

NGHIÊN CỨU CÁC ĐIỀU KIỆN PHẢN ỨNG THỦY PHÂN MỠ SINH VẬT BIỂN TẠO SẢN PHẨM ALKYLGLYXERIN ETE

Chu Quang Truyền¹, Đặng T. Phương Ly¹, Nguyễn Văn Sơn, Nguyễn Tiến Dũng¹, Phạm Minh Quân¹, Nguyễn Trung Hưng¹, Nguyễn V. Tuyên Anh¹, S. N. Kasyanov², Latyshev N. A², Phạm Quốc Long¹

1. Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên, Viện KH&CN VN
2. Viện Sinh vật biển, Phân viện Viễn Đông, Viện HLKH LB Nga

Tóm tắt:

Lipid rất phong phú trong các sinh vật biển và có chứa đựng nhiều chất có hoạt tính sinh học. Một trong những thành phần phổ biến nhất trong lipid của nhiều loài sinh vật sống trong nước là 1-O-alkyl-diaxylglycerin (ADG), đây là một tiền chất sinh tổng hợp các yếu tố kích hoạt tiểu cầu (PAF). Tuy nhiên, trong hầu hết các nghiên cứu đã biết người ta đều không sử dụng ADG tự nhiên mà sử dụng các sản phẩm thủy phân của chúng - các ête alkylglycerin. Bài báo này sẽ trình bày nghiên cứu về điều kiện thủy phân lipid của các sinh vật biển để sản xuất sản phẩm này, trong điều kiện như sau: ethanol nồng độ từ 10-70%, tỷ lệ lipid / ethanol từ 1:0,75 đến 01:03, tỷ lệ lipid / KOH từ 1:0,11 đến 1:0,2, nhiệt độ thủy phân 35-75°C; thời gian 30-100 phút. Các điều kiện tối ưu cho quá trình này là: nồng độ của ethanol: 50%, tỷ lệ lipid / ethanol là 01:02, tỷ lệ lipid / KOH là 1:0,14; thủy phân ở nhiệt độ 60 °C và thời gian thủy phân: 70 phút. Năng suất của quá trình này đạt 95%.

STUDY ON HYDROLYSIS CONDITIONS OF MARINE ORGANISMS LIPIDS TO PRODUCE ALKYLGLYCERIN ETHER

Abstract:

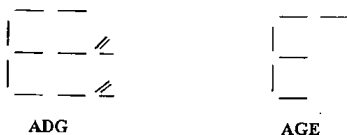
Lipid is abundant in marine organisms and contains variety of bioactive substances. One of the main components of lipid in hydrobionts is 1-O-alkyl-diaxylglycerin (ADG), this is a precursor in the biosynthesis of platelet-activating factor (PAF). However, in most of the studies, people use their hydrolysis products - the alkylglycerin ether. This paper will study the hydrolysis conditions of marine organisms lipids to produce this product as follow: ethanol concentration from 10-70%; the rate of lipid/ethanol from 1:0,75 to 1:3; the rate of lipid/KOH from 1:0,11 to 1:0,2, hydrolysis temperature 35-75°C; treatment duration 30-100 mins. The optimum conditions for this process is: concentration of ethanol 50%; the rate of lipid/ethanol is 1:2; the rate of lipid/KOH is 1:0,14; hydrolysis temperature 60°C and treatment duration 70 mins. The productivity of this process is 95%.

1. MỞ ĐẦU

Đại dương chiếm tới 70% diện tích bề mặt trái đất, là nơi có nguồn tài nguyên vô cùng lớn và là nơi sinh sống của 34 trong 36 ngành sinh vật có mặt trên trái đất với hơn 500.000 loài thực, động vật đã được biết đến. Đây chính là nguồn cung cấp vô số các sản phẩm tự nhiên quý giá như rong biển, ruột khoang, rêu biển, thân mềm, động vật có xương sống và từ các loài vi khuẩn biển đến các vi khuẩn lam..., là kho ngoại hạng cung cấp rất nhiều các hoạt chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học đặc biệt, mà nhiều chất trong đó không hề có trong các sinh vật trên cạn. Trong vòng 50 năm trở lại đây, nghiên cứu các chất có hoạt tính sinh học và tạo các sản phẩm có giá trị cao từ sinh vật biển đã trở thành mối quan tâm chung của các nhà khoa học liên ngành Hoá-Sinh-Y-Dược trên thế giới. Chi mới có trong số nhỏ các loài thực vật, động vật biển đã được nghiên cứu, mà đã có đến 14.000 hợp chất đã được phân lập.

Lipit trong sinh vật biển vô cùng giàu có và là những hợp chất có hoạt tính sinh học cao, đầu tiên phải kể đến là các axit béo không no đa nối đôi $\omega 3$ đã được sử dụng rất nhiều để chế tạo nên các chế phẩm dược và các thực phẩm bổ sung giàu hoạt tính sinh học. Và một trong những thành phần phổ biến nhất trong lipit của nhiều loài sinh vật sống trong nước (hydrobionts) ngoài các axit béo không no đa nối đôi, còn có 1-O-ankyl-diaxylglycerin (ADG) – đây là một hợp chất được tạo thành bởi glycerin, axit béo và rượu (batyl, chimyl và selachyl) [1, 2]. Gốc ankyl liên kết bởi liên kết ete với phân tử diaxylglycerin tạo nên tính chất sinh học đặc trưng của ADG và khác biệt với tính chất của các axit béo không no đa nối đôi. ADG là tiền chất trong sinh tổng hợp các nhân tố hoạt hóa tiểu cầu (FAT), có ảnh hưởng kích thích lên các tế bào máu và hệ miễn dịch, có tác dụng tích cực trong việc điều trị các bệnh rối loạn tự miễn dịch như viêm khớp, bệnh vẩy nến và bệnh lở ngoài da [3], ngoài ra còn sử dụng đối với bệnh tiểu đường, cao huyết áp và bệnh tim, và rất có tiềm năng trong điều trị bệnh ung thư [4, 5, 6, 7].

Qua các tài liệu tham khảo cho thấy, ADG có mặt trong lipit tổng của nhiều loài sinh vật biển, nhưng hầu như những nghiên cứu đã biết đều không sử dụng ADG tự nhiên mà sử dụng sản phẩm thủy phân của chúng – các ankyglyxeryl ete (viết tắt là AGE), AGE được hình thành trong dạ dày và trong ruột non khi ADG trong thức ăn chịu tác dụng của lipaza. Các hợp chất AGE không độc, bền với sự oxi hóa và không bị thay đổi dưới tác dụng của nhiệt độ cao. AGE là một trong những chất nhũ tương hóa mạnh nhất, tạo nên nhũ tương nano, được sử dụng rất nhiều trong vận chuyển có một cách có địa chỉ các chế phẩm thuốc trong cơ quan và mô trong cơ thể con người [8].



Hình 1: Công thức cấu tạo chung của ADG và AGE

Phản ứng thủy phân lipit – là một trong những bước kỹ thuật quan trọng để thu được AGE từ dầu béo động vật thủy sản [9]. Đây là giai đoạn tốn kém nhiều xúc tác hóa học nhất, và dẫn đến hiệu quả quyết định của quá trình thu nhận được sản phẩm alkylglycerin ete từ nguyên liệu mỡ sinh vật biển. Trong trường hợp này chúng tôi nghiên cứu trên chất béo có cấu trúc độc đáo, vị trí đầu tiên trong phân tử glycerin là ete của một rượu mạch dài. Liên kết ete đòi hỏi một môi trường thủy phân nhẹ nhàng, điều này vô cùng quan trọng để giữ nguyên cấu trúc alkyl-glycerin và loại bỏ gốc axit béo tại vị trí số 2 và số 3. Chính vì thế việc khảo sát, tính toán các điều kiện, tỉ lệ cần thiết khi sử dụng các hỗn hợp nguyên liệu và dung môi trong phản ứng thủy phân để thu được sản phẩm với hiệu suất và chất lượng cao là rất cần thiết. Trong báo cáo này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện trong phản ứng thủy phân mỡ sinh vật biển tạo sản phẩm alkylglycerin ete.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu:

Phế liệu nội tạng sinh vật biển thu tại nhà máy chế biến thủy sản tại Vladivostok, Viễn Đông, LB Nga và được bảo quản trong điều kiện lạnh âm sâu (-20°C).

2. Phương pháp:

- Tách mỡ bằng phương pháp nhiệt:

Nguyên liệu đông lạnh được làm tan đông và được đun nóng ở 85°C trong vòng 150 phút để tách dầu béo (mỡ). Phần bã còn lại đem quay ly tâm để tách nốt phần mỡ có trong bã rồi gộp các phần thu được lại với nhau, thu được hỗn hợp mỡ sinh vật biển.

- Phản ứng thủy phân dầu béo:

Mỗi thí nghiệm thực hiện với 100ml mỡ sinh vật biển để trong dụng cụ tráng men khuấy đều và đun nóng, bổ sung dung dịch KOH trong dung môi EtOH, tiếp tục khuấy đều cho đến khi thực hiện hoàn toàn phản ứng thủy phân. Sau đó hỗn hợp được trung hòa bằng dung dịch H_2SO_4 15%. Pha bên dưới được loại bỏ, pha dầu béo bên trên được rửa 3 lần bởi cùng một thể tích nước 50°C . Sản phẩm thu được sau phản ứng thủy phân là lipit với thành phần chính là AGE và hỗn hợp các axit béo.

- Phân tích AGE trong hỗn hợp:

Lipit được tách thành các phân đoạn bằng cột silicagel và sử dụng hệ dung môi hexan-ethylacetat 1:1. Thành phần AGE ở dạng dẫn xuất TMS được xác định bằng máy sắc ký HP-6890, ghép nối với Mass selective Detector agilent 5973, cột: HP-5 ($0.25\text{m} \times 30\text{m} \times 0.25\text{mm}$). Xác định các pic sử dụng hỗn hợp chất chuẩn dẫn xuất TMS của AGE [10].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích thành phần của lipit phế liệu nội tạng sinh vật biển:

Nguyên liệu phế liệu nội tạng sinh vật biển được rửa đông khi sử dụng, sau khi xử lý bằng phương pháp nhiệt ở 85 độ C trong vòng 150 phút, chúng tôi thu được hỗn hợp lipit tổng (mỡ). Để đánh giá thành phần và hàm lượng các thành phần trong lipit tổng sẽ được dùng làm nguyên liệu cho phản ứng thủy phân, chúng tôi đã tiến hành phân tích và thu được kết quả trong bảng 1 như sau:

Bảng 1: Thành phần lipit nội tạng sinh vật biển

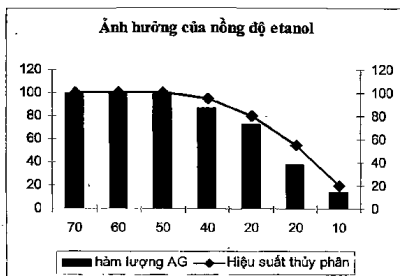
STT	Thành phần lipit	Hàm lượng
1	Triglyxerid	30
2	Alkylđiacylglyxerid (ADG)	33,8
3	Alkylglyxerin ete (AGE)	5,1
4	Axit béo tự do	11,7
5	Cholesterol	3,3
6	Ete của sterin	0,5
7	Mono- và diglyxerid	15,6
8	Phospholipit	-

Hàm lượng AGE trong mỡ nội tạng thủy hải sản thu được là 5,1 %, hàm lượng ADG là 33,8%. Đối với dầu béo thực vật, phản ứng thủy phân ADG để tạo AGE với các biến thể nhỏ thực hiện trong các điều kiện sau: tỉ lệ dầu béo/tác nhân (kiềm) 1:0,2 theo khối lượng, tỉ lệ lipit/ethanol 1:3 theo thể tích, hàm lượng nước trong ethanol là 60%, nhiệt độ quá trình là 70 độ C, thời gian thực hiện là 120 phút. Để lựa chọn các điều kiện tối ưu cho quá trình thủy phân chất béo từ nội tạng thủy hải sản, chúng tôi đã thực hiện các thí nghiệm với nhiều cấu từ.

3.2. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng tới hiệu suất phản ứng thủy phân dầu béo

3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ etanol

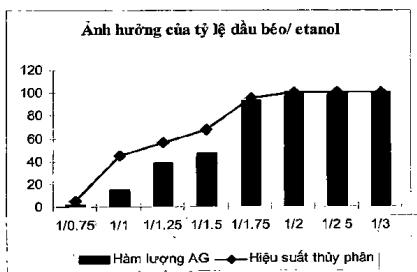
Trong mỗi thí nghiệm chúng tôi thay đổi chỉ một cấu từ. Để tìm ra nồng độ dung môi etanol tối ưu cho phản ứng thủy phân, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm dựa trên các điều kiện của phản ứng thủy phân đối với dầu thực vật như phía trên đã đề cập. Nồng độ dung môi etanol sẽ được thay đổi lần lượt là 10, 20, 30, 40, 50, 60 và 70%, tỷ lệ mỡ/dung môi là 1:3, tại điều kiện 70°C, thời gian phản ứng là 120 phút. Các kết quả được trình bày trên hình 2. Qua hình 2 cho thấy khi nồng độ etanol tăng (từ 10 đến 50%) thì hiệu suất của thủy phân sẽ tăng từ 20 lên đến 100%, hàm lượng AGE trong sản phẩm tăng từ 15% lên 100% so với lý thuyết, khi nồng độ dung môi cao hơn 50% thì hiệu suất phản ứng và hàm lượng AGE trong sản phẩm đã đạt mức tối đa và không thay đổi, việc tăng thêm nồng độ dung môi khi đó đã không có ý nghĩa. Như vậy, nồng độ dung môi etanol tối ưu được lựa chọn là 50%.



Hình 2: Ảnh hưởng của nồng độ dung môi lên hiệu suất phản ứng và hàm lượng AGE.

3.2.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ mỡ/etanol

Sau khi chọn được nồng độ etanol tối ưu cho phản ứng thủy phân là 50%, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ mỡ:etanol đến hiệu suất của phản ứng thủy phân và hàm lượng AGE trong sản phẩm với nồng độ etanol là 50%, nhiệt độ xử lý là 70°C và thời gian xử lý là 120 phút. Các tỉ lệ mỡ:dung môi etanol được thử nghiệm là 1:0,75; 1:1; 1:1,25; 1:1,5; 1:1,75; 1:2; 1:2,5; 1:3. Các kết quả thu được thể hiện tại hình 3.

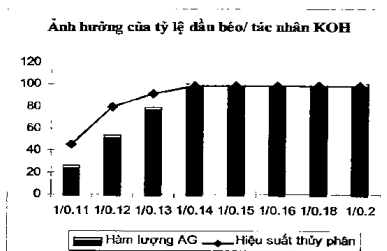


Hình 3: Ảnh hưởng của tỷ lệ mỡ (lipit)/etanol lên phản ứng thủy phân

Qua kết quả thu được cho thấy khi tỷ lệ dầu béo:etanol càng giảm thì hiệu suất thủy phân càng tăng lên. Khi tỷ lệ mỡ:etanol là 1:2; 1:2,5; 1:3 thì hiệu suất phản ứng thủy phân đạt 100%. So với tỷ lệ 1:3 thì với tỷ lệ mỡ:dung môi là 1:2 phản ứng thủy phân đã đạt được hiệu suất tối đa, khi đó lượng dung môi sẽ được tiết kiệm đáng kể nhất là khi thực hiện ở quy mô

lớn. Tuy nhiên ở giai đoạn này cũng phải lưu ý rằng khi giảm bớt thể tích dung môi, độ nhớt của hỗn hợp phản ứng tăng lên, các thao tác sẽ khó khăn hơn, giải pháp của trường hợp này chỉ có thể là bổ sung thêm dung môi để giảm độ nhớt. Dựa trên các kết quả nghiên cứu, đánh giá theo hiệu suất phản ứng và mức độ tiết kiệm nguyên liệu cũng như giảm thiểu ô nhiễm môi trường chúng tôi lựa chọn tỷ lệ mỡ (lipit):dung môi tối ưu là 1:2, có thể tăng nhẹ thể tích dung môi trong trường hợp cần thiết hoặc sử dụng thiết bị hỗ trợ như máy li tâm.

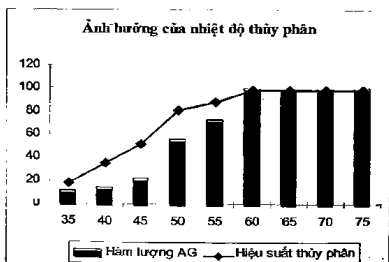
3.2.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ dầu béo/KOH



Hình 4: Ảnh hưởng của tỷ lệ dầu béo/ KOH lên hàm lượng AG và hiệu suất thủy phân

Để nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ mỡ/KOH chúng tôi đã thay đổi hàm lượng KOH trong mỗi thí nghiệm, các tỉ lệ mỡ:KOH được thử nghiệm là 1:0,11; 1:0,12; 1:0,13; 1:0,14; 1:0,15; 1:0,16; 1:0,18; 1:0,2. Các kết quả được thể hiện tại hình 4. Chúng tôi lựa chọn tỉ lệ KOH thấp nhất để phản ứng thủy phân được thực hiện với hiệu suất cao nhất và sự tiêu thụ KOH ở mức tối thiểu. Các kết quả thu được cho thấy, tỉ lệ mỡ:KOH là 1:0.14 là tỉ lệ tối ưu được lựa chọn.

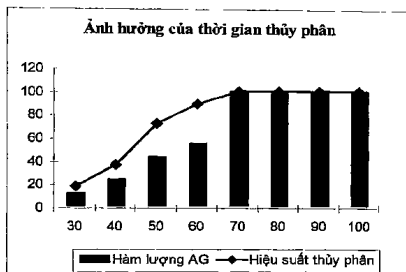
3.2.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân



Hình 5: Ảnh hưởng của thời gian lên hàm lượng AG và hiệu suất thủy phân

Các thí nghiệm về sự ảnh hưởng của nhiệt độ được thực hiện với các thí nghiệm thay đổi nhiệt độ từ 35 đến 75°C, cùng với các điều kiện tối ưu nồng độ dung môi 50%, tỉ lệ mỡ:dung môi 1:2; tỷ lệ mỡ:KOH 1:1,4 đã được lựa chọn ở trên. Kết quả ở hình 5 cho thấy hiệu suất phản ứng thủy phân và hàm lượng AGE tăng tỷ lệ thuận với nhiệt độ phản ứng, và phản ứng thủy phân được thực hiện hầu như hoàn toàn ở 60°C, chứ không phải ở 70°C như đối với dầu thực vật. Điều này giúp cho việc giảm đi đáng kể sự tiêu tốn năng lượng cho quá trình thủy phân và có thể không cần dùng tới sự hỗ trợ của thiết bị ngưng tụ.

3.2.5. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân



Hình 6: Ảnh hưởng của thời gian tới hàm lượng AG và hiệu suất thủy phân

Ảnh hưởng của thời gian thủy phân là yếu tố cùng được chúng tôi tiến hành nghiên cứu trong báo cáo này. Kết quả cho thấy, khi thời gian tăng lên, hiệu suất của phản ứng thủy phân và hàm lượng AGE trong sản phẩm thủy phân cũng tăng lên và sau 70 phút, phản ứng thủy phân được thực hiện hầu như hoàn toàn.

Thực hiện phản ứng với các điều kiện đã lựa chọn: thủy phân 1000 ml mỡ sinh vật biển với dung môi etanol 50%, tỷ lệ dầu béo:etanol là 1:2, tỷ lệ dầu béo/ tác nhân KOH là 1:0,14, nhiệt độ thủy phân là 60°C và thời gian thủy phân là 70 phút, sau phản ứng thu được 950 ml sản phẩm có hàm lượng thành phần như sau:

STT	Thành phần lipid	Hàm lượng
1	Triglycerid	10,2
2	Alkyldiacylglycerid (ADG)	0
3	Alkylglycerin ete (AGE)	38,1
4	Axit béo tự do	46,2
5	Cholesterol	3,5
6	Ete của sterin	0,5
7	Mono- và diglycerid	1,5
8	Phospholipit	-

Hiệu suất chung của phản ứng thủy phân là 95%.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu điều kiện của phản ứng thủy phân mỡ nội quan sinh vật biển, chúng tôi đưa ra kết luận như sau:

Điều kiện được lựa chọn đối với phản ứng thủy phân mỡ nội quan sinh vật biển là: nồng độ etanol 50%, tỷ lệ dầu béo:etanol là 1:2, tỷ lệ dầu béo/ tác nhân KOH là 1: 0,14, nhiệt độ thủy phân là 60°C và thời gian thủy phân là 70 phút.

Với các điều kiện trên, hàm lượng alkylglyxerin ete trong sản phẩm thu được sau phản ứng thủy phân là 38%, hiệu suất phản ứng là 95%.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được thực hiện dưới sự tài trợ của Phòng thí nghiệm mở nghiên cứu khoa học Nga-Việt giữa Viện Sinh vật biển Zhirmusky, Phân viện Viễn Đông, Viện HLKH LB Nga và Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện KH&CN Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hallgren B., Larsson S. The glyceryl ethers in man and cow. *J. Lipid Res*, 3(1), 39-43 (1962)
2. Burford R.G., Gowdey C.W. Anti-inflammatory activity of alkoxyglycerols in rats / *Arch. Int. Pharmacodyn*, 173 (1), 56-70 (1968).
3. Raulin J., *MINI_REV. MED. CHEM*, 5, 489-498 (2005).
4. Pedrono F. và cs., *Nutrition and Cancer*, 48, 64-69 (2004).
5. Haraldsson G. G., Thordarson P., Halldorsson và cs. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10, 3671-3674 (1999).
6. Parodi P. W. *J. Nutr.*, 127 (6), 1055-1060 (1997).
7. Pugliese P. T., Jordan K. Và cs. *J. Altern. Complement. Med.*, 4(1), 87-99 (1998).
8. Madhusudhan B.J. và cs. *Drug target.*, 5, 154-161 (2007).
9. Magnusson C.D. and Haraldsson G.G. Ether lipids. *Chem. Phys. Lipids*, 164, 315-340 (2010).
10. S. P. Kasianov, N. A. Latyshev và cs. Фармакологические эффекты биологически активной добавки к пище на основе моноалкилглицеринов. *Pacific Medical Journal*, No. 2 (2010)