

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP LECITHIN CHỨA AXIT BÉO MẠCH TRUNG BÌNH

● VŨ PHƯƠNG LAN

TÓM TẮT:

Lipozyme RM IM và Lipozyme TL IM được sử dụng làm chất xúc tác cho phản ứng acidolysis giữa lecithin và axit béo tự do có mạch carbon trung bình. Sau khi kết thúc, thu sản phẩm lecithin biến đổi và tiến hành phân tích thành phần axit béo bằng sắc ký khí và phân tích lượng PC, PE có trong hỗn hợp bằng sắc ký lỏng cao áp. Các axit béo đều liên kết vào lecithin và lượng axit liên kết đạt cao nhất là 30,8 mol% khi tiến hành phản ứng với axit lauric và xúc tác bởi RM IM. Enzyme RM IM có khả năng xúc tác hiệu quả hơn so với TL IM.

Từ khóa: Phospholipid, Glycerophospholipid, Lecithin, Lipase, Gas chromatography.

1. Đặt vấn đề

Phospholipid là ester của rượu đa chức glycerol với axit béo; và trong phân tử còn có gốc axit phosphoric và bazơ nitơ. 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 không chỉ được đánh giá cao về giá trị dinh dưỡng đối với cơ thể, mà còn có tác động tới một số bệnh lý và triệu chứng bệnh như tim mạch, ung thư...[1]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra, sử dụng phospholipid có tác động tích cực đối với một số bệnh mà dường như không có tác dụng phụ, thậm chí còn có khả năng giảm tác dụng phụ của một số thuốc. Nhờ vào đặc tính hoạt động bề mặt mà phospholipid được sử dụng rộng rãi như một chất tạo nhũ tương, hay chất hoạt động bề mặt trong thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm.

Chất béo biến đổi nói chung và phospholipid

biến đổi nói riêng được tổng hợp nhằm thay đổi tính chất vật lý, hoặc có thành phần axit béo cụ thể, có chức năng đặc biệt. 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 [2,3]. Lipase và phospholipase là hai loại enzyme thường được sử dụng trong tổng hợp phospholipid biến đổi.

Lecithin từ đậu nành là sản phẩm phụ của quá trình tinh luyện dầu đậu nành thô. Lecithin gồm hỗn hợp của nhiều phospholipid chủ yếu gồm phosphatidylcholine (PC) và phosphatidylethanolamine (PE). Hiện nay, nhiều nhà khoa học tiến hành nghiên cứu tạo ra phospholipid biến đổi, phần lớn chú trọng vào các axit béo không no mạch dài với mục đích có lợi cho sức khỏe [4,5] và axit béo no nhằm cải thiện tính chất nhũ hoá và ổn định nhiệt [6]. Tuy nhiên, các nghiên cứu này sử dụng PC tinh khiết làm đối

tượng nghiên cứu. Việc sử dụng lecithin làm cơ chất cho phản ứng biến đổi chất béo có sử dụng enzyme làm chất xúc tác chưa được nghiên cứu nhiều.

Axit mạch carbon trung bình không chỉ có lợi cho sức khỏe, mà còn thay đổi được tính chất của phospholipids do đó tăng khả năng ứng dụng vào thực phẩm. Lecithin cấu trúc chứa axit béo mạch trung bình dễ hòa tan trong nước hơn so với phospholipid tự nhiên và hơn nữa có độ ổn định nhiệt tốt và thời gian sử dụng dài. Davidsen và cộng sự báo cáo khi sử dụng phospholipid chứa axit béo mạch trung bình thì quá trình giải phóng thuốc diễn ra rất nhanh [7].

Trong nghiên cứu này, tác giả sử dụng enzyme RM IM và TL IM làm chất xúc tác cho phản ứng acidolysis giữa lecithin đậu nành và axit béo tự do mạch carbon trung bình nhằm mục đích tạo ra lecithin biến đổi. 4 loại axit béo mạch trung bình (MCFA) từ 6 carbon đến 12 carbon được lựa chọn để tiến hành phản ứng tổng hợp, từ đó đưa ra đánh giá về khả năng liên kết vào lecithin.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

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

Axit caproic, axit caprylic, axit capric, axit lauric với độ tinh khiết 99% do Công ty Sigma-Aldrich cung cấp.

Lipozyme RM IM (lipase từ *Rhizomucor miehei*) và TL IM (lipase từ *Thermomyces lanuginose*) được cung cấp bởi Công ty Novozymes Inc (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

2.1.1. Phản ứng tổng hợp lecithin biến đổi

Hỗn hợp phản ứng gồm lecithin, axit béo theo tỷ lệ 1:6 (mol:mol) và 20% enzyme theo % khối lượng được cho vào lọ 5 mL có nắp vặn. Phản ứng được tiến hành trong thiết bị ổn nhiệt ở nhiệt độ 55°C trong 24 giờ, với tốc độ khuấy đảo 175 rpm. Sau khi phản ứng kết thúc, tiến hành loại bỏ axit béo tự do bằng axetone lạnh.

2.2.2. Phân tích mẫu thí nghiệm

Phân tích phosphatidylcholine (PC) và phosphatidylethanolamine (PE).

Hỗn hợp sản phẩm được tiến hành 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 từ bản sắc ký được cho vào các ống nghiệm riêng để sử dụng cho các phân tích tiếp theo.

Phân tích thành phần axit béo bằng sắc ký khí (GC).

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 x 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.

2.2.3. Phân tích bằng HPLC

Mẫu thí nghiệm được phân tích bằng HPLC với đầu dò ELSD (Alfortvill, Pháp) với cột sắc ký silica 5 m (4,6 mm x 250 mm, Water Corporation, Mỹ). Dung môi pha động gồm isopropanol, hexane và nước với tỷ lệ 58:40:2 theo thể tích và tốc độ dòng 1 mL/phút.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Đánh giá sự liên kết của axit béo mạch trung bình vào phân tử lecithin

Lecithin biến đổi được tổng hợp bằng phản ứng acidolysis giữa lecithin và một axit béo tự do mạch trung bình có sử dụng enzyme làm chất xúc tác. Kết quả phân tích thành phần axit béo của lecithin và các lecithin biến đổi được trình bày tại Bảng 1.

Theo kết quả phân tích, thành phần axit béo chính của lecithin (Bảng 1) là axit linoleic, axit

Bảng 1. Thành phần axit béo của lecithin và lecithin biến đổi

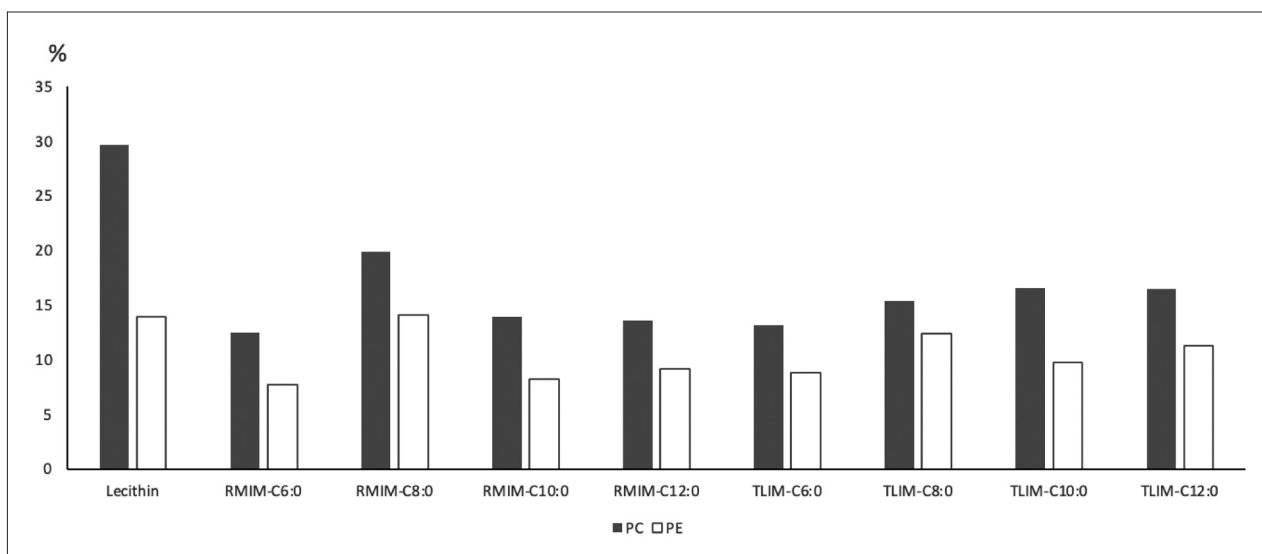
Axit béo	Lecithin	RM IM				TL IM			
		C _{6:0}	C _{8:0}	C _{10:0}	C _{12:0}	C _{6:0}	C _{8:0}	C _{10:0}	C _{12:0}
Axit caproic (C _{6:0})	-	2,7	-	-	-	2,2	-	-	-
Axit caprylic (C _{8:0})	-	-	14,3	-	-	-	9,8	-	-
Axit capric (C _{10:0})	-	-	-	27,3	-	-	-	11,6	-
Axit lauric (C _{12:0})	-	-	-	-	30,8	-	-	-	21,9
Axit palmitic (C _{16:0})	18,0	20,3	16,2	14,0	12,8	22,7	19,3	18,1	16,2
Axit stearic (C _{18:0})	3,7	4,1	3,3	2,8	2,5	4,4	3,8	3,6	3,1
Axit oleic (C _{18:1})	10,6	8,8	7,8	6,2	5,9	8,6	7,8	7,6	6,6
Axit linoleic (C _{18:2})	60,6	57,6	52,3	44,5	43,1	55,4	52,8	53,0	46,5
Axit linolenic (C _{18:3})	7,1	6,5	6,1	5,2	4,9	6,7	6,5	6,1	5,7

palmitic và axit oleic, chiếm trên 80 mol%. Sau khi tiến hành phản ứng tổng hợp thì thành phần axit béo có sự thay đổi; sự xuất hiện của axit béo mạch trung bình trong thành phần axit béo chứng tỏ các axit béo này đã liên kết vào khung glycerol để tạo thành lecithin biến đổi. Axit lauric liên kết vào phân tử lecithin đạt cao nhất (30,8 mol%), tiếp theo là axit capric (27,3 mol%), axit caprylic (14,3 mol%) và axit caproic (2,7 mol%).

Nhìn chung, giữa 2 enzyme sử dụng làm chất xúc tác thì RM IM cho tỷ lệ axit béo liên kết vào

lecithin đạt cao hơn so với TL IM. Kết quả của một nghiên cứu trước đây của Hossen và cộng sự khi sử dụng Lipozyme RM IM và TL IM xúc tác phản ứng acidolysis giữa phospholipid và axit béo nối đôi liên hợp linoleic với tỷ lệ liên kết đạt lần lượt 16,0 và 11,6%. Egger và cộng sự [8] cũng báo cáo kết quả tương tự khi tiến hành với axit béo no có mạch carbon từ 6 tới 12 bằng phản ứng acidolysis có phospholipase A2 làm xúc tác. Còn theo báo cáo của Peng và cộng sự [9], 39 mol% axit capric liên kết vào phospholipid khi tiến hành phản ứng với

Hình 1: Hàm lượng PC và PE của lecithin và lecithin biến đổi



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

Axit béo	Lecithin		RM IM										TL IM					
			C _{6:0}		C _{8:0}		C _{10:0}		C _{12:0}		C _{6:0}		C _{8:0}		C _{10:0}		C _{12:0}	
	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE
Axit caproic (C _{6:0})	-	-	2,1	1,7	-	-	-	-	-	-	1,6	1,3	-	-	-	-	-	-
Axit caprylic (C _{8:0})	-	-	-	-	12,3	10,2	-	-	-	-	-	-	7,2	7,5	-	-	-	-
Axit capric (C _{10:0})	-	-	-	-	-	-	23,6	27,9	-	-	-	-	-	-	10,4	11,1	-	-
Axit lauric (C _{12:0})	-	-	-	-	-	-	-	-	29,6	28,9	-	-	-	-	-	-	18,2	17,9
Axit palmitic (C _{16:0})	17,8	22,2	18,4	20,3	14,1	18,7	10,4	15,9	11,5	17,6	20,2	23,1	17,1	19,2	13,4	19,3	16,7	18,4
Axit stearic (C _{18:0})	5,6	3,1	5,7	3,1	4,2	3,8	5,6	2,1	1,1	1,3	6,1	3,2	4,8	2,7	5,4	4,2	2,4	2,5
Axit oleic (C _{18:1})	10,0	7,4	10,3	8,6	9,5	6,5	7,7	5,8	6,7	4,7	10,5	7,8	9,4	6,3	10,5	6,5	6,8	6,1
Axit linoleic (C _{18:2})	60,8	58,5	57,9	57,9	54,7	55,0	48,2	43,4	46,4	43,2	56,5	57,4	55,9	58,6	55,5	52,9	50,0	50,4
Axit linolenic (C _{18:3})	5,8	8,8	5,6	8,4	5,2	5,8	4,5	4,9	4,7	4,3	5,1	7,2	5,6	5,7	4,8	6,0	5,9	4,7

30% Lipozyme TLIM trong 72 giờ ở 57°C. Theo Gan và cộng sự [10], lượng axit capric liên kết vào lecithin đạt lần lượt 4,8 mol% và 18,9 mol% với xúc tác Lipozyme TL IM và Lipozyme RM IM.

3.2. Đánh giá sự liên kết của axit béo mạch trung bình vào phân tử PC và PE

Tiến hành phân tách PC và PE của lecithin và lecithin biến đổi; phân tích thành phần axit béo của các phân tử PC và PE bằng GC (Bảng 2).

Kết quả phân tích cho thấy, thành phần axit béo của PC và PE trong lecithin gồm các axit chính axit linoleic, axit palmitic, axit oleic hoặc axit linolenic; các axit béo mạch trung bình không có trong thành phần của lecithin. Các axit béo mạch trung bình liên kết vào PC và PE của lecithin chênh lệch không nhiều, cho thấy sự khác biệt của nhóm bazơ nitơ của PC và PE dường như ít ảnh hưởng tới khả năng xúc tác của hai enzyme RM IM và TL IM. (Hình 1)

Trong phần lớn nghiên cứu, PC được sử dụng làm chất tham gia phản ứng acidolysis có sử dụng lipase hoặc phospholipase làm xúc tác. Trong báo cáo này, lecithin được sử dụng để tham gia phản ứng và lecithin là hỗn hợp của nhiều phospholipid khác nhau. Kết quả phân tích HPLC (Hình 1), phospholipid chính của lecithin là PC và PE (lần lượt là 29,7% và 13,9%). Sau khi tiến hành phản ứng acidolysis, hàm lượng PC và PE giảm, giảm nhiều nhất là với trường hợp axit caproic và thấp nhất đối với axit caprylic sử dụng RM IM làm chất xúc tác. Điều này có thể do đối với tổng hợp

phospholipid biến đổi, acidolysis là phản ứng gồm 2 bước đó là thủy phân phospholipid tự nhiên để tạo thành lyso-phospholipid; tiếp theo tái ester lyso-phospholipid để tạo thành phospholipid biến đổi có chứa axit béo mới. Trong trường hợp này, khi axit béo được giải phóng từ phân tử phospholipid thì axit béo mạch trung bình sẽ thay thế để tạo thành một phân tử phospholipid biến đổi, tuy nhiên axit béo này vẫn có thể tiếp tục tham gia vào phản ứng ester hóa. Hơn nữa, lysophospholipid cũng có thể có trong hỗn hợp phản ứng vì chúng không tham gia vào phản ứng tạo ester; hoặc phospholipid biến đổi lại bị thủy phân, do đó lượng phospholipid trong hỗn hợp lecithin biến đổi giảm. (Bảng 2)

4. Kết luận

Nhóm nghiên cứu tiến hành thí nghiệm thay đổi thành phần axit béo của lecithin với xúc tác enzyme Lipozyme RM IM và Lipozyme TL IM. Axit béo mạch carbon trung bình từ 6 carbon đến 12 carbon liên kết vào lecithin tăng theo chiều dài mạch carbon đối với cả 2 enzyme và đạt cao nhất 30,8 mol% khi sử dụng RM IM làm xúc tác. Cả 2 enzyme đều có khả năng xúc tác phản ứng tạo lecithin biến đổi, tuy nhiên khi sử dụng enzyme RM IM làm xúc tác, tỷ lệ các axit liên kết vào lecithin đạt cao hơn so với TL IM. Trong trường hợp này, sử dụng lecithin (hỗn hợp nhiều phospholipid) làm cơ chất tham gia phản ứng thì sự liên kết của các axit béo vào PC và PE của lecithin không chênh lệch nhiều ■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Küllenberg, D., Taylor, L., Schneider, M., Massing, U. (2012), Health effects of dietary phospholipids, *Lipids in health and disease*, Số 11:3.
2. Betzing, H. (2001), *Process for preparation of a new lysolecithin mixture*, US patent 3592829.
3. Joshi, A., Paratkar, S.G., Thorat, B.N. (2006), "Modification of lecithin by physical, chemical and enzymatic methods", *European Journal of Lipid Science and Technology*, Số 108, tr 363-373.
4. Vikbjerg AF, Mu H, Xu X (2007), Synthesis of structured phospholipids by immobilized phospholipase A2 catalyzed acidolysis, *J Biotechnol*, Số 128, tr 545-554
5. Kim I-H, Garcia HS, Hill CG (2007) Phospholipase A1-catalyzed synthesis of phospholipids enriched in n-3 polyunsaturated fatty acid residues. *Enzym Microb Technol*, Số 40, 1130-1135.

6. Pedersen KB (2001), *Interesterification of phospholipids*. US Patent 6,284,501.
7. Davidsen, J., Jørgensen, K., Andresen, L., Mouritsen, O.G. (2003), Secreted phospholipase A2 as a new enzymatic trigger mechanism for localised liposomal drug release and adsorption in diseased tissue, *Biochim. Biophys. Acta*, Số 1609, 95-101.
8. Egger D., Wehtje E., Adlercreutz P. (1997), Characterization and optimization of phospholipase A2 catalyzed synthesis of phosphatidylcholine. *BBA Protein Struct Mol Enzymol*, Số 1343, 76-84.
9. Peng L., Xu X., Mu H., Høy C.-E., Adler-Nissen J. (2002), Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology, *Enzyme and Microbial Technology*, Số 31, 523-532.
10. Gan L.-J., Wang X.-Y., Yang D., Zhang H., Shin J.-A., Hong S.-T., Park S.H., Lee K.-T. (2014), Emulsifying properties of lecithin containing different fatty acids obtained by immobilized Lecitase Ultra-catalyzed reaction, *J Am Oil Chem Soc*, Số 91, 579-590.

Ngày nhận bài: 25/2/2023

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 16/3/2023

Ngày chấp nhận đăng bài: 10/4/2023

Thông tin tác giả:

VŨ PHƯƠNG LAN

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

A STUDY ON THE SYNTHESIS OF LECITHIN CONTAINING MEDIUM CHAIN FATTY ACIDS

● **VU PHUONG LAN**

Faculty of Food Technology

University of Economics - Technology for Industries

ABSTRACT:

RM IM lipozyme and TL IM lipozyme are used as catalyst for the acidolysis process between lecithin and free medium chain fatty acids. After this process, the obtained modified lecithin's fatty acid is analyzed by using the gas chromatograph method, and the modified lecithin's PC and PE contents are analyzed by using the high performance liquid chromatograph method. All selected fatty acids incorporated to lecithin. The highest content of fatty acid is 30.8 mol% that obtained from the reaction of lauric acid with the use of RM IM as catalyst. This study also finds out that RM IM lipozyme is more effective than TL IM lipozyme when it is used as a catalyst.

Keywords: phospholipid, glycerophospholipid, lecithin, lipase, gas chromatography.