

# NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG ENZYME TRONG SẢN XUẤT LECITHIN GIÀU PHOSPHATIDYCHOLINE TỪ DẦU ĐẬU TƯƠNG

*Đỗ Thị Thanh Huyền<sup>1</sup>, Nguyễn Mạnh Đạt<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Hồng Linh<sup>1</sup>, Đỗ Thị Thủy Lê<sup>2</sup>, Bùi Thị Hồng Phương<sup>1</sup>*

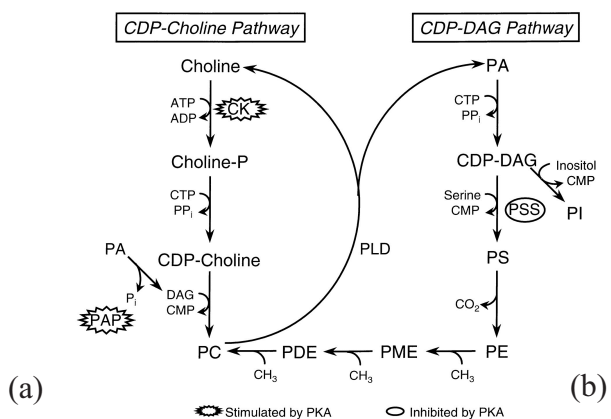
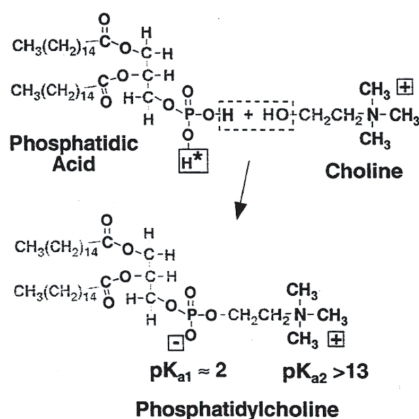
Lecithin thương mại là lecithin có chứa phosphatidylcholine cao được sản xuất từ thực vật, động vật và các nguồn vi sinh vật. Tuy nhiên để sản xuất ở quy mô lớn thì đậu tương là nguồn nguyên liệu chính được chú ý. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng lecithin thô từ quá trình khử nước dầu đậu tương để chuyển lecithin thành phosphatidylcholine. Quá trình phosphatidylcholine hóa sử dụng enzyme thương mại phospholipase D từ chủng *Streptomyces chromofucus* (Sigma) ở điều kiện: nồng độ enzyme phospholipase D là 0,2U/ml; bổ sung choline chloride 2,5%; pH 5,5-6,5; thời gian phản ứng 40 phút. Hàm lượng PC chuyển hóa đạt 23,8% so với PC ban đầu là 11,5%. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể sử dụng enzyme phospholipase D để sản xuất lecithin giàu phosphatidylcholine ứng dụng trong sản xuất thực phẩm chức năng với nguồn nguyên liệu là hạt đậu tương sản có tại Việt Nam.

**Từ khóa:** Lecithin, phosphatidylcholine, phospholipase D, đậu tương.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lecithin là chất hoạt động bề mặt được sử dụng nhiều trong công nghiệp thực phẩm, thức ăn chăn nuôi... Bản chất lecithin là phospholipid tự nhiên gồm các hợp chất khác nhau dựa trên sự khác biệt nhóm phân cực như phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), acid phosphoric (PA), phosphatidylserine (PS)... trong số

các hợp chất đó thì PC là chất chính và có những đặc tính sinh học quan trọng cho hoạt động sống của tế bào. Do vậy, ngày nay việc sản xuất lecithin thương mại người ta thường chú ý nhiều đến việc tăng/làm giàu hàm lượng PC có trong sản phẩm, lecithin giàu hàm lượng PC ( $\geq 20\%$ ) được sử dụng trong công nghiệp dược phẩm, thực phẩm và mỹ phẩm [1,4].



**Hình 1. Quá trình tổng hợp phosphatidylcholine [3,4]**

<sup>1</sup>ThS - Viện Công Nghiệp Thực Phẩm

<sup>2</sup>TS - Viện Công Nghiệp Thực Phẩm

Ngày nhận bài: 1/2/2017

Ngày phản biện đánh giá: 1/3/2017

Ngày đăng bài: 3/5/2017

Con đường tổng hợp phosphatidylcholine từ acid phosphatidic (hình 1a) hoặc theo chu trình CDP-Choline hay CDP-DAG (hình 1b). Như vậy theo các chu trình này, PC có thể được chuyển hóa từ PA hoặc PS, PE. Dựa trên các thông tin trên, người ta đã nghiên cứu và sử dụng thành công enzyme chuyển hóa phospholipid từ các phospholipid (PE, PS, PA..) tạo ra PC có hàm lượng cao, hiệu quả cao và mang tính chọn lọc [3,4]. Trong số các phospholipase thì phospholipase D được sử dụng một mình hoặc kết hợp với phospholipase A, để thủy phân lecithin có thành phần là acid phosphatidic hoặc lysophosphatidic nhằm tăng hàm lượng PC của sản phẩm [11].

Trong sản xuất dầu đậu tương, phospholipid là một phụ phẩm ở giai đoạn tiền xử lý lọc dầu. Dầu đậu tương thô chứa 1,5-3,0% phospholipid., sau khi tinh luyện (degumming) thu được lecithin thô chứa khoảng 30% phospholipid, đây là nguồn phospholipid quan trọng để chuyển hóa tạo sản phẩm lecithin giàu PC [2,3].

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu lựa chọn các điều kiện sử dụng enzyme để tạo lecithin giàu phosphatidylcholine từ dầu đậu tương.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Nguyên liệu

Nông sản: Hạt đậu tương DT 2008 mua tại thị trường Việt Nam.

Các enzyme thương mại sử dụng: Phospholipase D1 (từ *Streptomyces sp.*); Phospholipase D2 (từ *Streptomyces chromofucus*); Phospholipase D3 (từ hạt lạc); Phospholipase D4 (từ cải bắp)-Sigma-Aldrich (Mỹ).

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Phương pháp tách chiết lecithin từ hạt đậu tương bằng quá trình

#### khử keo nước (hydrate hóa lecithin)

Hạt đậu tương được nghiền nhỏ và tách béo bằng n-hexan, tỷ lệ dung môi: nguyên liệu là 4:1. Hỗn hợp được lắc ở 60°C/4 giờ, khuấy 150 vòng/phút. Sau đó lọc, thu dung môi và cô loại dung môi thu dầu đậu tương thô. Dầu thô được hydrate hóa bổ sung nước 2%, nhiệt độ 60°C trong thời gian 20 phút, khuấy trộn 200 vòng/phút. Ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút, thu keo dầu chứa lecithin [1].

#### 2.2.2. Phương pháp loại tạp chất không tan trong acetone

Lecithin thô được bổ sung acetone với tỷ lệ lecithin thô /acetone 1:6 (w/v), hỗn hợp được khuấy trong 1 giờ. Sau quá trình lắng, thu lecithin sạch phía dưới [2].

#### 2.2.3. Phương pháp phosphatidylcholine hóa

Hòa tan lecithin trong đệm ethyl acetate pH 7,0 có chứa choline chloride (CC). Bổ sung enzyme, phản ứng được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ, pH và thời gian thích hợp, khuấy 150 vòng/ phút. Bất hoạt enzyme, ly tâm thu cặn chứa lecithin giàu PC [3].

### 2.3. Phương pháp phân tích

#### 2.3.1. Phân tích phospholipid bằng phương pháp sắc ký bản mỏng TLC (Thin Layer Chromatography)

Sử dụng bản sắc ký Silica gel 60 F254. Dung môi chạy sắc ký gồm chloroform: methanol: H<sub>2</sub>O tỷ lệ 75: 25: 3 (v/v), dung môi hiện màu I<sub>2</sub> (1,27g I<sub>2</sub> + 3,0g KI) /50 ml H<sub>2</sub>O. mẫu chuẩn được hòa tan trong chloroform: methanol (95: 5) [4].

#### 2.3.2. Phân tích phospholipid bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Chất chuẩn hòa tan bởi methanol/chloroform (1: 1), ở nồng độ 1mg/ml, lọc ly tâm qua màng lọc 0,2µm ở 10000 vòng/phút, trong 3 phút. Thu dịch chạy HPLC [5].

### III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Nghiên cứu thu nhận lecithin sạch

Lecithin thô thu sau quá trình làm sạch bằng acetone được xác định theo phương pháp TLC, thể hiện ở hình 3.1.



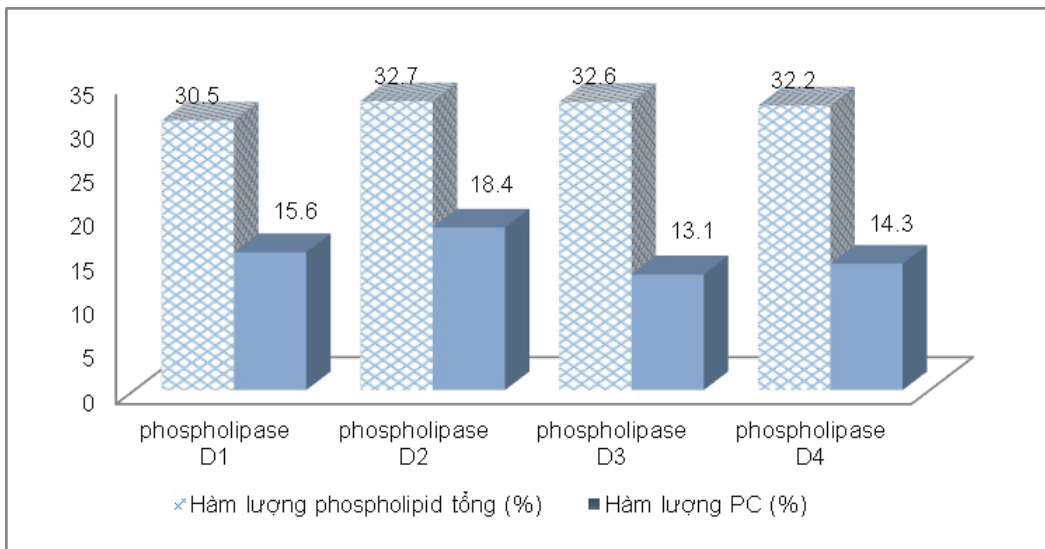
Qua hình ảnh TLC thấy rằng các tạp chất như triglycerides và chất béo sẽ được hòa tan trong acetone, do đó rửa acetone lặp lại 2 lần đã loại bỏ các tạp chất làm cho độ sạch của lecithin cao hơn.

**Hình 3.1. Hình ảnh TLC sau quá trình rửa acetone**  
(1)PC chuẩn; (2,3) Lecithin thô; (4) Lecithin sau quá trình rửa acetone (lecithin sạch)

#### 3.2. Nghiên cứu lựa chọn enzyme thích hợp

Nghiên cứu lựa chọn 4 loại enzyme phospholipase D điển hình là phospholipase D1 (PLD1), phospholipase D2(PLD2), phospholipase D3(PLD3) và D4(PLD4). Điều kiện phản ứng gồm 10 g lecithin thô, 50 ml dung dịch đệm có

chứa nồng độ 1 % choline chloride (CC). Bổ sung enzyme theo các nồng độ 0,1 U/ml, phản ứng được thực hiện ở 30°C trong 1 giờ và khuấy 150 vòng/ phút. Phân tích hàm lượng phospholipid tổng và hàm lượng PC tạo thành, kết quả được thể hiện trong hình 3.2.



**Hình 3.2. Biểu đồ minh họa ảnh hưởng của loại enzyme sử dụng cho quá trình phosphatidylcholine hóa**

Qua kết quả ở hình 3.2 chúng tôi thấy rằng: Khi sử dụng các enzyme thuộc nhóm phospholipase D cho hiệu suất thu nhận phospholipid tổng không khác nhau nhiều (đạt từ 30,5-32,7%). Tuy nhiên, sau thời gian phản ứng PLD2 cho hiệu suất thu nhận PC đạt cao nhất 18,4% tiếp sau đó là enzyme PLD1, PLD4 và PLD3 đạt 15,6%, 14,3% và 13,1% tương ứng. Do đó, nhóm thực hiện chọn sử dụng enzyme PLD2 (enzyme từ chủng *Streptomyces chromofucus*) để thực hiện quá trình phosphatidylcholine hóa.

### 3.3. Nghiên cứu điều kiện thích hợp cho quá trình phosphatidylcholine hóa

#### 3.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ enzyme

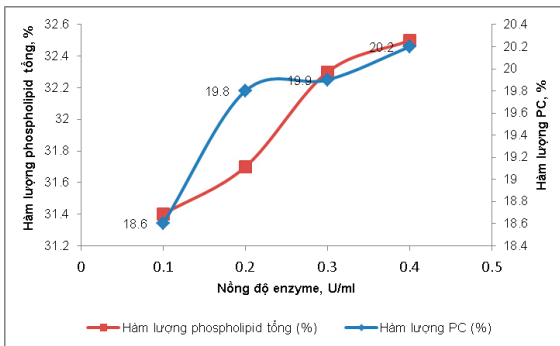
Tiến hành phản ứng nồng độ enzyme là 0,1 U/ml, 0,2 U/ml, 0,3 U/ml và 0,4 U/ml. Kết quả phân tích hàm lượng PC tạo thành sau phản ứng phosphatidyl-

choline hóa được thể hiện trong hình 3.3. Qua hình 3.3 thấy rằng, sử dụng nồng độ enzyme thích hợp nhất là 0,2 U/ml, ở nồng độ enzyme 0,3-0,4 U/ml có hàm lượng PC đạt cao và cao hơn không nhiều so với ở nồng độ enzyme 0,2 U/ml.

#### 3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian trong phản ứng, tiến hành ở các khoảng thời gian 10, 20, 30, 40, 50 và 60 phút. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trong hình 3.4.

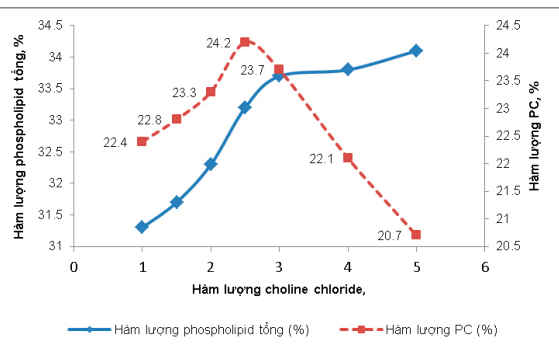
Qua hình 3.4 thấy rằng, tăng thời gian phản ứng hàm lượng phospholipid và hàm lượng PC tăng và tăng đến khoảng thời gian phản ứng là 40 phút, sau đó hàm lượng PC lại giảm dần. Với kết quả này có thể giải thích là thời gian phản ứng dài quá thì PC bị thủy phân chuyển hóa thành phospholipid khác.



**Hình 3.3. Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến hiệu suất thu nhận PC**

#### 3.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ choline chloride

Đối với phản ứng phosphatidylcholine hóa thì sự xuất hiện của choline chloride là rất quan trọng, nếu phản ứng không có choline chloride thì các phospholipid (PA, PE) sẽ không chuyển hóa thành PC



**Hình 3.4. Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của thời gian phản ứng tới hiệu suất thu nhận PC**

được, khi đó sẽ tạo ra các sản phẩm không mong muốn có trong phản ứng. Việc sử dụng choline chloride sẽ quyết định tới hiệu suất phosphatidylcholine hóa các phospholipid thành PC. Choline chloride được coi là một chất nền đặc hiệu cho phản ứng phosphatidylcholine.

Tiến hành bổ sung choline chloride theo các nồng độ 1, 2, 2,5, 3 và 5% enzyme đưa vào phản ứng 0,2 U/ml. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở hình 3.5.

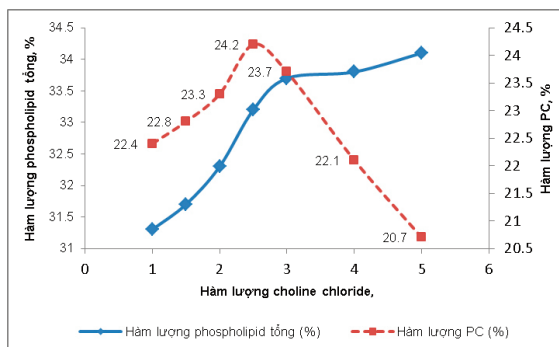
Qua kết quả chúng tôi thấy rằng: Hàm lượng PC đạt giá trị cao nhất tại nồng độ CC sử dụng là 2,5 %, hàm lượng PC chuyển hóa đạt 24,2 %. Ở các nồng độ CC 3 %, 4 % và 5 % hàm lượng PC đạt không cao, hiệu ứng này có thể là do nồng độ CC cao gây nên hiện tượng chất ức chế phản ứng.

Tuy nhiên, có báo cáo cũng cho rằng hiện tượng chất ức chế tạo sản phẩm PC khi sử dụng PLD từ *Streptomyces* khi sử dụng nồng độ CC tại giá trị 5M [3], cũng theo tác giả cho thấy quá trình phosphatidylcholine hóa làm tăng hàm lượng PC của lecithin đậu tương từ ban đầu khoảng 35 % lên 60-70 % ở CC mức 2,5 M và báo cáo của tác giả, thì sử dụng nồng độ CC lên tới 20 % khi sử dụng enzyme biến nạp từ chủng *Streptomyces racemochromogenes* vào chủng *Streptomyces lividans*, hiệu suất chuyển thành

PC ban đầu từ 65,7% lên 78,5%. Như vậy, ảnh hưởng của chất nền CC trong phản ứng phosphatidylcholine phụ thuộc nhiều vào hàm lượng PC có trong lecithin ban đầu và nguồn enzyme sử dụng.

### 3.3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của pH

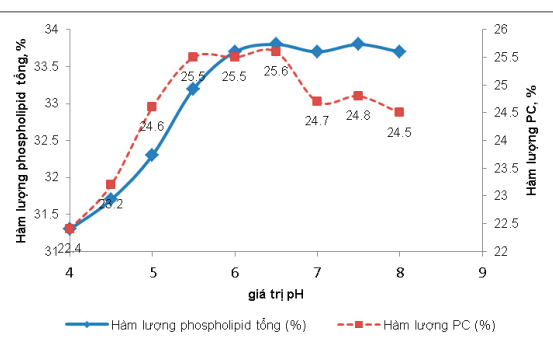
Nghiên cứu ảnh hưởng của pH tiến hành phản ứng ở pH 4,0 -8,0 ở nhiệt độ không đổi 30°C với lecithin trong sự hiện diện của 2,5 % CC. Kết quả được thể hiện ở hình 3.6. Kết quả cho thấy phản ứng phosphatidylcholine cho hiệu suất chuyển hóa PC đạt cao ở pH 5,5 ở 30°C và trong khoảng pH 6-6,5 cũng cho kết quả cao tương đương và khác nhau không nhiều. Với kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu của tác giả Nakazawa và cs [3] và họ có kết luận rằng với sự thay đổi của nhiệt độ và độ pH sẽ không ảnh hưởng đến nền đặc trưng nhưng ảnh hưởng đến tốc độ phản ứng và sử dụng hỗn hợp một số enzyme PLD trong các điều kiện khác nhau sẽ không tăng cường hàm lượng PC. Do đó, chọn giá trị pH thích hợp trong khoảng pH từ 5,5-6,5.



**Hình 3.5. Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của hàm lượng choline chloride đến hiệu suất thu nhận PC**

### 3.4. Đánh giá chất lượng sản phẩm lecithin giàu phosphatidylcholine

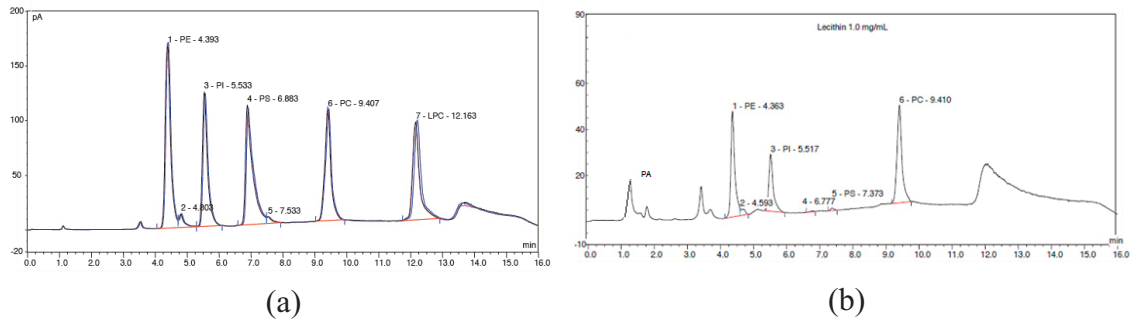
Hàm lượng của các phospholipid được phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sắc ký đồ thể hiện



**Hình 3.6. Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của pH đến hiệu suất thu nhận PC**

trong hình 3.7, PC xuất hiện tại thời gian 9,2-9,4 phút. Mẫu lecithin giàu phosphatidylcholine được so sánh với lecithin thô ban đầu. Kết quả phân tích được trình bày ở bảng 1.





**Hình 3.7. Hình ảnh sắc ký đồ HPLC của mẫu phospholipid chuẩn (a) và mẫu lecithin giàu phosphatidylcholine (b)**

Qua bảng kết quả phân tích trên thấy rằng, sản phẩm dạng dịch lecithin đã được làm giàu, hàm lượng phosphatidylcholine tăng từ 11,5 % lên 23,8 %.

#### IV. KẾT LUẬN:

Kết quả nghiên cứu cho thấy enzyme phù hợp cho quá trình chuyển hóa lecithin từ dầu đậu tương thành lecithin giàu phosphatidylcholine là phospholipase D, enzyme thương phẩm từ chủng *Streptomyces chromofucus*. Điều kiện thích hợp cho quá trình phosphatidylcholine hóa ở nồng độ enzyme phospholipase D là 0,2 U/ml; thời gian phản ứng 40 phút; bổ sung choline chloride 2,5 %; pH 5,5-6,5. Lecithin giàu PC đạt 23,8 %.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Eshratabadi, P., et al. (2008). *Enhanced Degumming of Soyabean Oil and its In-*

*fluences on Degummed Oil and Lecithin*. Iranian Journal of Chemical Engineering. 5(1): p. 65-73.

- Jangle, R.D., V.P. Magar, and B.N. Thorat, (2013). *Phosphatidylcholine and its purification from raw de-oiled soya lecithin*. Separation and Purification Technology. 102(0): p. 187-195.
- Nakazawa, Y., et al. (2011). *Large-Scale Production of Phospholipase D from *Streptomyces racemochromogenes* and Its Application to Soybean Lecithin Modification*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 165(7-8): p. 1494-1506.
- Van Nieuwenhuyzen, W. (2010). *Lecithin and Other Phospholipids, in Surfactants from Renewable Resources*. 2010, John Wiley & Sons, Ltd. p. 191-212.
- Zhou, H., et al. (2002). *Determination of phosphatidylcholine by high performance liquid chromatography in the soybean mixed phospholipid*. Journal of Qiqihar University, 2002. 18(4): p. 33-34.

**Summary****RESEARCH ON APPLICATION OF ENZYMES IN PRODUCTION OF PHOSPHATIDYCHOLINE-ENRICHED LECITHIN FROM SOYBEAN OIL**

Commercial lecithin normally contains high phosphatidylcholine content and could be originated from plants, animals or microorganisms. However, soybean is the main material source for lecithin production at industrial scale. In this research, raw lecithin obtained from the dehydration of soybean oil will be utilized to be converted into phosphatidylcholine. The phosphatidylcholinization by commercial enzyme namely phospholipase D from *Streptomyces chromofucus* (Sigma) was done at conditions as phospholipase D concentration of 0.2U/ml; added choline chloride of 2.5%; pH 5.5-6.5; reaction time of 40 minutes. Converted PC content reached 23.8% from the initial PC content of 11.5%. The research result showed that phospholipase D enzyme could be utilized for the production of phosphatidylcholine enriched lecithin from available soybean source in Vietnam.

**Key words:** *Lecithin, phosphatidylcholine, phospholipase D, soybean.*

