

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP LECITHIN CHỨC NĂNG CÓ SỬ DỤNG ENZYME LÀM CHẤT XÚC TÁC

SYNTHESIS OF STRUCTURED LECITHIN BY ENZYMATIC ACIDOLYSIS

Vũ Phương Lan

Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Kinh tế - Kỹ thuật Công nghiệp

Đến Tòa soạn ngày 26/4/2016, chấp nhận đăng ngày 20/5/2016

Tóm tắt: Tổng hợp phospholipid chức năng bằng cách cho phản ứng với axit béo tự do với sự xúc tác của enzyme. Tiến hành thí nghiệm với 3 dung môi hữu cơ là hexane, toluen và glycerol; và 1 thí nghiệm không sử dụng dung môi. Axit béo có nối đôi liên hợp linoleic (CLA) và lecithin được lựa chọn làm đối tượng nghiên cứu. Thành phần axit béo trong phân tử lecithin, và lecithin chức năng và phân tử PC và PE của lecithin hoặc lecithin chức năng được phân tách bằng TLC cũng được phân tích bằng sắc ký khí (GC). Kết quả sau 48 giờ phản ứng, lượng CLA liên kết vào lecithin cao nhất là 46,98 mol% trong phản ứng không sử dụng dung môi hữu cơ.

Từ khóa: Phospholipid, lecithin, phospholipid chức năng, CLA, GC.

Abstract: Structured lecithin was produced by lipase-catalyzed acidolysis in free and organic solvents (hexane, toluen, and glycerol). Conjugated linoleic acid (CLA) and lecithin were used in this research as reaction substrates. The fatty acid composition of lecithin, structured lecithin and also in PC and PE (separated by TLC) was analyzed GC. After 48h reaction in free solvent, 46.98 mole% CLA was incorporated into lecithin.

Keywords: Phospholipid, lecithin, functional phospholipid, CLA, GC.

1. PHẦN MỞ ĐẦU

Lecithin là tên thương mại của glycerophospholipid với nhiều tác dụng tốt cho sức khỏe. Nhiều nghiên cứu ảnh hưởng của phospholipid hay phospholipid có chứa các axit béo chức năng đã được nhiều nhà khoa học quan tâm. Szuhaj và Nieuwenhuyzen (2003) [1] cho rằng phosphatidylcholine chứa axit béo không no đa nối đôi có khả năng tăng cường chức năng tiêu hóa và tác động tới trí nhớ của não bộ người già. Hơn nữa, glycerophospholipid cũng được sử dụng nhiều trong công nghệ thực phẩm và dược phẩm nhờ tính chất lưỡng cực (amphiphilic) và hoạt động bề mặt của phân tử. Glycophospholipid được sử dụng như chất ổn định trong margarine; phụ

gia giảm độ nhớt trong sô cô la, và làm chất mang trong dược phẩm.

Tuy nhiên để đáp ứng một số yêu cầu trong sản xuất công nghiệp, dinh dưỡng hay một số yêu cầu cụ thể nào đó, phospholipid thường được thay đổi về cấu trúc bằng cách sử dụng tác nhân hóa học hoặc enzyme. Điều kiện phản ứng hóa học thường xảy ra ở nhiệt độ cao và thời gian dài và sản phẩm thường tối màu và nhiều sản phẩm phụ [2]. Phản ứng có sử dụng enzyme thì điều kiện nhẹ nhàng hơn, và hạn chế được sản phẩm phụ.

Hiện nay, tổng hợp phospholipid cấu trúc chứa axit béo chức năng sử dụng enzyme làm chất xúc tác được quan tâm [3]. Và, axit linoleic có nối đôi liên hợp (conjugated linoleic axit - CLA) một đồng phân của axit

linoleic, được biết đến như một axit béo cần thiết với nhiều lợi ích về mặt dinh dưỡng như tốt cho tim mạch, chống ung thư [4].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tổng hợp lecithin chức năng chứa CLA với sự có mặt của một số loại dung môi hữu cơ và sử dụng enzyme làm chất xúc tác.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Hỗn hợp conjugated linoleic axit (CLA) do Công ty Livemax (Sungnam, Hàn Quốc) cung cấp. Hỗn hợp axit này chứa tổng số 70% các loại đồng phân CLA (70 CLATM).

Enzyme Lipozyme RM IM (từ *Rhizomucor miehei*) của Công ty Novozymes (Đan Mạch).

Các dung môi sử dụng cho phân tích được mua từ Công ty Fisher Scientific (Norcross, Mỹ). Lecithin (3-sn-phosphatidylcholine sản xuất từ đậu tương) được mua từ Công ty Fluka (Sigma-Aldrich, Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tổng hợp lecithin chức năng có chứa axit CLA

Lecithin chức năng được tổng hợp trong lọ thí nghiệm 5 ml có nắp vặn, gồm lecithin (230 mg), CLA (504 mg) với tỷ lệ 1:6 (mol:mol) và 20% enzyme (147 mg). Phản ứng được tiến hành tại trong thiết bị ổn nhiệt ở nhiệt độ 55°C trong 48 h, hỗn hợp phản ứng được khuấy đảo bằng thanh khuấy từ với tốc độ 175 rpm. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu sử dụng enzyme lipozyme RI IM làm chất xúc tác với sự có mặt của các dung môi hữu cơ gồm: hexane, toluen và glycerin; và không sử dụng dung môi. Tiến hành lấy mẫu phân tích tại 3; 9; 12; 18; 24, 36 và 48 h.

Sau khi phản ứng kết thúc, tiến hành lọc hỗn hợp phản ứng bằng silanh Whatman PTFE 0,2 µm để loại enzyme. Axit béo tự do được loại bỏ bằng axetone lạnh.

2.2.2. Phân tách phosphatidylcholine (PC) và phosphatidylethanolamine (PE)

PC và PE của hỗn hợp phản ứng được phân tách bằng sắc ký bản mỏng (TLC) với pha động là chloroform - methanol - nước (60-30-10, tỷ lệ thể tích). Sau đó, PC và PE thu được từ bản sắc ký được cho vào các ống nghiệm riêng.

2.2.3. Phân tích thành phần axit béo

Mẫu thí nghiệm (khoảng 5 mg, hoặc thu được từ TLC) được đặt vào ống nghiệm có nắp vặn. Tiếp theo, BF₃ trong methanol (3 ml) và 50 µl heptadecanoic axit (chất nội chuẩn, 1 mg/ml trong hexane) được cho vào ống nghiệm. Mẫu được đặt vào tủ sấy trong 2 giờ tại nhiệt độ 90°C, rồi làm lạnh nhanh trong đá. Heptane (2 ml) được sử dụng để tách phần axit béo đã metyl hóa, và đem đi phân tích bằng GC.

Thành phần axit béo được phân tích bằng sắc ký khí (GC) HP 6890 với đầu dò FID. Cột sắc ký SP-Wax fused-silica capillary 60 m × 0,25 mm i.d. của Supelco được sử dụng cho phân tích này. Cột sắc ký được giữ tại 100°C trong 5 phút, sau đó tăng lên 220°C với tốc độ tăng nhiệt 4°C/phút, và giữ trong 30 phút. Khí N₂ được sử dụng làm khí mang với tốc độ 52 ml/phút ở chế độ split 50:1. Nhiệt độ bộ phận tiêm mẫu và đầu dò là 250°C.

2.2.4. Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Microsoft Office Excel 2007.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

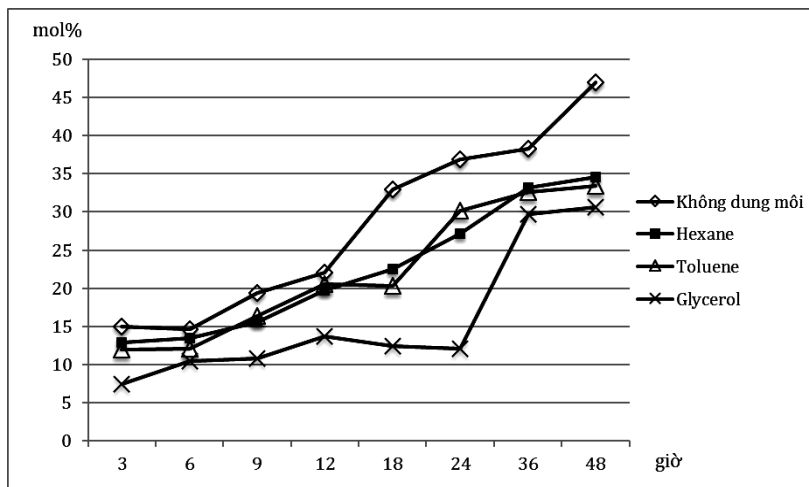
3.1. Khảo sát ảnh hưởng của dung môi hữu cơ đến khả năng kết hợp của CLA vào lecithin

Enzyme Lipozyme RM IM là một trong những enzyme được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu cũng như trong công nghiệp sản xuất chất béo. Tuy nhiên, enzyme này thường sử dụng với cơ chất là triacylglycerid. Nghiên cứu này cho thấy enzyme RM IM cũng có

khả năng tác dụng với lecithin hay phospholipid nói chung.

Trong một số nghiên cứu về tổng hợp phospholipid hay lecithin chức năng, thường sử dụng xúc tác là các phospholipase và thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện có sử dụng chỉ một loại dung môi hữu cơ hoặc không sử dụng dung môi [3, 5]. Việc sử dụng hoặc không sử dụng dung môi hữu cơ trong phản ứng tổng hợp phospholipid chức năng vẫn còn nhiều ý kiến trái chiều. Tuy

nhien, nhiều nghiên cứu cũng cho rằng việc sử dụng dung môi sẽ đạt được hiệu quả cao hơn khi tăng quy mô tổng hợp (scale-up) hay sử dụng phương pháp tổng hợp liên tục (continuous reaction). Do đó, nhóm nghiên cứu tiến hành tổng hợp lecithin chức năng trong điều kiện không sử dụng dung môi và sử dụng dung môi hữu cơ nhằm đánh giá ảnh hưởng của dung môi hữu cơ khi sử dụng Lipozyme RM IM làm chất xúc tác.



Hình 1. Lượng CLA (mol%) liên kết vào lecithin

Kết quả tổng hợp lecithin chức năng được trình bày trong hình 1. Nhìn chung, lượng CLA liên kết vào phân tử lecithin tăng dần theo thời gian phản ứng. Và sau 48 h phản ứng, CLA liên kết vào phân tử lecithin cao nhất là 46,98 mol%. Trong các thí nghiệm, tỷ lệ CLA liên kết vào lecithin chức năng khi không có mặt của dung môi hữu cơ đạt cao

hơn so với khi sử dụng dung môi hữu cơ. CLA liên kết vào lecithin khi có mặt hexane và toluen không có sự khác biệt nhiều so với khi sử dụng glycerin làm dung môi hữu cơ. Điều này cho thấy khi độ phân cực của dung môi tăng thì CLA liên kết vào lecithin giảm đi.

Bảng 1. Thành phần axit béo của lecithin và lecithin chức năng (mol%)

Axit béo	Lecithin	Lecithin chức năng			
		Không dung môi	Hexane	Toluen	Glycerol
Axit palmitic	18,0	7,15	10,59	11,37	8,96
Axit stearic	3,7	1,68	2,31	2,28	2,43
Axit oleic	10,6	11,71	10,32	10,92	12,69
Axit linoleic	60,6	29,37	37,6	38,17	40,53
Axit linolenic	7,1	3,11	4,6	3,88	4,75
CLA	-	46,98	34,58	33,38	30,64

Theo lý thuyết, CLA liên kết vào phân tử lecithin sẽ tăng theo thời gian phản ứng, tuy nhiên, trên thực tế có thể sẽ có sự tăng giảm ngẫu nhiên nào đó [5]. Điều này xảy ra có thể do phản ứng chuyển ester (transesterification) và phản ứng thủy phân của phospholipid xảy ra trong hỗn hợp phản ứng. Trong một số nghiên cứu trước đây cũng đã đề cập đến sự tạo thành lyso-phospholipid khi tổng hợp phospholipid chức năng thông qua phản ứng acidolysis (phản ứng giữa axit béo tự do với phospholipid). Đối với nghiên cứu này, axit béo giải phóng từ phân tử phospholipid sẽ được CLA thay thế vào để tạo ra một phân tử phospholipid mới. Và axit béo được giải phóng cũng có thể tham gia vào phản ứng ester hóa. Lyso-phospholipid có thể cũng có trong hỗn hợp sản phẩm vì chúng có thể không được tham gia vào phản ứng tạo

ester với CLA; hoặc phospholipid chức năng có chứa CLA một lần nữa lại bị thủy phân. Từ kết quả nghiên cứu, phần lớn các phản ứng CLA liên kết vào lecithin chưa đạt được tốc độ ổn định khi thời gian phản ứng dưới 20 giờ.

Trong 4 phản ứng tổng hợp, khi không sử dụng dung môi, lượng CLA liên kết vào phân tử lecithin đạt cao nhất. Nếu chỉ xét ba dung môi hữu cơ được lựa chọn, thì hexane có lượng CLA liên kết vào cao nhất và thấp nhất là glycerol. Với các dung môi hữu cơ, CLA liên kết vào phân tử lecithin dao động từ 30,64 đến 34,58 mol% (bảng 1). CLA liên kết vào lecithin thấp nhất khi sử dụng glycerol làm dung môi, điều này có thể do sự cạnh tranh giữa lecithin và glycerol trong phản ứng ester với CLA và hơn nữa RM IM là một lipase dùng với cơ chất là triacylglycerid.

Bảng 2. Thành phần axit béo của PC, PE trong lecithin và lecithin chức năng

Axit béo	Lecithin		Lecithin chức năng ⁽¹⁾	
	PC	PE	PC	PE
Axit palmitic	17,8	22,2	11,3	12,3
Axit stearic	5,6	3,1	3,5	2,6
Axit oleic	10,0	7,4	12,9	12,4
Axit linoleic	60,8	58,5	43,3	44,5
Axit linolenic	5,8	8,8	4,4	4,4
CLA	-	-	24,6	23,8

3.2. Phân tích PC và PE của lecithin và lecithin chức năng

Lecithin là hỗn hợp nhiều phospholipid khác nhau. Trong đó, phosphatidylcholine (PC) và phosphatidylethanolamine (PE) là hai thành phần chính của lecithin với nhiều tác động tốt cho não bộ, gan, tim mạch. Lecithin trong nghiên cứu này có tỷ lệ PE và PC lần lượt là 29,7% và 13,9%. Do đó, nhóm nghiên cứu tiến hành phân tích thành phần

axit béo trong PC và PE vì khi CLA liên kết vào phân tử PC và PE đạt hiệu quả cao thì giá trị sử dụng của lecithin chức năng cũng được đánh giá cao hơn.

Phân tử PC và PE của lecithin và lecithin chức năng được phân tách khỏi hỗn hợp sản phẩm bằng TLC như đã mô tả tại mục 2.2. Sau đó, PC và PE được phân tích bằng GC (theo 2.3). Thành phần axit béo của PC và PE của lecithin và lecithin chức năng được tổng hợp sau 48 giờ trong điều kiện không sử dụng dung môi được trình bày trong bảng 2. Đối

⁽¹⁾ Lecithin chức năng tổng hợp được sau 48 giờ phản ứng khi không có dung môi hữu cơ.

với lecithin, axit linoleic và palmitic là hai axit béo chính của phân tử PC và PE, axit palmitic lần lượt chiếm 17,8 mol% và 22,2 mol%; và linoleic là 60,8 và 58,5 mol%.

Thành phần axit béo chính trong lecithin chức năng là CLA (46,98 mol%), axit linoleic 29,37 (mol%) và axit oleic (11,71 mol%) (bảng 1). Trong lecithin, CLA không có mặt trong thành phần axit béo, và bằng phản ứng ester hóa với CLA thì trong thành phần axit béo của lecithin có sự xuất hiện của CLA (bảng 1 và bảng 2). CLA liên kết trong phân tử PC và PE của lecithin chức năng lần lượt là 24,6 mol% và 23,8 mol%. So sánh thành phần axit béo trong phân tử PC trước và sau phản ứng, axit linoleic và axit palmitic giảm đi nhiều. Hai axit béo này chiếm tỷ lệ chính trong thành phần PC của lecithin, do đó, sau khi tiến hành phản ứng re-ester, CLA liên kết vào phân tử lecithin nên đã thay đổi tỷ lệ các axit béo thành phần của PC trước và sau phản ứng. Axit linoleic

giảm từ 60,8 xuống 43,3 mol%; palmitic giảm từ 17,8 xuống 11,3 mol%. Đối với PE, ta cũng có kết quả tương tự, axit linoleic giảm từ 58,5 xuống 44,5 mol%; axit palmitic giảm từ 22,2 xuống 12,3 mol%.

4. KẾT LUẬN

Trong 4 thí nghiệm tổng hợp (3 sử dụng dung môi hữu cơ và 1 không sử dụng dung môi), lượng CLA liên kết vào lecithin chức năng cao nhất sau 48 h, phản ứng đạt 46,98 mol% khi không sử dụng dung môi hữu cơ. Vậy để tổng hợp lecithin chức năng chứa CLA có sử dụng enzyme RM IM làm chất xúc tác thì không sử dụng dung môi là thích hợp nhất. Trong trường hợp, cần sử dụng dung môi hữu cơ với mục đích như giảm độ nhớt của hỗn hợp phản ứng thì hexan là một lựa chọn tốt khi mà hexane có tỷ lệ CLA liên kết vào lecithin cao hơn dung môi còn lại và được chấp nhận trong công nghiệp sản xuất chất béo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Suzhaj, B.F., Nieuwenhuyzen, W.V. *Nutrition and biochemistry of phospholipids*. AOCS Press, USA, 2003.
- [2] Betzing, H. *Process for preparation of a new lysolecithin mixture*. US patent 3592829, 2001.
- [3] Lyberg, A.-M., Adlercreutz, D., Adlercreutz, P. "Enzymatic and chemical synthesis of phosphatidylcholine regioisomers containing eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid", *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107, 279-290, 2005.
- [4] McDonald, H.B., "Conjugated linoleic acid and disease prevention: A review of current knowledge", *Journal of the American College of Nutrition*, 19 (2), 111S-118S, 2000.
- [5] Hossen, M., Hernandez, E., "Enzyme-catalyzed synthesis of structured phospholipids with conjugated linoleic acid", *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107, 730-736, 2005.

Thông tin liên hệ:

Vũ Phương Lan

Điện thoại: 0986673235 - Email: vplan@uneti.edu.vn

Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Kinh tế - Kỹ thuật Công nghiệp

