

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG PHOSPHOLIPASE A1 LÀM CHẤT XÚC TÁC CHO PHẢN ỨNG THAY ĐỔI THÀNH PHẦN AXIT BÉO TRONG PHÂN TỬ PHOSPHOLIPID

RESEARCH ON USING PHOSPHOLIPASE A1 AS CATALYSIS FOR MODIFYING THE FATTY ACID COMPOSITION OF PHOSPHOLIPID

Vũ Phương Lan

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

Đến Tòa soạn ngày 10/02/2023, chấp nhận đăng ngày 24/04/2023

Tóm tắt: Phospholipid biến đổi được tổng hợp bằng phản ứng acidolysis giữa phospholipid từ đậu tương (hay còn gọi là lecithin) và axit linoleic nối đôi liên hợp (CLA) có sử dụng phospholipase A1 làm chất xúc tác. Phản ứng được tiến hành trong 48 giờ và trong điều kiện không và có sử dụng dung môi hữu cơ. Thành phần axit béo của lecithin, lecithin biến đổi và của PC, PE được phân tích bằng sắc ký khí. Kết quả sau 48 giờ phản ứng, CLA liên kết vào phân tử lecithin đạt được cao nhất là 64,27 mol% trong điều kiện không sử dụng dung môi.

Từ khóa: Phospholipid, glycerophospholipid, lecithin, phospholipase A1, sắc ký khí.

Abstract: Modified phospholipids were synthesized by acidolysis reaction between soybean phospholipids (also known as lecithin) and conjugated linoleic acid (CLA) using phospholipase A1 as a catalyst. The reactions were carried out for 48h in a solvent-free or organic solvent systems. The fatty acid composition of lecithin, modified lecithin, PC and PE was analyzed by gas chromatography. After 48 h of reaction, the highest content of CLA incorporated into lecithin was 64.27 mol% in free-solvent system.

Keywords: Phospholipid, glycerophospholipid, lecithin, phospholipase A1, gas chromatography.

1. PHẦN MỞ ĐẦU

Phospholipid là ester của rượu đa chức với axit béo và có gốc axit phosphoric và bazơ nitơ đóng vai trò làm nhóm phụ bổ sung. Phospholipid là phân tử lưỡng cực tìm thấy trong màng tế bào của cả thực vật và động vật. Phospholipid có mặt trong phần lớn màng membrane của tế bào, chủ yếu là glycerophospholipid - gồm 2 axit béo liên kết ester với glycerol và một nhóm phosphate và một bazơ nitơ.

Phospholipid là một trong những nguồn cung cấp axit béo, chất béo cho cơ thể. Ngoài giá trị dinh dưỡng, tác động của phospholipid đối với một số bệnh lý và triệu chứng bệnh đã

được đề cập từ những năm 1900 như bệnh tim mạch, sự viêm nhiễm, ung thư. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra, sử dụng phospholipid có tác động tích cực đối với một số bệnh mà đường như không có tác dụng phụ, thậm chí còn có khả năng giảm tác dụng phụ của một số thuốc. Cả hai tác động đó được giải thích là do phospholipid có hiệu quả cao trong việc cung cấp axit béo để chúng kết hợp vào màng tế bào liên quan đến các bệnh khác nhau, ví dụ như tế bào miễn dịch hoặc tế bào ung thư [1]. Phospholipid ngoài việc được sử dụng để cung cấp dinh dưỡng cho con người còn được ứng dụng trong công nghiệp nhờ vào tính chất lưỡng cực (amphiphilic), như một chất hoạt

động bề mặt, hay phụ gia có nguồn gốc tự nhiên trong công nghiệp thực phẩm cho các sản phẩm như margarine, sô cô la, bánh kẹo... hay trong lĩnh vực dược phẩm như một chất dẫn thuốc. Hơn nữa, nhiều nghiên cứu cho thấy, thành phần axit béo trong phân tử phospholipid có ảnh hưởng tới giá trị dinh dưỡng của nó. Một số nghiên cứu cho thấy phospholipid chứa axit béo không no đa nối đôi có khả năng tăng cường chức năng tiêu hóa và có những tác động tốt tới trí nhớ của não bộ người già [2].

Do vậy, nhiều nhà khoa học thực hiện phản ứng tổng hợp để thay đổi thành phần axit béo của phospholipid sử dụng xúc tác hóa học hoặc enzyme nhằm nâng cao giá trị của phospholipid tự nhiên [3,4]. Điểm mạnh của việc sử dụng enzyme là phản ứng xảy ra ở điều kiện êm dịu hơn, ít sản phẩm phụ hơn so với sử dụng xúc tác hóa học. Lipase và phospholipase là hai loại enzyme thường được sử dụng trong tổng hợp phospholipid biến đổi. Theo một số tài liệu, việc tổng hợp phospholipid biến đổi đã thực hiện trong môi trường phản ứng không sử dụng dung môi hoặc sử dụng một loại dung môi hữu cơ. Trong một số nghiên cứu về tổng hợp chất béo nối chung và phospholipid nối riêng, việc sử dụng dung môi có những ảnh hưởng nhất định tới hiệu quả của phản ứng [5-9].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng enzyme phospholipase A1 làm chất xúc tác cho phản ứng giữa phospholipid và axit béo tự do nhằm mục đích thay đổi thành phần axit béo của phospholipid ban đầu. Chúng tôi lựa chọn đối tượng tiến hành thí nghiệm là lecithin - tên thương mại của hỗn hợp một số glycerophospholipid và axit linoleic nối đôi liên hợp. Axit linoleic nối đôi liên hợp (CLA) được biết đến là một axit béo có lợi cho sức khỏe như chống ung thư, giảm cholesterol,

giảm triglyceride trong máu [10]. Phản ứng tổng hợp trong điều kiện không và có sử dụng dung môi hữu cơ gồm hexane, toluene và glycerol; ba dung môi này thường hay được lựa chọn trong nghiên cứu về chất béo - nhằm đánh giá ảnh hưởng của dung môi hữu cơ tới khả năng xúc tác của phospholipase A1 đối với lecithin.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Lecithin (3-sn-phosphatidylcholine sản xuất từ đậu tương) được mua từ công ty Fluka (Sigma-Aldrich, Mỹ).

Axit linoleic nối đôi liên hợp (conjugated linoleic acid, 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 Phospholipase A1 (PLA1, Lecitase Ultra) của công ty Novozymes (Đan Mạch).

Các dung môi sử dụng cho phân tích được mua từ công ty Fisher Scientific (Norcross, Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phản ứng giữa lecithin và CLA để tạo lecithin biến đổi

Phản ứng giữa lecithin và axit CLA được tiến hành trong lọ thí nghiệm 5 mL có nắp vặn. Hỗn hợp phản ứng gồm lecithin và CLA với tỷ lệ 1:6 (mol:mol) và 20% phospholipase A1 (PLA1). Phản ứng được tiến hành tại trong thiết bị ổn nhiệt ở nhiệt độ 55°C trong 48 giờ, với tốc độ khuấy đảo 175 rpm. Phản ứng được tiến hành trong điều kiện không sử dụng và có sử dụng dung môi hữu cơ (hexane, toluene và glycerol). Sau khi phản ứng kết thúc, loại bỏ axit béo tự do bằng axetone lạnh.

2.2.2. Phân tích mẫu thí nghiệm

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

Hỗn hợp sản phẩm thu được sau 48 giờ phản ứng được chạy sắc ký bản mỏng (TLC) để tách PC và PE. Pha động của TLC gồm chloroform - methanol - nước (60-30-10, tỷ lệ theo thể tích). Sau đó, PC và PE tách ra được từ bản sắc ký được cho vào các ống nghiệm riêng để sử dụng cho các phân tích tiếp theo.

2.2.2.2. Phân tích thành phần axit béo

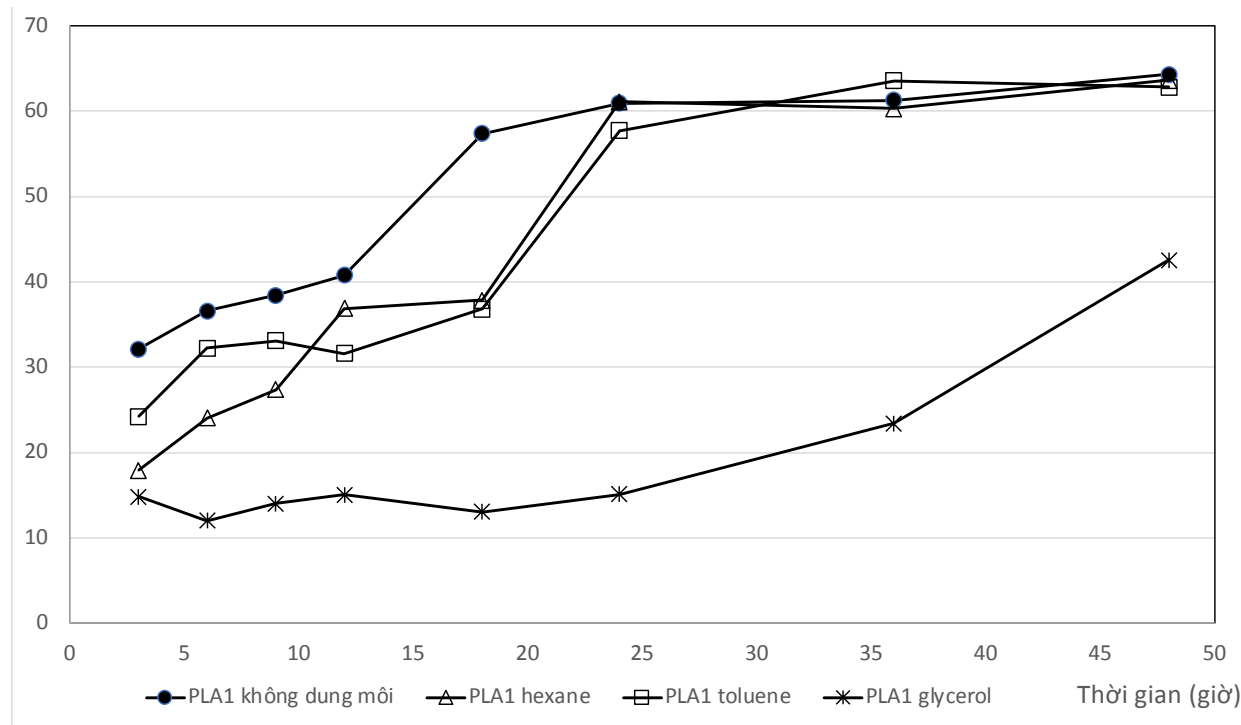
Mẫu thí nghiệm phân tích được đặt vào ống nghiệm có nắp vặn. Thêm vào đó 3 mL BF₃ trong methanol và 50 µL heptadecanoic axit (chất nội chuẩn, 1 mg/mL trong hexane). Mẫu được đặt vào tủ sấy trong 2 giờ tại nhiệt độ 90°C, rồi làm lạnh nhanh. Sau đó, thêm 2 mL heptane để tách phần axit béo đã metyl hóa và đem đi phân tích bằng sắc ký khí.

Thành phần axit béo được phân tích bằng sắc ký khí (GC) với đầu dò FID. Cột sắc ký là SP-Wax fused-silica capillary 60m × 0,25 mm i.d. của Supelco. Chế độ nhiệt của cột sắc ký như sau: giữ tại 100°C trong 5 phút, sau đó tăng lên 220°C với tốc độ tăng nhiệt 4°C/phút và tiếp tục 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 được cài đặt tại 250°C.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của các loại dung môi tới việc kết hợp của axit CLA vào lecithin

Các thí nghiệm được tiến hành theo 2.1. Trong quá trình thực hiện phản ứng, tiến hành lấy mẫu tại các thời điểm: 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 và 48 giờ phản ứng và phân tích mẫu theo 2.2.2.



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

Kết quả phân tích lượng CLA liên kết vào lecithin theo thời gian được trình bày trong

hình 1. Lượng CLA liên kết vào phân tử lecithin tăng dần theo thời gian phản ứng và

sau 48 h phản ứng thì CLA liên kết vào phân tử lecithin cao nhất đạt 64,27 mol%. Trong các thí nghiệm, CLA liên kết vào lecithin thấp nhất khi sử dụng dung môi glycerol. Trong khi đó, các thí nghiệm với dung môi hexane, toluene và không sử dụng dung môi thì lượng CLA liên kết vào lecithin đạt cao hơn, từ 62,78 đến 64,27 mol%; trường hợp không sử dụng dung môi đạt kết quả đạt cao nhất. Về mặt lý thuyết, CLA liên kết vào phân tử lecithin tăng đều theo thời gian phản ứng, tuy nhiên trên thực tế có thể sẽ có sự tăng giảm ngẫu nhiên nào đó. Điều này xảy ra có thể do phản ứng ester hóa và phản ứng thủy phân của phospholipid cùng xảy ra trong hỗn hợp phản ứng. Một số nghiên cứu nhận định có sự hình

thành lysophospholipid khi tiến hành phản ứng acidolysis giữa axit béo tự do và phospholipid [5,11]. Với trường hợp này, khi axit béo được giải phóng từ phân tử phospholipid thì CLA sẽ thay thế để tạo thành một phân tử phospholipid biến đổi, và axit béo này vẫn có thể tiếp tục tham gia vào phản ứng ester hóa. Lysophospholipid cũng có thể có trong hỗn hợp phản ứng vì chúng không tham gia vào phản ứng tạo ester với CLA; hoặc phospholipid biến đổi lại bị thủy phân. Và kết quả (hình 1) cho thấy liên kết của CLA vào lecithin nhìn chung tăng mạnh trong 24 giờ đầu và sau đó tốc độ đạt tới độ ổn định hơn, điều này tương tự với kết quả nghiên cứu của Hossen và Herendez [5].

Bảng 1. Thành phần axit béo của lecithin và lecithin biến đổi sau 48 giờ phản ứng (mol%)

Axit béo	Lecithin	Lecithin biến đổi			
		Không dung môi	Hexane	Toluene	Glycerol
Axit palmitic	18,03	5,05	4,95	5,22	5,89
Axit stearic	3,73	1,09	1,14	1,14	1,36
Axit oleic	10,62	11,57	12,38	12,58	12,81
Axit linoleic	60,55	16,23	16,14	16,42	34,33
Axit linolenic	7,07	1,79	1,81	1,86	3,07
CLA	-	64,27	63,58	62,78	42,54

Theo kết quả phân tích thành phần axit béo của lecithin (bảng 1) thì axit linoleic, axit palmitic và axit oleic là các axit chính, chiếm trên 80 mol%. Tuy nhiên, sau khi tiến hành phản ứng tổng hợp thì thành phần axit béo có sự thay đổi. Tỷ lệ ba axit béo linoleic, palmitic và oleic giảm và có sự xuất hiện của

CLA trong thành phần axit béo của lecithin biến đổi. Các axit béo chính trong lecithin biến đổi lần lượt là CLA, linoleic, oleic và palmitic. Điều này cho thấy, CLA đã thay thế các axit béo của lecithin ban đầu và liên kết vào khung glycerol để tạo thành lecithin biến đổi.

Bảng 2. Thành phần axit béo của PC, PE trong lecithin và lecithin biến đổi

Axit béo	Lecithin		Lecithin biến đổi ¹							
			Không dung môi		Hexane		Toluene		Glycerol	
	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE
Axit palmitic	17,81	22,26	22,27	19,75	33,21	17,52	23,31	37,48	5,12	17,75
Axit stearic	5,61	3,05	9,02	15,35	14,04	17,28	9,45	15,51	1,55	2,18
Axit oleic	9,97	7,42	16,61	18,89	16,08	14,61	16,44	26,36	11,73	10,01
Axit linoleic	60,77	58,46	29,39	18,33	26,92	36,88	41,92	12,05	64,88	54,27

Axit béo	Lecithin		Lecithin biến đổi ¹							
			Không dung môi		Hexane		Toluene		Glycerol	
	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE
Axit linolenic	5,84	8,81	4,42	-	-	3,20	3,54	2,77	5,21	6,08
CLA	-	-	18,29	27,68	9,75	10,51	5,34	5,83	11,51	9,71

(1) Lecithin biến đổi tổng hợp được sau 48 giờ phản ứng khi không có dung môi và sử dụng 3 dung môi hữu cơ.

3.2. Phân tích PC và PE của lecithin và lecithin biến đổi

Lecithin là tên thương mại của hỗn hợp nhiều phospholipid khác nhau khai thác từ đậu tương. Trong hỗn hợp đó, phosphatidylcholine (PC) và phosphatidylethanolamine (PE) là hai thành phần có hàm lượng cao, hơn nữa hai thành phần này có nhiều tác động tốt cho sức khỏe con người nên thường được các nhà nghiên cứu quan tâm. Do đó, nhóm nghiên cứu đã tiến hành phân tách PC và PE trong lecithin và lecithin biến đổi bằng sắc ký bản mỏng, tiếp đó phân tích thành phần axit béo của PC, PE phân tách được từ các mẫu thí nghiệm. Kết quả phân tích được trình bày trong bảng 2.

Kết quả phân tích cho thấy, thành phần axit béo trong PC và PE gồm 2 axit chính axit linoleic và axit palmitic tiếp theo là axit oleic hoặc axit linolenic. Sau khi tiến hành phản ứng tổng hợp, thành phần và tỷ lệ axit béo của PC và PE có sự thay đổi do CLA liên kết vào phân tử của PC và PE. Giữa PC, PE của lecithin và lecithin biến đổi, tỷ lệ mol% của axit linoleic thay đổi nhiều và theo chiều hướng giảm. Điều này cho thấy CLA đã thay thế axit linoleic trong phân tử của PC và PE ban đầu. Trong 4 sản phẩm tổng hợp được, tỷ lệ CLA liên kết vào PC, PE cao nhất khi không sử dụng dung môi (lần lượt 18,29 và 27,68 mol%); tiếp theo là trường hợp sử dụng dung môi glycerol, hexane và toluene. Theo

Yahan Li và cộng sự, độ phân cực của môi trường phản ứng có ảnh hưởng tới phản ứng tổng hợp phospholipid biến đổi, do sự phân cực ảnh hưởng tới sự tiếp xúc của các phospholipid, axit béo và enzyme [8]. Còn theo Lifeng Peng và cộng sự, khi tiến hành phản ứng acidolysis với từng phospholipid nguyên chất trong cùng điều kiện phản ứng thì sự liên kết của axit béo vào mỗi loại phospholipid đó là khác nhau; nguyên nhân có thể do khác nhau về cơ chất và thành phần axit béo [9]. Đối với nghiên cứu này, khi lecithin là hỗn hợp của nhiều loại phospholipid và có sử dụng dung môi khác nhau thì lý do cho sự khác biệt về hàm lượng CLA liên kết vào PC, PE, có thể do ảnh hưởng của dung môi hoặc sự ưu tiên **khác nhau của** phospholipid với axit béo. Và đồng quan điểm với Lifeng Peng, điều này sẽ cần phải tiếp tục nghiên cứu để có thể hiểu được rõ ràng hơn [9].

4. Kết luận

Nhóm nghiên cứu tiến hành thí nghiệm thay đổi thành phần axit béo của lecithin với xúc tác enzyme phospholipase A1 trong điều kiện có và không sử dụng dung môi hữu cơ. Kết quả sau 48 giờ phản ứng, lượng CLA liên kết vào lecithin đạt cao nhất 64,27 mol% khi không sử dụng dung môi; với 2 dung môi hexane và toluene cũng đạt tỷ lệ liên kết cao từ 63,58 và 62,78 mol%. Khi phân tách và phân tích thành phần axit béo của phân tử PC

và PE của sản phẩm tổng hợp được thì tỷ lệ CLA của mẫu thí nghiệm không sử dụng dung môi cũng cho kết quả cao hơn các mẫu còn lại. Tóm lại, enzyme phospholipid A1 có thể sử dụng để tổng hợp lecithin biến đổi và tiến hành trong điều kiện không sử dụng dung môi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Küllenberg, D., Taylor, L., Schneider, M., Massing, U., *"Health effects of dietary phospholipids"*, Lipids in health and disease, 11:3, (2012).
- [2] Szuhaj, B.F., Nieuwenhuyzen, W.V., *"Nutrition and biochemistry of phospholipids"*. AOCS Press, USA, (2003).
- [3] Betzing, H., *"Process for preparation of a new lysolecithin mixture"*, US patent 3592829, (2001).
- [4] Joshi, A., Paratkar, S.G., Thorat, B.N., *"Modification of lecithin by physical, chemical and enzymatic methods"*, European Journal of Lipid Science and Technology, 108, 363-373, (2006).
- [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).
- [6] Lyberg A.-M., Adlercreutz D., Adlercreutz P., *"Enzymatic and chemical synthesis of phosphatidylcholine regioisomer containing eicosapentaenoic acid or docosahexanoic acid"*, European Journal of Lipid Science and Technology, 107, 279-290, (2005).
- [7] Adlercreutz P., Lyberg A.-M., Adlercreutz D., *"Enzymatic fatty acid exchange in glycerophospholipid"*, European Journal of Lipid Science and Technology, 105, 638-645, (2003).
- [8] Li Y., Dai L., Liu D., Du W., *"Progress and prospect of enzyme-mediated structured phospholipids preparation"*, Catalysis, 12, 795-814, (2022).
- [9] Peng L., Xu X., Mu H., Høy C.-E., Adler-Nissen J., *"Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology"*, Enzyme and Microbial Technology, 31, 523-532, (2002).
- [10] 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).
- [11] Niezgoda, N., Gliszczynska, A., *"Lipase catalyzed acidolysis for efficient synthesis of phospholipids enriched with isomerically pure cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid"*, Catalysts, 9 (12), 1012, (2019).

Thông tin liên hệ: **Vũ Phương Lan**

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

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