các acid béo no mạch trung bình, khó bị oxi hóa. Ở một số nước Đông Nam Á như Philippines, Indonesia và Thái Lan, từ dầu dừa đã sản xuất nhiều sản phẩm có giá trị, dùng trong dược phẩm và mỹ phẩm.

Theo một số công bố thì dầu dừa VCO có khả năng làm giảm hàm lượng cholesterol trong máu (Harini, 2009). Những nghiên cứu trước đây cũng đã chứng minh rằng, các triglyceride của acid béo mạch trung bình dễ dàng được hấp thu và giải phóng thành năng lượng, làm tăng cảm giác no sớm, nên giảm ăn, do đó giúp giảm được trọng lượng (St – Onge và cộng sự, 2002). Mặt khác, nhiều nghiên cứu cho thấy, khi ở trạng thái tự do, các acid béo mạch trung bình trong dầu dừa thể hiện được khả năng kháng khuẩn và kháng nấm (Shilling và cộng sự, 2013; Beena Shino và cộng sự, 2016). Đặc biệt là công dụng của acid lauric – một acid béo mạch trung bình điển hình trong dầu dừa, đã thu hút sự chú ý của các nhà nghiên cứu và chế biến thực phẩm nhờ hoạt tính sinh học cao, như khả năng kháng vi khuẩn, kháng nấm mốc và kháng virút (Kim và cộng sự, 2016; Sun và cộng sự, 2003; F.M. Dayrit, 2014).

Tùy thuộc vào điều kiện thủy phân dầu dừa, có thể thu được các sản phẩm thủy phân có tính chất khác nhau, vì thế có giá trị sinh học khác nhau. Trên cơ sở đó, luận án này sẽ nghiên cứu qui luật thủy phân dầu dừa VCO bằng một số loại enzyme lipase để thu được các chất có hoạt tính sinh học”

2. Mục tiêu nghiên cứu, đóng góp mới về mặt khoa học và thực tiễn

2.1. Mục tiêu nghiên cứu

- Xác định được loại enzyme lipase thủy phân dầu VCO phù hợp;
- Đánh giá hoạt tính sinh học của các phân đoạn acid béo tự do.

2.2. Ý nghĩa khoa học và tính mới của luận án

- Đã xác định được qui luật thủy phân dầu VCO của bốn loại enzyme lipase dưới ảnh hưởng của bốn yếu tố như: tỉ lệ dầu/đệm, tỉ lệ enzyme/cơ chất, pH và nhiệt độ, đồng thời xác định các thông số động học của mỗi loại enzyme lipase trên cơ chất dầu VCO.

- Đã xác định được khả năng kháng lại bốn loại vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 11774), *Escherichia coli* (ATCC 25922) và *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) của các phân đoạn acid béo FFA1, FFA2 và FFA3 được thu nhận từ quá trình thủy phân dầu VCO.

- Bước đầu xác định được ảnh hưởng của các phân đoạn FFA1, FFA2 và FFA3 đến hàm lượng cholesterol trong cơ thể chuột. FFA1 và FFA2 vừa giúp giảm hàm lượng cholesterol trong máu vừa giúp giảm trọng lượng của chuột được cho ăn chế độ giàu béo (HFD). Riêng FFA3 (phân đoạn chứa acid béo tự do mạch dài, chủ yếu từ C14 – C18), không những không cải thiện trọng lượng chuột được cho ăn chế độ HFD mà còn gây viêm gan.

2.3. Ý nghĩa thực tiễn

- Đã xác định được điều kiện thủy phân dầu VCO phù hợp nhất cho từng loại enzyme lipase và chọn được loại enzyme thủy phân VCO với mức độ thủy phân cao nhất trong thời gian ngắn nhất và hàm lượng acid béo mạch trung bình (MCFA) được giải phóng lên đến 61.37%.

- Đã thu nhận được các phân đoạn acid béo tự do FFA1, FFA2 và FFA3, đồng thời xác định được thành phần cũng như hàm lượng của các acid béo tự do trong các phân đoạn trên.

- Đã chứng minh được, các acid béo có mạch cacbon từ C6 đến C12 (FFA1 và FFA2) là có hoạt tính kháng bốn loại vi khuẩn thử nghiệm, còn acid béo có mạch cacbon từ C14 đến C18 (FFA3) thì không có hoạt tính kháng bốn loại vi khuẩn kể trên.

- Đã xác định được hai phân đoạn FFA1 và FFA2 có khả năng cải thiện hàm lượng cholesterol trong máu và trọng lượng của chuột giống Wistar được cho ăn chế độ HFD. Trong khi đó, phân đoạn FFA3, chứa chủ yếu là các acid béo mạch dài, không những gây viêm gan mà còn làm tăng trọng so với chuột được cho ăn chế độ HFD.

3. Cấu trúc luận án

Luận án gồm có 4 chương. Mở đầu. Chương 1 Tổng quan. Chương 2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu. Chương 3 Kết quả và biện luận. Chương 4 Kết luận và kiến nghị.

CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN

1.1 Dầu dừa VCO và các hợp chất có hoạt tính sinh học của nó

1.2 Các phương pháp thủy phân dầu VCO

1.3 Enzyme lipase

1.4 Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu nghiên cứu trọng tâm của luận án bao gồm các vấn đề sau:

- Xác định được qui luật ảnh hưởng của tỉ lệ dầu/đệm, tỉ lệ enzyme/ cơ chất, pH và nhiệt độ đến mức độ thủy phân dầu VCO bởi bốn loại enzyme lipase. Xác định được giá trị động học K_m và V_{max} của mỗi loại enzyme lipase xúc tác phản ứng thủy phân dầu VCO.
- Xác định được loại enzyme lipase xúc tác phản ứng thủy phân dầu VCO đạt được mức độ thủy phân cao nhất trong thời gian ngắn nhất và giải phóng hàm lượng acid béo mạch trung bình nhiều nhất, để thu nhận sản phẩm là các acid béo tự do (FFA). Các phân đoạn acid béo có chiều dài mạch cacbon khác nhau FFA1, FFA2, FFA3 được thu nhận từ FFA tổng, bằng phương pháp chưng cất chân không. Trong đó, FFA1 là các acid béo tự do mạch trung bình (MCFA), mạch cacbon từ C6 – C10, FFA2 là acid lauric (C12), FFA3 là các acid béo mạch dài (LCFA), mạch cacbon từ C14 –C18.

- Đánh giá hoạt tính sinh học của các phân đoạn acid béo này thông qua khả năng kháng bốn loại vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong thực phẩm như: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 11774), *Escherichia coli* (ATCC 25922) và *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076). Đồng thời, tác động của các phân đoạn acid béo này đến hàm lượng cholesterol trong máu ở chuột giống Wistar cũng được khảo sát.

CHƯƠNG 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

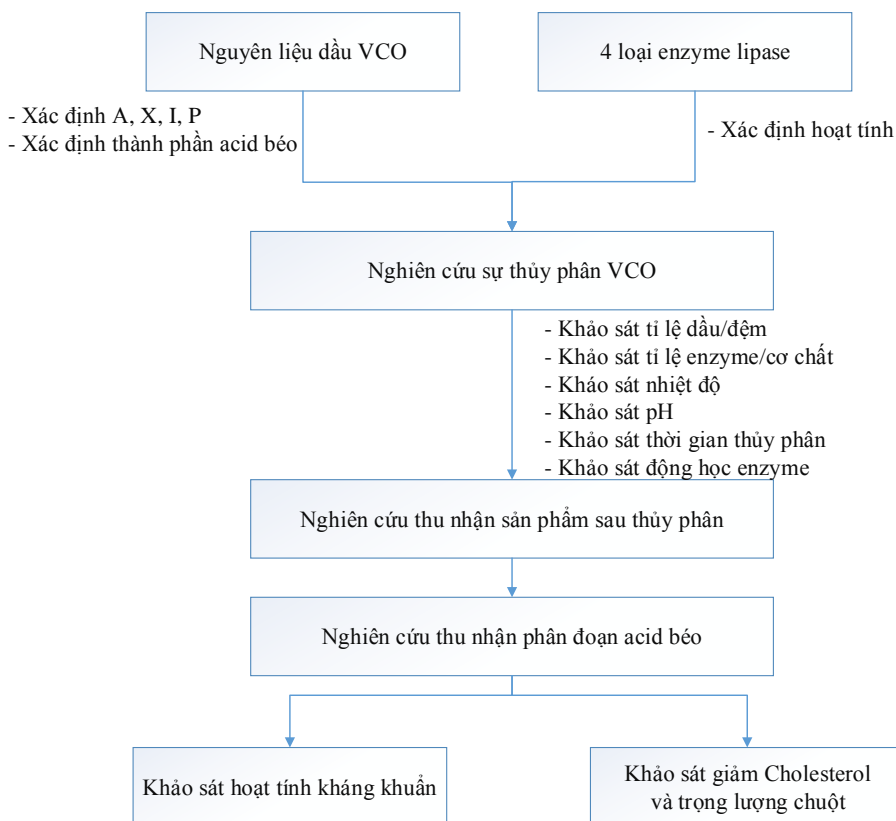
2.1 Vật liệu nghiên cứu

- Dầu dừa VCO được sản xuất và tài trợ bởi công ty TNHH chế biến dừa Lương Quới (tỉnh Bến Tre, Việt Nam).
- Lypozyme TL 100L là chế phẩm enzyme công nghiệp, dạng lỏng, màu vàng nâu, được trích ly từ nấm *Thermomyces lanuginosus*, đặc hiệu vị trí xúc tác sn – 1,3 trên mạch triglyceride, được cung cấp bởi hãng Novozymes (Đan Mạch).
- Lypozyme TL IM là chế phẩm enzyme cố định, dạng bột, màu trắng, được trích ly từ nấm *Thermomyces lanuginosus*, đặc hiệu vị trí xúc tác sn – 1,3 trên mạch triglyceride, được cung cấp bởi hãng Novozymes (Đan Mạch).
- *Candida rugosa* lipase (CRL), ký hiệu L1754, Type VII, được cung cấp bởi hãng Sigma – Aldrich (Mỹ). CRL là chế phẩm enzyme tự do, màu trắng, dạng bột, có nguồn gốc từ nấm *Candida rugosa*, không đặc hiệu vị trí xúc tác trên mạch triglyceride.
- Porcine pancreas lipase (PPL), ký hiệu L3126, Type II, được cung cấp bởi hãng Sigma – Aldrich (Mỹ). PPL là chế phẩm enzyme tự do, màu trắng, dạng bột, có nguồn gốc từ tuyến tụy lợn, đặc hiệu vị trí xúc tác sn – 1,3 trên mạch triglyceride.
- Chủng vi khuẩn được dùng để thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của các tổ hợp acid béo tự do là *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 11774), *Escherichia coli* (ATCC 25922) và

Salmonella enteritidis (ATCC 13076). Tất cả được cung cấp bởi Microbiologics, Inc. (St. Cloud, Minnesota, USA).

- Chuột đực giống Wistar 8 tuần tuổi, trọng lượng trung bình khoảng 30 gam/con, được cung cấp bởi viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh.
- Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu có xuất xứ từ hãng Merck & Co. (Đức), Sigma Chemical Co. (Hoa kỳ) và được cung cấp bởi Công ty hóa chất Hóa Nam (Việt Nam).

2.2 Phương pháp nghiên cứu



Hình 2.1 Sơ đồ nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu của luận án được chia làm 3 phần: Phần 1. Nghiên cứu quá trình thủy phân dầu VCO bởi bốn loại enzyme lipase khác nhau. Phần 2. Nghiên cứu thu nhận sản phẩm sau thủy phân gồm các phân đoạn acid béo tự do mạch trung bình, acid lauric và acid béo mạch dài. Phần 3. Khảo sát hoạt tính sinh học của các phân đoạn acid béo này đến khả năng kháng 4 loại vi khuẩn thường gây bệnh trong thực phẩm. Đồng thời, khảo sát tác động của chúng đến hàm lượng cholesterol trong máu.

2.2.1 Khảo sát quá trình thủy phân dầu VCO bởi bốn loại enzyme lipase khác nhau.

Mục đích của phần nghiên cứu này là tìm được các điều kiện thủy phân phù hợp của từng loại enzyme lipase xúc tác quá trình thủy phân dầu VCO, từ đó xác định qui luật xúc tác phản ứng thủy phân dầu VCO của từng loại enzyme lipase. Xác định hằng số Michaelis Menten K_m và vận tốc phản ứng cực đại V_{max} đặc trưng cho mỗi enzyme, từ đó nhận định được ái lực liên kết của mỗi loại enzyme với cơ chất là dầu VCO. Xác định qui luật xúc tác phản ứng thủy phân dầu VCO của mỗi loại enzyme lipase.

2.2.2 Thu nhận các phân đoạn acid béo tự do

Mục đích của phần nghiên cứu này là thu nhận các phân đoạn acid béo tự do có chiều dài mạch cacbon như mong muốn. Trong đó, tổ hợp acid béo FFA1 chứa chủ yếu các acid béo tự do mạch trung bình (C6 – C12), FFA2 chứa chủ yếu acid lauric (C12) và FFA3 chứa chủ yếu acid béo tự do mạch dài (C14 – C18).

2.2.3 Khảo sát hoạt tính sinh học của các phân đoạn acid béo tự do.

Mục đích của phần nghiên cứu này là xác định hoạt tính sinh học của từng phân đoạn acid béo FFA1, FFA2 và FFA3. Xác định qui luật kháng khuẩn và qui luật tác động đến hàm lượng cholesterol trong máu của các phân đoạn acid béo tự do từ dầu VCO.

2.3 Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần, phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm R version 3.1.3 (cập nhật ngày 03-09-2015). Dữ liệu được trình bày dưới dạng độ lệch chuẩn \pm trung bình. Riêng các thí nghiệm trên động vật, sự khác biệt giữa các nhóm được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp phân tích phương sai (Nested ANOVA) trước khi sử dụng Duncan, giá trị có ý nghĩa thống kê khi $p < 0.05$.

CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1 Nghiên cứu quá trình thủy phân dầu VCO bởi 4 loại enzyme lipase

3.1.1. Ảnh hưởng của tỉ lệ VCO/đệm (w/w), tỉ lệ enzyme/ cơ chất, pH và nhiệt độ đến mức độ thủy phân dầu VCO bởi 4 loại enzyme lipase

Bốn yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân dầu VCO xúc tác bởi enzyme lipase đã được khảo sát và tóm tắt như sau: enzyme Lypozyme TL100L và PPL sử dụng như tỉ lệ dầu/đệm là như nhau 1/4, tuy nhiên với enzyme cố định Lypozyme TL IM thì tỉ lệ này là thấp nhất 1/3 và cao nhất là CRL 1/5. Tỉ lệ enzyme /cơ chất của từng loại enzyme rất khác nhau, thấp nhất là enzyme Lypozyme TL IM 1.2U/gVCO, kế đến là Lypozyme TL 100L 430U/gVCO, enzyme PPL 908U/gVCO và sau cùng tỉ lệ enzyme CRL/VCO là 5310U/g. Trong khi enzyme Lypozyme TL 100L và CRL phù hợp với giá trị pH trung tính 7.0 thì enzyme PPL phù hợp với pH 7.5 và pH của Lypozyme TL IM 8.0. Enzyme Lypozyme TL IM phù hợp ở nhiệt độ cao nhất trong bốn loại lipase khảo sát là 65°C, kế đến là enzyme Lypozyme TL 100L 50°C, CRL và PPL phù hợp ở cùng 40°C.

3.1.2 Động học enzyme lipase

3.1.2.1 Động học enzyme Lypozyme TL 100L

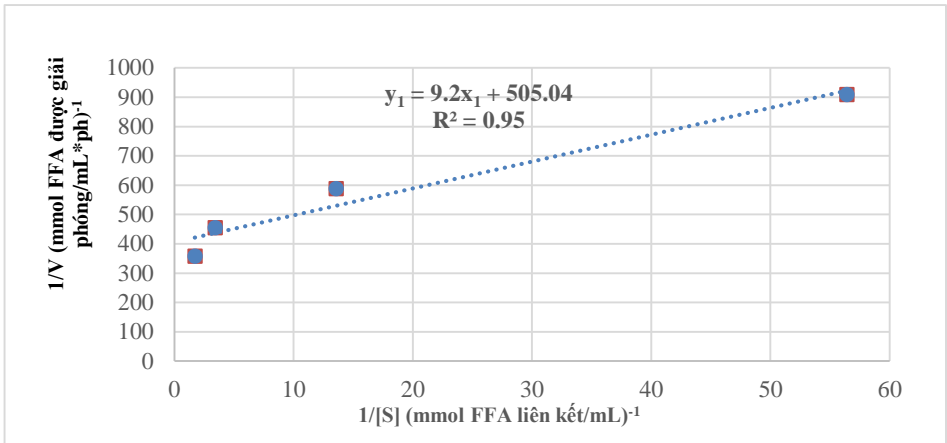
Từ kết quả khảo sát ở phần 3.1.1, điều kiện thủy phân dầu VCO bằng enzyme Lypozyme TL 100L thích hợp như sau: tỉ lệ dầu/đệm là 1/4; tỉ lệ enzyme/cơ chất là 430U/gVCO; ở pH 7.0 và nhiệt độ 50°C. Điều kiện phản ứng này được

sử dụng để khảo sát động học enzyme Lipozyme TL 100L. Vận tốc phản ứng thủy phân dầu VCO ở các nồng độ cơ chất ban đầu khác nhau, đồng thời, các giá trị $\frac{1}{[S]}$ và $\frac{1}{v}$ cũng được xác định và trình bày như trong bảng 3.4

Bảng 3.4 Vận tốc phản ứng thủy phân dầu VCO bởi enzyme Lipozyme TL100L ở các nồng độ cơ chất ban đầu khác nhau

STT	Phương trình Michaelis – Menten		Phương trình Lineweaver –Burk	
	Nồng độ cơ chất ban đầu [S] (mmol FFA/mL)	Vận tốc phản ứng V(mmol FFA được giải phóng/mL*phút)	$\frac{1}{[S]}$ (mmol FFA/mL) ⁻¹	$\frac{1}{v}$ (mmol FFA được giải phóng/mL*phút) ⁻¹
1	0.58	0.0028	1.72	357.1
2	0.29	0.0022	3.41	454.5
3	0.07	0.0017	13.56	588.2
4	0.02	0.0011	56.4	909.1

Mối quan hệ giữa nghịch đảo của nồng độ cơ chất và vận tốc phản ứng thủy phân dầu VCO bởi enzyme Lypozyme TL 100L được biểu diễn dưới dạng đồ thị y_1 , theo mô hình được đưa ra bởi Lineweaver – Burk như hình 3.5



Hình 3.5 Mối liên hệ giữa $\frac{1}{[S]}$ và $\frac{1}{V}$ của phản ứng thủy phân dầu VCO bởi enzyme Lypozyme TL 100L được biểu diễn dưới dạng đồ thị Lineweaver – Burk

Các thông số động học K_m và V_{max} của enzyme Lypozyme TL 100L xúc tác phản ứng thủy phân dầu VCO được trình bày trong bảng 3.8

Tương tự như trên, động học enzyme Lypozyme TL IM, CRL và PPL được khảo sát dựa vào điều kiện thủy phân phù hợp của từng loại enzyme với cơ chất dầu VCO như đã trình bày ở mục 3.1.1 và giá trị K_m , V_{max} đặc trưng của mỗi loại enzyme được trình bày ở mục 3.1.2.5

3.1.2.2 Động học enzyme Lypozyme TL IM

3.1.2.3 Động học enzyme CRL

3.1.2.4 Động học enzyme PPL

3.1.2.5 So sánh động học của 4 loại enzyme lipase xúc tác phản ứng thủy phân dầu VCO

Sau khi xác định được các phương trình nghịch đảo được đưa ra bởi Lineweaver – Burk, các thông số động học K_m và V_{max} của mỗi loại enzyme được xác định và trình bày ở bảng 3.8

Bảng 3.8 Thông số động học của bốn loại enzyme lipase

Thông số khảo sát	TL100L	TL IM	CRL	PPL
Hằng số Michaelis – Menten K_m (mmol FFA được giải phóng/mL)	0.018	0.057	0.008	0.011
Vận tốc phản ứng cực đại V_{max} (μ mol FFA được giải phóng/mL*phút)	1.9	1.5	3.3	1.1

Theo bảng 3.8, trong bốn loại enzyme lipase khảo sát thì enzyme CRL có vận tốc phản ứng là cao nhất (V_{max} lớn nhất), hơn nữa, giá trị K_m của enzyme CRL lại nhỏ nhất, điều này có nghĩa là khi gần hết cơ chất thì vận tốc phản ứng thủy phân dầu VCO được xúc tác bởi enzyme CRL mới bắt đầu giảm. Do vậy, quá trình thủy phân dầu VCO được xúc tác bởi enzyme CRL sẽ đạt được mức độ thủy phân cao trong thời gian ngắn.

Bên cạnh đó, enzyme Lypozyme TL 100L có vận tốc phản ứng lớn hơn hai enzyme Lypozyme TL IM và PPL lần lượt là 1.3 và 1.7 lần, nhưng nhỏ hơn vận tốc phản ứng của enzyme CRL 1.7 lần. Thêm vào đó, giá trị K_m của enzyme TL100L lớn hơn enzyme CRL và PPL lần lượt là 2.3 và 1.6 lần, nhưng nhỏ hơn giá trị K_m của enzyme TL IM 3.2 lần. Do đó, phản ứng thủy phân dầu VCO được xúc tác bởi enzyme TL100L sẽ mất thời gian dài hơn so với xúc tác bởi enzyme CRL mới đạt đến mức độ thủy phân (HD) cao nhất. Nếu xét trong cùng một khoảng thời gian thủy phân dầu VCO nhất định thì giá trị HD được xúc tác bởi enzyme TL100L sẽ lớn hơn giá trị HD được xúc tác bởi enzyme TL IM và PPL nhưng nhỏ hơn giá trị HD được xúc tác bởi enzyme CRL.

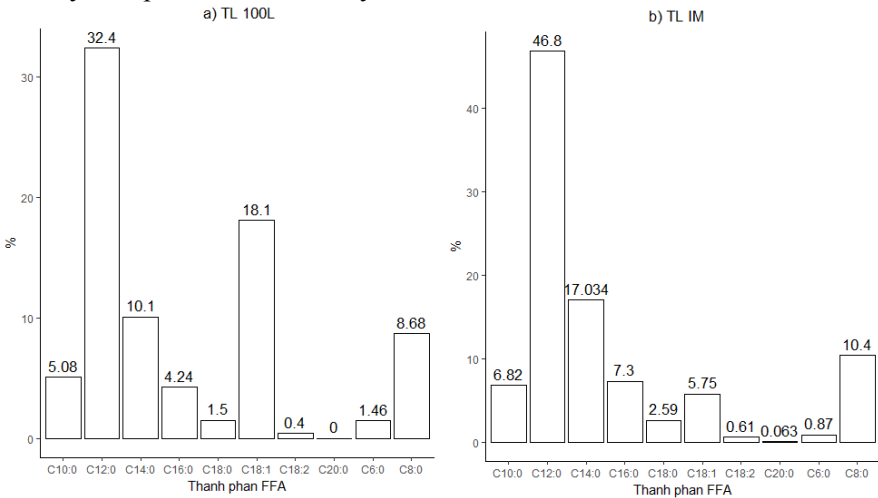
Mặc dù giá trị K_m của enzyme PPL nhỏ hơn enzyme TL IM 5.2 lần nhưng vận tốc phản ứng cực đại V_{max} của enzyme TL IM cao hơn V_{max} của PPL gấp 1.4 lần nên vận tốc phản ứng thủy phân dầu VCO được xúc tác bởi enzyme PPL cao hơn enzyme TL IM 3.8 lần, điều này dẫn đến vận tốc phản ứng thủy phân

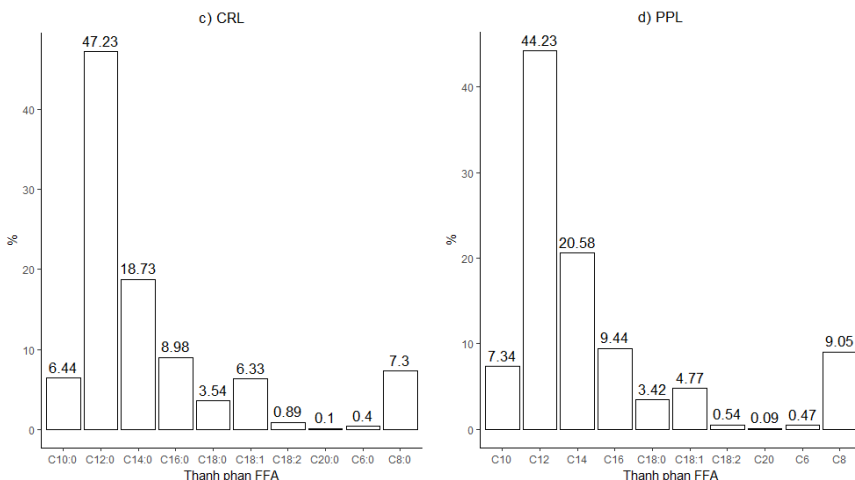
đầu VCO xúc tác bởi enzyme PPL sẽ giảm nhanh hơn so với enzyme TL IM khi nồng độ cơ chất dần tiến về giá trị 0. Kết quả là, quá trình thủy phân dầu VCO được xúc tác bởi enzyme PPL sẽ đạt được giá trị HD cao nhất sớm hơn so với xúc tác bởi enzyme TL IM

3.2 Thu nhận các phân đoạn acid béo tự do

3.2.1 Thu nhận sản phẩm sau thủy phân (FFA và HVCO)

Sau khi xác định thời gian thủy phân dầu VCO được xúc tác bởi mỗi loại enzyme lipase nhằm đạt được mức độ thủy phân cao nhất, kết thúc phản ứng, thu nhận sản phẩm gồm các acid béo tự do (FFA) và dầu thủy phân chưa hoàn toàn (HVCO). Kết quả phân tích sắc ký khí với đầu dò ion hóa ngọn lửa về thành phần và hàm lượng FFA được giải phóng từ dầu VCO thủy phân bởi mỗi loại enzyme lipase được trình bày ở hình 3.11.





Hình 3.11 Thành phần FFA được giải phóng bởi 4 loại enzyme lipase.

Nhìn chung, trong 4 loại enzyme lipase xúc tác phản ứng thủy phân dầu VCO để thu nhận các acid béo tự do thì chỉ có enzyme Lypozyme TL 100L giải phóng MCFA với hàm lượng thấp nhất là 47.62%, trong khi đó, ba loại enzyme còn lại giải phóng MCFA chiếm hàm lượng từ 60 đến 64% trong hỗn hợp FFA (phụ lục 1.11). Do đó, để thu được hàm lượng MCFA cao từ dầu VCO, có thể chọn sử dụng enzyme TL IM, CRL hoặc PPL để xúc tác phản ứng thủy phân. Tuy nhiên, trong ba loại enzyme lipase này thì enzyme CRL có vận tốc phản ứng lớn nhất (lần lượt gấp 2.2 và 3 lần so với enzyme TL IM và PPL tương ứng). Bên cạnh đó, giá trị K_m của enzyme CRL nhỏ hơn giá trị K_m của hai enzyme TL IM và PPL lần lượt là 7 và 1.4 lần. Điều này có nghĩa là enzyme CRL xúc tác phản ứng thủy phân dầu VCO sẽ đạt được mức độ thủy phân cao trong thời gian ngắn hơn so với hai enzyme TL IM và PPL. Tóm lại, trong 4 loại enzyme lipase khảo sát thì enzyme CRL xúc tác thủy phân dầu VCO đáp ứng tốt nhất mục tiêu đề ra. Do đó, enzyme CRL được chọn để thủy phân dầu VCO cho các nghiên cứu sau.

3.2.2 Thu nhận các phân đoạn acid béo tự do FFA1, FFA2, FFA3

Hỗn hợp FFA được giải phóng từ dầu VCO thủy phân bởi enzyme CRL chứa chủ yếu là các acid béo tự do bão hòa, có chiều dài mạch cacbon từ C6 đến C18. Hỗn hợp FFA này được chưng cất chân không phân đoạn nhằm thu nhận các phân đoạn acid béo có chiều dài mạch cacbon như sau:

- FFA1: nhóm MCFA có thành phần chủ yếu là C6-C10 chiếm 67,14%
- FFA2: nhóm MCFA có thành phần chủ yếu là acid lauric chiếm 76,5%

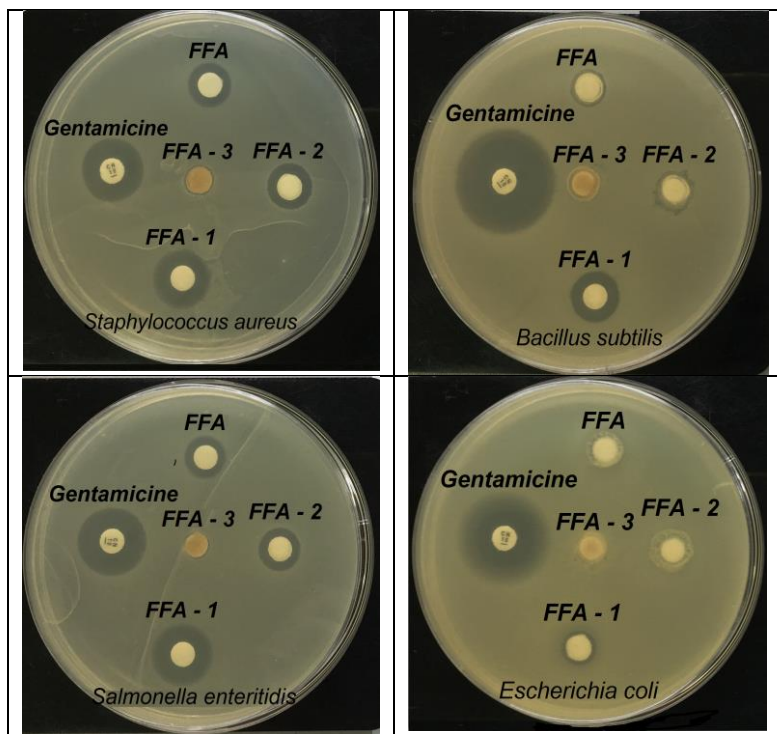
- FFA3: nhóm LCFA gồm C14-C18 chiếm 87,7%

Phân đoạn 1 (FFA1), được thu nhận ở áp suất 7.5mmHg và nhiệt độ 145 – 150°C chiếm tỉ lệ 12.6% khối lượng. Tỉ lệ của phân đoạn 2 (FFA2) là 38.4%, được thu nhận ở cùng áp suất với phân đoạn 1 và nhiệt độ 160 – 165°C; phần còn lại trong bình cầu là phân đoạn 3 (FFA3) chiếm tỉ lệ cao nhất là 49.0%.

3.3 Hoạt tính sinh học của các phân đoạn acid béo tự do

3.3.1 Hoạt tính kháng khuẩn của các phân đoạn acid béo tự do

Khả năng kháng khuẩn của các phân đoạn acid béo tự do có chiều dài mạch cacbon khác nhau như FFA1, FFA2 và FFA3 được so sánh với khả năng kháng khuẩn của FFA tổng trên bốn chủng vi khuẩn thử nghiệm là *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 11774), *Escherichia coli* (ATCC 25922) và *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076). Kết quả này được trình bày ở hình 3.16 và bảng 3.11.



Hình 3.16 Đường kính kháng khuẩn của FFA1, FFA2, FFA3 và FFA tổng trên 4 loại vi khuẩn thử nghiệm

Bảng 3.11 Đường kính kháng khuẩn của các phân đoạn FFA1, FFA2, FFA3 và FFA tổng

Vi khuẩn	Đường kính kháng khuẩn (mm) ± SD			
	FFA1	FFA2	FFA3	FFA tổng
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	15.67±0.5 ^a	11.33±0.5 ^b	6 ^c	10.33±0.5 ^b
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 11774)	11.67±0.1 ^a	9.67±0.05 ^b	6 ^c	9.67±0.05 ^b
<i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 13076)	14.67±0.5 ^a	11.67±0.5 ^b	6 ^c	10.67±0.5 ^b
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	9±0 ^a	8±1 ^{ab}	6 ^c	7.67±0.5 ^b

Các chữ cái a, b, c trên cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0.05$)

Kết quả thực nghiệm ở hình 3.16 và bảng 3.11 cho thấy, tổ hợp các acid béo tự do tại phân đoạn 1, 2 (FFA1, FFA2) và FFA tổng có khả năng kháng lại 4 loại vi khuẩn thử nghiệm. Trong khi đó, tổ hợp các acid béo tự do tại phân đoạn 3 (FFA3) không thể hiện tính kháng khuẩn đối với 4 loại vi khuẩn kể trên. Trong ba hỗn hợp acid béo kháng khuẩn kể trên thì FFA1 thể hiện khả năng kháng khuẩn mạnh nhất, đặc biệt đối với vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, tiếp đến là FFA2 và sau cùng là FFA tổng. Mặc dù sự khác biệt giữa đường kính kháng khuẩn của FFA2 và FFA tổng chưa có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0.05$), nhưng điều này cho thấy FFA2 có xu hướng kháng lại bốn loại vi khuẩn thử nghiệm mạnh hơn FFA tổng.

3.3.2 Hoạt tính của các phân đoạn acid béo tự do tác động đến hàm lượng cholesterol trong máu

Hoạt tính của các phân đoạn acid béo tự do có chiều dài mạch carbon khác nhau tác động lên trọng lượng và chỉ số sinh hóa máu của chuột được cho ăn chế độ giàu béo (HFD) được trình bày ở bảng 3.12, 3.13 và hình 3.17.

3.3.2.1 Thay đổi trọng lượng ở chuột

Bảng 3.12 Sự thay đổi trọng lượng chuột ở các chế độ điều trị khác nhau.

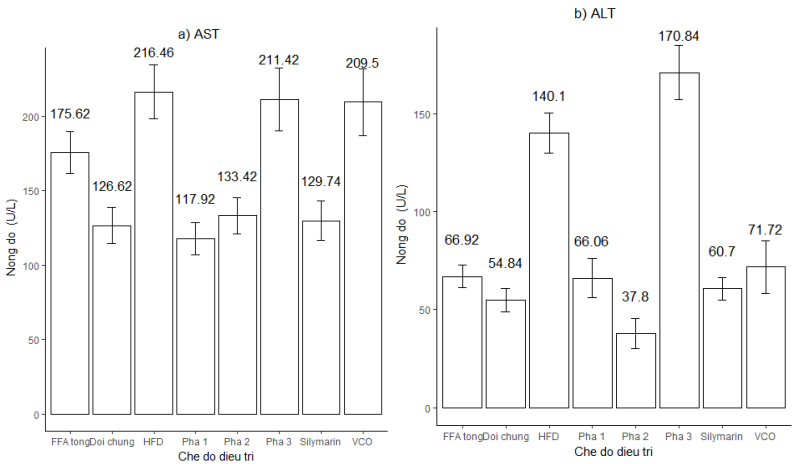
Nhóm TN	Thí nghiệm	Trọng lượng chuột ngày bắt đầu (g)	Trọng lượng chuột ngày kết thúc (g)	Trọng lượng gan tương đối (g/100g)
A	Đối chứng	31.12 ± 0.74 ^a	33.86 ± 1.03 ^b	4.09 ± 0.30 ^a
B	HFD	31.25 ± 1.01 ^a	37.78 ± 1.31 ^{de}	5.31 ± 0.22 ^b
C	HFD + Silyamarin	31.41 ± 1.07 ^a	35.20 ± 1.14 ^{bc}	4.14 ± 0.28 ^a
D	HFD + VCO	31.65 ± 0.75 ^a	38.76 ± 1.02 ^e	4.27 ± 0.28 ^a
E	HFD + FFA	31.30 ± 0.95 ^a	35.05 ± 1.22 ^{bc}	4.32 ± 0.25 ^a
F	HFD + FFA pha 1	31.25 ± 1.05 ^a	34.32 ± 1.07 ^b	5.55 ± 0.19 ^b
G	HFD + FFA pha 2	32.24 ± 1.13 ^a	30.86 ± 1.89 ^a	4.48 ± 0.52 ^a
H	HFD + FFA pha 3	32.23 ± 1.29 ^a	36.69 ± 1.34 ^{cd}	5.43 ± 0.38 ^b

(Các chữ cái a, b, c, d, e trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt giữa các nhóm)

Kết quả quan sát thực nghiệm và số liệu ghi nhận trong thời gian thí nghiệm cho thấy, sự thay đổi cân nặng của chuột ở các chế độ điều trị khác nhau (bảng 3.12). Thời điểm bắt đầu thí nghiệm, cân nặng của các lô chuột là tương đương nhau và sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Sau 28 ngày thí nghiệm, nhóm B – chuột được ăn chế độ HFD, nhận thấy rằng, có sự tăng cân nhanh chóng (37.78 ± 1.31^{de}) so với nhóm A – chuột đối chứng (33.86 ± 1.03^b , $p < 0,05$), tăng khoảng 21% trọng lượng cơ thể. Kết quả của lô chuột ăn chế độ HFD kết hợp uống VCO (nhóm D) và lô ăn HFD kết hợp uống FFA3 (nhóm H) thì cho thấy rằng, VCO và FFA3 không làm giảm trọng lượng của chuột, so với chuột chỉ ăn HFD (38.76 ± 1.02^e và 36.69 ± 1.34^{cd} so với 37.78 ± 1.31^{de} , $p > 0,05$). Điều này có nghĩa là, VCO và FFA3 không có tác dụng hỗ trợ giảm cân trong trường hợp chuột bị béo phì. Ngược lại, ở các thí nghiệm khác như sử dụng Silymarin, FFA tổng, FFA ở pha 1 và 2 có tác động tích cực đến việc ức chế sự gia tăng trọng lượng cơ thể chuột, đặc biệt là nhóm G-chuột được ăn HFD kết hợp uống FFA pha 2 cho thấy kết quả không thể hiện dấu hiệu của sự tăng cân

khi so với chuột đối chứng nhóm-A, thậm chí trọng lượng chuột ở nhóm G còn giảm so với nhóm A (30.86 ± 1.89^a và 33.86 ± 1.03^b , $p < 0,05$). Và ở kết quả trọng lượng tương đối gan chuột sau quá trình thí nghiệm với các chế độ khác nhau cho thấy các nhóm B, F và H, khi cho chuột ăn chế độ HFD, HFD kết hợp uống FFA1 và HFD kết hợp uống FFA3 thì sau 28 ngày, trọng lượng gan cao hơn hẳn so với nhóm A-chuột đối chứng (5.31 ± 0.22^b , 5.55 ± 0.19^b và 5.43 ± 0.38^b so với 4.09 ± 0.3^a g / 100g, $p < 0,05$). Điều này được dự đoán là có liên quan đến sự thay đổi hình thái của gan đối với các lô chuột đã sử dụng chế độ ăn trên, ví dụ như hiện tượng viêm gan hoặc gan nhiễm mỡ. Hiện tượng này sẽ được giải thích sáng tỏ hơn khi kết hợp với kết quả sinh hóa máu mục 3.3.2.2 và nhuộm HE mô gan ở mục 3.3.2.3.

3.3.2.2 Kết quả sinh hóa máu



Hình 3.17 Sự thay đổi chỉ số enzyme a) Aspartate transaminase (AST) và b) Alanine transaminase (ALT) với chế độ ăn HFD kết hợp với uống các tác nhân điều trị khác nhau

Bảng 3.13 Ảnh hưởng của các chế độ ăn và điều trị khác nhau lên chỉ số sinh hóa máu.

Nhóm TN	Thí nghiệm	Total cholesterol (mmol/L)	Triglyceride (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)
A	Đối chứng	3.38±0.19 ^e	0.62±0.08 ^{cd}	2.34±0.24 ^{bc}	0.75±0.09 ^c
B	HFD	4.57±0.16 ^{bc}	0.84±0.14 ^{ab}	2.09±0.23 ^{cd}	1.29±0.22 ^a
C	HFD + Silymarin	4.13±0.24 ^d	0.77±0.13 ^{abc}	2.22±0.20 ^{bcd}	0.89±0.20 ^c
D	HFD + VCO	4.19±0.13 ^{cd}	0.61±0.06 ^d	1.96±0.14 ^{de}	1.12±0.22 ^{ab}
E	HFD + FFA	5.88±0.31 ^a	0.70±0.14 ^{bcd}	2.96±0.16 ^a	1.20±0.06 ^{ab}
F	HFD + FFA1	4.05±0.41 ^d	0.57±0.09 ^d	2.02±0.21 ^{de}	1.20±0.21 ^{ab}
G	HFD + FFA2	4.80±0.16 ^b	0.82±0.08 ^{ab}	2.42±0.21 ^b	0.98±0.11 ^{bc}
H	HFD + FFA3	3.33±0.39 ^e	0.86±0.6 ^a	1.73±0.20 ^e	0.44±0.17 ^d

(Các chữ cái a, b, c, d, e trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt giữa các nhóm)

Kết quả phân tích từ thực nghiệm cho thấy có sự ảnh hưởng đối với các thông số sinh hóa máu và mức độ tổn thương gan thông qua 2 chỉ số ALT và AST được giải phóng sau thời gian chuột ăn chế độ giàu béo và điều trị bằng những tác nhân khác nhau (hình 3.17 và bảng 3.13).

Trên tất cả các lô chuột đã sử dụng chế độ ăn HFD, từ nhóm B đến H, hàm lượng cholesterol tổng trong máu đều tăng khá cao so với chuột nhóm A đối chứng. Riêng nhóm H có sự giảm cholesterol tổng khi cho chuột ăn HFD kết hợp với uống FFA3. Như vậy có thể kết luận rằng HFD đã làm tăng cholesterol tổng và FFA3 có tác dụng làm hạ cholesterol.

Việc sử dụng chế độ ăn HFD cho chuột (nhóm B) đã làm tăng đáng kể chỉ số ALT, AST, hàm lượng cholesterol tổng trong máu và tăng hàm lượng LDL-cholesterol (cholesterol “xấu”), trong khi giảm nồng độ HDL-cholesterol (cholesterol “tốt”) so với chuột đối chứng không bệnh (nhóm A).

Ở kết quả thí nghiệm nhóm C của chế độ ăn HFD kèm với thuốc chuyên trị Silymarin đã làm giảm đáng kể chỉ số ALT, AST và khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so với chế độ ăn HFD (nhóm B).

Ở nhóm H, việc sử dụng FFA pha 3 kết hợp với chế độ ăn HFD đã khiến cho chỉ số ALT (170.84 ± 13.78 U/L) cao hơn cả chỉ số ALT ở nhóm B, chuột chỉ ăn HFD (140.10 U/L ± 10.22 , $p < 0.05$) trong khi đó chỉ số AST thì tương đương với chuột chế độ ăn HFD (211.42 ± 21.14 và 216.46 ± 18.07 , $p > 0.05$).

Kết quả trên nhóm D cho thấy, VCO chỉ có thể làm giảm được chỉ số ALT và hàm lượng triglyceride, còn các chỉ số cholesterol tổng, LDL cholesterol và HDL cholesterol khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0.05$) so với nhóm B là lô chuột ăn HFD.

Trong khi đó, nhóm F, chuột được cho ăn chế độ HFD kết hợp uống FFA1 chứa chủ yếu các MCFA, không chỉ làm giảm chỉ số ALT và AST (66.06 ± 10.01^{cd} và $117.92 \pm 10.81^{\circ}$ U/L) so với chuột nhóm B ăn chế độ HFD (140.10 ± 10.22 và 216.46 ± 18.07 , $p < 0.05$) mà còn đưa chỉ số này về mức độ ban đầu khi so với chuột đối chứng không bệnh (54.84 ± 5.8^d và $126.62 \pm 12^{\circ}$). Đồng thời, hàm lượng triglyceride ở chuột nhóm F cũng giảm đáng kể khi so với chuột nhóm B, như trên bảng 3.13.

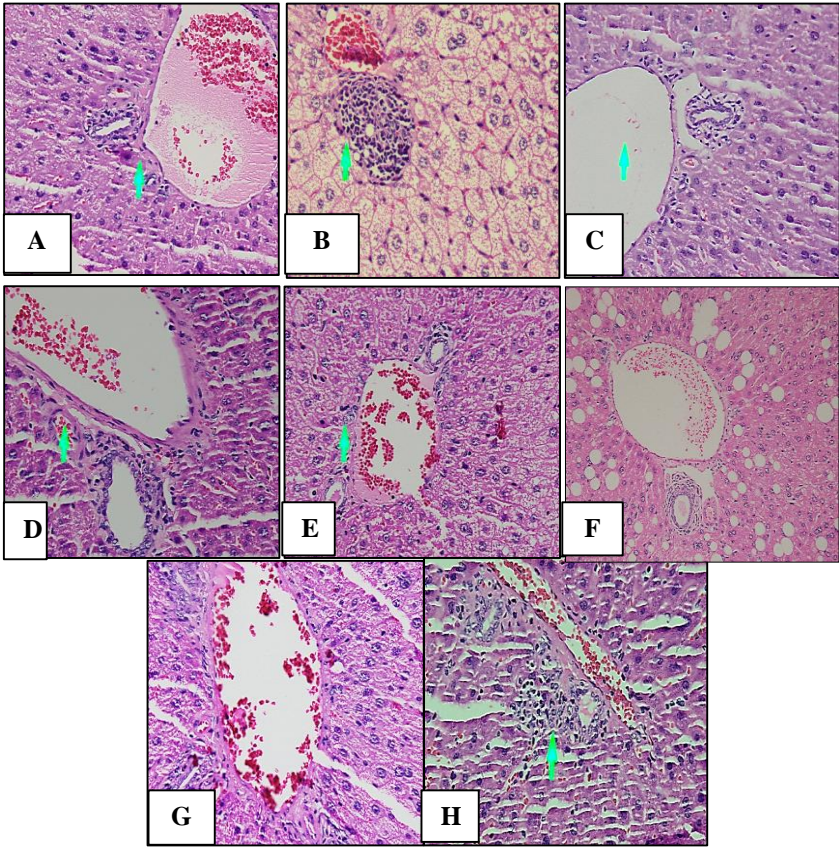
Ở chuột nhóm G, với chế độ điều trị bằng FFA pha 2, chỉ số ALT và AST cũng giảm đáng kể (37.80 ± 7.60 và 133.42 ± 12.13) khi so với nhóm B-chuột chế độ ăn HFD. Mặc dù hàm lượng cholesterol tổng ở chuột điều trị bằng FFA pha 2 và chuột chế độ HFD là tương đương nhau (4.80 ± 0.16 và 4.57 ± 0.16 , $p > 0.05$), nhưng nguyên nhân là do FFA2 đã làm gia tăng đáng kể chỉ số HDL-cholesterol (cholesterol “tốt”) khi so với chuột ăn chế độ HFD (2.42 ± 0.21 và 2.09 ± 0.23 , $p < 0.05$), đây có thể xem là ưu điểm của FFA2. Nguyên nhân có thể là do cơ chế hấp thu MCFA không đi qua con đường bạch huyết nên ít tích tụ chất béo ở mô mỡ.

Nhìn chung, trong số các chế độ điều trị, việc sử dụng FFA1 và FFA2 cho kết quả tốt nhất, cho thấy rõ ràng sự giảm chỉ số ALT và AST, tăng chỉ số cholesterol “tốt” HDL và giảm cholesterol “xấu” LDL. Do đó, có thể kết luận rằng, việc loại bỏ các phân đoạn chứa acid béo mạch dài LCFA, như FFA3, đã làm tăng hiệu quả trong việc cải thiện các chỉ số sinh hóa máu dẫn đến giảm thương tổn cho gan bởi chế độ ăn giàu béo gây ra.

Tuy nhiên, như đã phân tích ở mục 3.3.2.1, trọng lượng gan tương đối của một số lô chuột tăng bất thường. Do đó, cần thiết giải phẫu mô gan của các lô chuột

thí nghiệm, đồng thời nhuộm Hematoxylin – Eosin, kết quả được trình bày ở mục 3.3.2.3.

3.3.2.3 Kết quả giải phẫu mô học



Hình 3.18 Kết quả giải phẫu mô học trên gan chuột.

Nhóm đối chứng: thức ăn cơ sở kết hợp uống nước cất (A), Nhóm HFD kết hợp uống nước cất (B), Nhóm HFD kết hợp uống Silymarin (C), Nhóm HFD kết hợp uống VCO (D), Nhóm HFD kết hợp uống FFA tổng (E), Nhóm HFD kết hợp uống FFA1 (F), Nhóm HFD kết hợp uống FFA2 (G), Nhóm HFD kết hợp uống FFA3 (H)

Theo kết luận của bác sĩ trong phần “chẩn đoán giải phẫu bệnh” (phụ lục phần 2) và kết quả thực nghiệm ở hình 3.18 đã thể hiện các tổn thương trên mô gan chuột ở chế độ ăn HFD và kết hợp uống các chất điều trị khác nhau. Chuột với

chế độ ăn HFD đã gây ra hiện tượng gan bị thoái hóa mỡ và viêm nhẹ khi so với điều kiện gan bình thường của chuột đối chứng không bệnh (hình 3.18B, hình 3.18A và phụ lục). Tình trạng viêm gan ở lô chuột này đã làm tăng chỉ số ALT và AST trong máu của chúng. Chuột với chế độ ăn HFD kết hợp uống Silymarin (hình 3.18C) đã chuyển tình trạng viêm của gan về trạng thái gan bình thường, hồi phục cấu trúc bình thường của gan (phụ lục phần 2). Điều này có thể thấy qua chỉ số ALT và AST của lô chuột điều trị bằng silymarin đã giảm về mức độ bình thường so với lô chuột đối chứng. Tương tự, ở nhóm D- chuột được ăn HFD kết hợp uống VCO và nhóm E- HFD kết hợp uống FFA tổng (hình 3.18D và hình 3.18E) cũng không cho thấy sự viêm nhiễm mô gan (phụ lục phần 2).

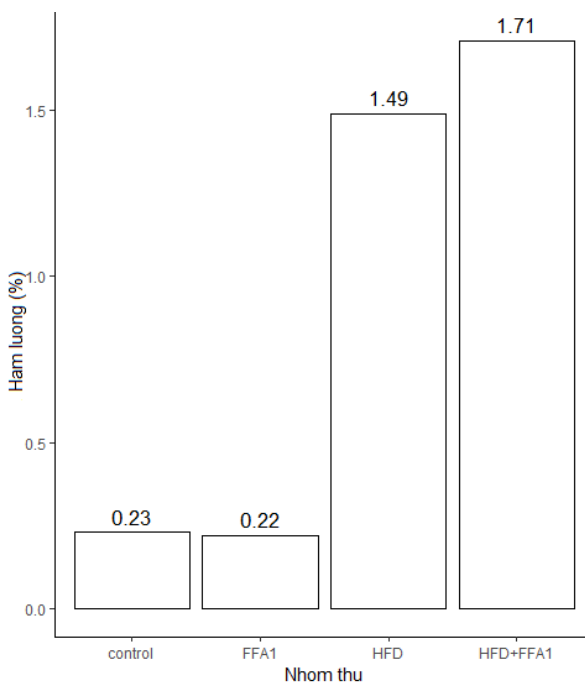
Kết quả giải phẫu mô gan của nhóm G- chuột ăn HFD kết hợp uống FFA2 đã cho thấy, cấu trúc mô gan bình thường và không có hiện tượng viêm gan (phụ lục phần 2). Điều này tương đương với kết quả phân tích sinh hóa máu của FFA ở pha 2. Như vậy, FFA2 không chỉ làm giảm chỉ số ALT, AST và tăng HDL cholesterol mà còn là chất chống viêm, như đã thể hiện kết quả “mô gan bình thường” ở hình 3.18G và phụ lục phần 2.

Ở nhóm H- Chuột giống Wistar được cho ăn chế độ HFD kết hợp uống FFA3 đã gây viêm nhẹ cho mô gan (phụ lục phần 2), hiện tượng này có thể được giải thích như sau, FFA ở pha 3 chứa hàm lượng lớn LCFA (87.94%), không có tác dụng điều trị, đã góp phần tích tụ béo, gây thoái hóa tế bào, gây ra hiện tượng viêm ở gan.

Kết quả giải phẫu và nhuộm HE mô gan của nhóm F- chuột ăn HFD kết hợp uống FFA1 cho thấy cấu trúc gan bình thường không bị viêm, điều này phù hợp với chỉ số sinh hóa đã phân tích ở trên. Tuy chỉ số ALT, AST đã giảm đáng kể ở nhóm này, nhưng kết quả mô học lại cho thấy hiện tượng “gan thoái hóa mỡ mức độ vừa” của chuột với sự xuất hiện của các hạt lipid trên hình 3.18F và phụ lục phần 2. Nhằm xác định các hạt chất béo trên mô gan chuột ở chế độ này có bản chất là cholesterol (vì trong chế độ ăn HFD, cholesterol được bổ sung trực tiếp 2% vào thức ăn cơ sở) hay các giọt chất béo này chính là các acid béo trong FFA1, chủ yếu là MCFA chiếm 97.3%. Do đó, bốn lô chuột thí nghiệm được cho ăn và uống như bảng 2.5 (chương 2) trong 28 ngày. Kết thúc thí nghiệm, mẫu gan được thu nhận, trích ly chất béo và phân tích sắc ký khí

với đầu dò ion hóa ngọn lửa để xác định thành phần acid béo và hàm lượng cholesterol trong mẫu. Kết quả này được trình bày ở mục 3.3.2.4.

3.3.2.4 Hàm lượng cholesterol trong gan ở các chế độ điều trị

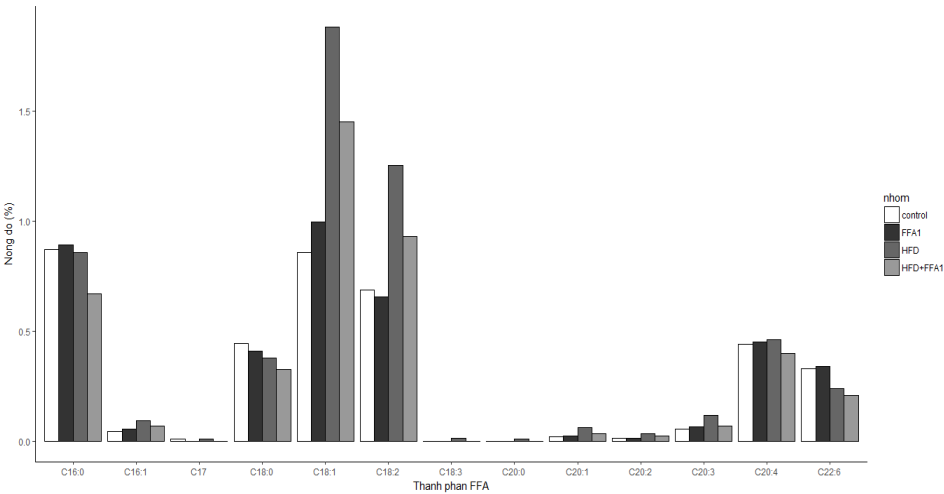


Hình 3.19 Hàm lượng cholesterol trong các mẫu thí nghiệm

Sau 28 ngày thí nghiệm, kết quả phân tích chỉ số cholesterol trong mô gan được thể hiện ở hình 3.19. Chỉ số cholesterol giữa các nhóm thể hiện sự khác biệt đáng kể, trong đó, nhóm ăn thức ăn cơ sở kết hợp uống FFA1, có hàm lượng cholesterol trong gan tương đương với nhóm đối chứng chỉ ăn thức ăn cơ sở kết hợp uống nước cất, tương ứng là 0.22 và 0.23%. Như vậy, bản chất của FFA1 không làm tăng hàm lượng cholesterol trong gan. Tuy nhiên, khi chuột được ăn chế độ HFD kết hợp với uống FFA1 thì hàm lượng cholesterol trong gan cao hơn hẳn nhóm đối chứng và cao hơn nhóm được nuôi ăn chế độ HFD kết hợp uống nước cất. Điều này được giải thích là do khẩu phần HFD nuôi ăn có tới 2% cholesterol được bổ sung, FFA1 chủ yếu là acid béo mạch trung bình (97.3%), khi vào cơ thể chuột thì MCFA được ưu tiên sử dụng trước để chuyển hóa trực tiếp thành năng lượng. Đối với lô chuột ăn HFD kết hợp uống FFA1,

có sự cạnh tranh giữa MCFA (từ FFA1) và LCFA (từ thức ăn HFD) trong quá trình hấp thụ, kết quả là, MCFA đã được ưu tiên sử dụng trước nên đủ năng lượng cung cấp cho nhu cầu hoạt động của cơ thể và cholesterol trong chế độ ăn HFD còn lại sau quá trình chuyển hóa hầu như không được sử dụng, điều này đã khiến cho lô chuột ăn HFD kết hợp uống FFA1 có hàm lượng cholesterol trong gan cao hơn nhóm chỉ ăn HFD. Trên cơ sở đó, giả thuyết rằng, các hạt chất béo xuất hiện trên mô gan của lô chuột ăn HFD kết hợp uống FFA1 (hình 3.18F) có bản chất là cholesterol chứ không phải là MCFA tích tụ. Để kiểm chứng giả thuyết này, mẫu gan được phân tích thành phần và hàm lượng acid béo có trong mẫu. Kết quả được trình bày ở mục 3.3.2.5

3.3.2.5 Thành phần acid béo trong gan ở các chế độ điều trị



Hình 3.20 Kết quả phân tích thành phần acid béo

Nhóm đối chứng: thức ăn cơ sở + nước cất (control), nhóm FFA1: thức ăn cơ sở + uống FFA1, nhóm HFD: ăn HFD + nước cất, nhóm ăn HFD + uống FFA1 (HFD+FFA1)

Mẫu gan được xác định thành phần acid béo đồng thời với việc phân tích hàm lượng cholesterol, kết quả được thể hiện ở hình 3.20. Kết quả phân tích cho thấy, ở bốn chế độ thí nghiệm, bao gồm lô chuột được ăn thức ăn cơ sở kết hợp uống nước cất, lô ăn thức ăn cơ sở kết hợp uống FFA1, lô ăn thức ăn giàu béo HFD kết hợp uống FFA1 và lô ăn HFD kết hợp uống nước cất, thành phần acid béo tồn tại trong gan có mạch cacbon từ C16 đến C22, tuyệt đối không có mặt của MCFA trong các mẫu phân tích. Kết quả này, một lần nữa đã chứng minh

rằng, trong quá trình chuyển hóa thì MCFA được ưu tiên hấp thụ trước, đồng thời, chúng được chuyển hóa trực tiếp thành năng lượng.

CHƯƠNG 4 KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1 Kết luận

Về mặt khoa học

Luận án đã rút ra được những kết luận mới sau:

- Bốn loại enzyme lipase được sử dụng để khảo sát quá trình thủy phân dầu dừa VCO là chế phẩm enzyme PPL, enzyme Lypozyme TL 100L, enzyme Lypozyme TL IM, đều đặc hiệu vị trí xúc tác sn-1,3 trên mạch triglyceride và chế phẩm enzyme CRL không đặc hiệu vị trí xúc tác. Kết quả là, enzyme CRL xúc tác phản ứng thủy phân dầu VCO có giá trị K_m nhỏ nhất và vận tốc phản ứng cực đại (V_{max}) cao nhất trong bốn loại enzyme lipase khảo sát.
- Hỗn hợp acid béo tự do (FFA tổng) thu được từ quá trình thủy phân dầu VCO có hoạt tính kháng khuẩn lên bốn loại vi khuẩn gồm *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 11774) và *Escherichia coli* (ATCC 25922). Sau khi tách phân đoạn hỗn hợp FFA tổng thì khả năng kháng khuẩn của các phân đoạn không giống nhau, thể hiện theo mức độ tăng dần như sau: FFA tổng < FFA2 < FFA1. Riêng FFA3 không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn lên cả bốn loại vi khuẩn trên.
- Các phân đoạn acid béo trên có ảnh hưởng khác nhau đến trọng lượng và chỉ số cholesterol của chuột giống Wistar được cho ăn chế độ giàu béo HFD như sau:
 - + FFA1 giúp giảm trọng lượng và giảm chỉ số cholesterol tổng ở chuột ăn chế độ HFD.
 - + FFA2 giúp giảm trọng lượng và tăng chỉ số cholesterol tốt (HDL-cholesterol).
 - + FFA3 không những làm tăng trọng lượng của chuột mà còn gây viêm gan. Tuy nhiên, chỉ số cholesterol trong máu giảm tương đương với chuột đối

chứng không bệnh.

Về mặt ứng dụng

Luận án đã xác định được:

- Các thông số công nghệ phù hợp của từng loại enzyme lipase xúc tác quá trình thủy phân dầu VCO như sau: enzyme Lypozyme TL 100L: tỉ lệ dầu/đệm là 1/4; tỉ lệ enzyme/cơ chất là 430U/gVCO; ở pH 7.0 và nhiệt độ 50°C; sau 42h xúc tác mức độ thủy phân đạt 76.83% và hàm lượng MCFA được giải phóng là 47.62%. Enzyme TL IM: tỉ lệ dầu/đệm là 1/3; tỉ lệ enzyme/cơ chất là 1.2U/gVCO; ở pH 8.0 và nhiệt độ 65°C; sau 28h xúc tác mức độ thủy phân đạt 56.68% và hàm lượng MCFA được giải phóng là 64.89%. Enzyme CRL: tỉ lệ dầu/đệm: 1/5 (w/w), tỉ lệ enzyme/cơ chất: 5310U/g, pH 7 và nhiệt độ 40°C, sau 16 giờ xúc tác đạt mức độ thủy phân lên đến 79.64% và hàm lượng MCFA được giải phóng đến 61.37%. Điều kiện thủy phân của enzyme PPL là: tỉ lệ dầu/đệm 1/4; tỉ lệ enzyme/cơ chất 908U/gVCO; ở pH 7.5 và nhiệt độ 40°C; sau 26h xúc tác mức độ thủy phân đạt 27.64% và hàm lượng MCFA được giải phóng là 61.09%.
- Ở nhiệt độ 145 – 150°C và áp suất 7.5mmHg, hỗn hợp acid béo tự do FFA1 chứa chủ yếu là các MCFA 97.31% được thu nhận. FFA2 được thu nhận ở cùng áp suất trên nhưng với nhiệt độ cao hơn là 160 – 165°C, thành phần chủ yếu là C12 chiếm tỉ lệ cao nhất trong hỗn hợp 76.49%. Phần còn lại trong bình cầu là FFA3 chứa chủ yếu các acid béo tự do mạch dài LCFA 85.86%.

4.2 kiến nghị

Cần có các nghiên cứu tiếp theo để khai thác hoạt tính sinh học của các sản phẩm MCFA từ dầu VCO thủy phân.