

TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN VÒNG HÓA TẠO GAMMA CYCLODEXTRIN Ở TRẠNG THÁI TỰ DO BẰNG PHƯƠNG PHÁP BỀ MẶT ĐÁP ỨNG
OPTIMIZATION OF GAMMA CYCLODEXTRIN PRODUCTION USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Nguyễn Lan Hương, Phạm Thu Thủy, Vương Nguyệt Minh, Lê Phương Thanh
Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

TÓM TẮT

Cyclodextrins (CDs) là những oligosaccharit mạch vòng được ứng dụng nhiều trong thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm và công nghiệp hóa học. Trong đó, gamma-cyclodextrin (γ -CD) có kích thước vòng lớn chứa 8 đơn vị glucoza và khả năng hòa tan tốt hơn các CDs khác, nhưng lại cho hiệu suất thu hồi thấp. γ -CD thường được tổng hợp từ dịch thủy phân tinh bột dưới tác dụng của enzym cyclodextrin glycosyltransferaza (CGTase). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tối ưu điều kiện vòng hóa tạo γ -CD ở trạng thái tự do bằng phương pháp bề mặt đáp ứng với bố trí thí nghiệm kiểu tâm xoay đối xứng. Bốn biến được thay đổi: pH, nồng độ enzym, nhiệt độ và thời gian vòng hóa. Các phân tích thống kê cho thấy, khi các biến thay đổi trong khoảng biến thiên thì pH có ảnh hưởng nhiều đến hiệu suất tạo γ -CD. Điều kiện tối ưu cho quá trình vòng hóa: pH (7,5), nồng độ enzym (1%), nhiệt độ (65°C) và thời gian (40 giờ). Hiệu suất tạo γ -CD đạt 9,42%.

ABSTRACT

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides with multiple applications in the food, pharmaceutical, cosmetic, and chemical industries. Gamma-cyclodextrin (γ -CD) possesses more favorable properties such as a larger cavity, higher water solubility, and more bioavailability than other cyclodextrins but its retrieved efficiency is lower. A process for producing γ -CD from starch hydrolyzate solution with cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) was studied. Response surface methodology and central composite rotary design was employed to optimize γ -CD production from liquefied starch using CGTase. The four variables involved in this study were pH, amount of CGTase, temperature and reaction time. The statistical analysis of the results showed that, in the range studied; pH had a significant effect on γ -CD productivity. The optimized conditions were found to be comprised of: pH (7.5), amount of CGTase (1%), temperature (65°C), and reaction time (40 hours). The yield of γ -CD was obtained 9.42%.

I. MỞ ĐẦU

Cyclodextrins (CDs) là những oligosaccharit vòng được tạo nên bởi các đơn vị glucoza nối với nhau bằng liên kết α -1,4 glucozit [2, 3]. Những CDs phổ biến nhất là α , β và γ -CD, trong đó γ -CD được ứng dụng nhiều trong hai lĩnh vực dược phẩm và thực phẩm [1, 5, 6]. Trên thế giới, CDs đã được phát hiện hơn 100 năm, từ đó đến nay việc sản xuất và ứng dụng chúng ngày càng rộng rãi. Ở Việt Nam, nguồn nguyên liệu tinh bột tổng hợp ra CDs, đặc biệt là tinh bột sắn rất dồi dào, nhưng còn một số vấn đề về công nghệ, nên chưa có một cơ sở nào sản xuất CDs. Nguồn CDs vẫn phải nhập từ nước ngoài với giá thành cao.

CDs nói chung và γ -CD nói riêng thường được tổng hợp từ dịch tinh bột thủy phân, bằng phản ứng vòng hóa các chuỗi glucopyranoza

mạch thẳng dưới tác dụng xúc tác của enzym cyclodextrin glycosyltransferaza (CGTase). Sản phẩm sau quá trình vòng hóa thu được là một hỗn hợp chứa cả 3 loại CDs (α , β và γ -CD) với tỉ lệ khác nhau. Trong đó γ -CD chiếm tỷ lệ và cho hiệu suất thu hồi thấp nhất so với các CDs khác [6].

Trong nghiên cứu này chúng tôi tối ưu điều kiện vòng hóa tạo γ -CD ở trạng thái tự do bằng enzym CGTase theo phương pháp bề mặt đáp ứng.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên vật liệu

- Tinh bột sắn: sử dụng tinh bột sắn ở tỉnh Tây Ninh cung cấp cho các công ty dược phẩm. Một số thành phần hóa học của tinh bột sắn đã được

xác định (độ ẩm: 9,76%, hàm lượng tinh bột: 97,40%; tỷ lệ amiloza: 22,42%; amilopectin: 77,58%; nhiệt độ hồ hóa: 65-70°C).

- Chế phẩm TORUZYM 3.0L (3KNU/g) (chế phẩm chứa chủ yếu CGTase bền nhiệt): dạng lỏng, hãng Novo (Đan Mạch) cung cấp.

- Các hóa chất phân tích: α -, β -, γ -cyclodextrin chuẩn (Sigma-Aldrich); thuốc thử Bromocresol Green (BCG, Trung quốc).

2.2 Phương pháp phân tích

- Xác định hàm lượng γ -CD trong dung dịch bằng phương pháp so màu [7]

- Hiệu suất tạo γ -CD được tính bằng lượng γ -CD tạo thành trên khối lượng tinh bột sẵn sử dụng.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

- Dịch hóa 100 ml dịch tinh bột với các điều kiện như sau: tinh bột: 10g; CaCl₂ 0.3mg; enzym Toruzym: 0,2 ml; pH: 6,0; nhiệt độ dịch hóa: 80°C; thời gian dịch hóa: 40 phút. Sau khi dịch hóa, vô hoạt enzym ở 120°C trong thời gian 10 phút.

- Vòng hóa tạo γ -CD ở trạng thái tự do: dịch tinh bột sau dịch hóa được tiếp tục vòng hóa bằng enzym Toruzym với các điều kiện như trong bảng 1.

- Phương pháp quy hoạch thực nghiệm: Bốn yếu tố lựa chọn để xây dựng mô hình tối ưu là các yếu tố có ảnh hưởng mạnh đến khả năng vòng hóa tạo γ -CD bao gồm: pH, nồng độ enzym, nhiệt độ và thời gian. Thí nghiệm được bố trí theo ma trận trình bày ở bảng 2.

Bảng 1. Giá trị mã hóa và thực nghiệm

Các biến	Ký hiệu	Đơn vị	Mức độ				
			- α	-1	0	+1	+ α
pH	A		5,5	6,5	7,5	8,5	9,5
Nồng độ enzym	B	%	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Nhiệt độ	C	°C	55	60	65	70	75
Thời gian	D	h	20	30	40	50	60

Bảng 2. Các thí nghiệm tiến hành và kết quả

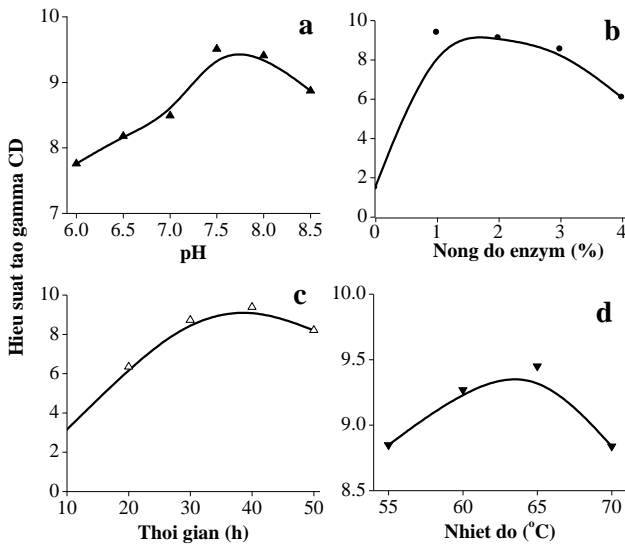
TT	pH	Nồng độ enzym (%)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (h)	Hiệu suất (%)
1	7,5	1,0	65	40	9,42
2	6,5	1,5	70	50	4,45
3	8,5	0,5	60	50	6,93
4	8,5	0,5	60	30	8,64
5	7,5	1,0	55	40	8,11
6	8,5	0,5	70	30	6,68
7	6,5	0,5	60	50	7,71
8	8,5	1,5	70	30	6,30
9	6,5	1,5	60	50	5,01
10	7,5	1,0	65	40	9,42
11	7,5	1,0	65	20	8,83
12	7,5	0,0	65	40	1,69
13	5,5	1,0	65	40	6,07
14	6,5	0,5	70	30	7,21
15	6,5	1,5	70	30	5,35
16	8,5	1,5	70	50	7,48
17	6,5	1,5	60	30	4,85
18	7,5	1,0	65	40	9,42
19	7,5	1,0	75	40	7,42
20	7,5	1,0	65	40	9,42
21	7,5	1,0	65	40	9,42
22	7,5	1,0	65	40	9,42
23	6,5	0,5	60	30	8,11
24	9,5	1,0	65	40	7,37
25	6,5	0,5	70	50	7,33
26	7,5	2,0	65	40	4,89
27	7,5	1,0	65	60	7,24
28	8,5	1,5	60	50	8,32
29	8,5	1,5	60	30	7,44
30	8,5	0,5	70	50	6,41

- Kết quả được xử lý bằng chương trình Design-Expert 7.1 (Stat-Ease, InC., Minneapolis, USA), để phân tích các hệ số hồi quy và bề mặt đáp ứng [4].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tạo γ -CD

Gamma-CD được tổng hợp ở trạng thái tự do dưới tác dụng của enzym CGTase phụ thuộc nhiều vào các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ của CGTase như: nồng độ dịch tinh bột, nồng độ enzym, pH, nhiệt độ và thời gian vòng hóa [2, 3]. Vì vậy trong nghiên cứu của mình, chúng tôi cũng khảo sát ảnh hưởng của lần lượt các yếu tố đến hiệu suất tạo γ -CD: pH (hình 1a), nồng độ enzym (hình 1b), thời gian (hình 1c) và nhiệt độ vòng hóa (hình 1d) (trong khi cố định các yếu tố khác) nhằm chọn khoảng biến thiên các yếu tố để tiến hành tối ưu hóa.



Hình 1. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tạo γ -CD

Kết quả hình 1 cho thấy, hiệu suất tạo γ -CD phụ thuộc vào cả 4 yếu tố. Chúng tôi chọn khoảng biến thiên của các yếu tố và tiến hành tối ưu (có xét đến ảnh hưởng đồng thời của các yếu tố đến hiệu suất tạo γ -CD) với các giá trị như sau: pH (6,5-8,5), nồng độ enzym (0,5-1,5%), thời gian (30-50h), nhiệt độ (60-70°C).

3.2 Tối ưu điều kiện vòng hóa tạo γ -CD

Hiệu suất tạo γ -CD khi thay đổi các yếu tố ảnh hưởng được trình bày trên bảng 2 cho thấy hiệu suất đạt được từ 1,69% đến 9,42%. So sánh hiệu suất tạo γ -CD nhỏ nhất và lớn nhất ta thấy điểm khác biệt lớn là nồng độ enzym. Lượng γ -CD tạo thành nhỏ nhất khi nồng độ enzym (0%), còn lượng γ -CD tạo thành nhiều nhất khi nồng độ enzym (1%). Điều này cho thấy nồng độ enzym ảnh hưởng nổi trội đến hiệu suất tạo γ -CD trong quá trình vòng hóa. Tuy nhiên để xem xét một cách tổng thể cần phải tính đến hệ số hồi quy và bề mặt đáp ứng của phương trình hồi quy.

Mức có nghĩa thống kê của mô hình được dựa vào chuẩn F của phân tích ANOVA, theo kết quả thu được ở bảng 3 cho thấy, mức độ tin cậy của mô hình là 99% hay mức có nghĩa $p < 0,05$. Chuẩn F của mô hình bằng 6,27 cũng khẳng định mô hình là có nghĩa. Hệ số hồi quy bội (R^2) của phương trình là 0,8541. Các phân tích thống kê cho thấy, khi các biến thay đổi trong khoảng biến thiên thì pH có ảnh hưởng nhiều đến hiệu suất tạo γ -CD, điều đó thể hiện ở mức có nghĩa của pH là $0,0394 < 0,05$ (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả phân tích hồi quy

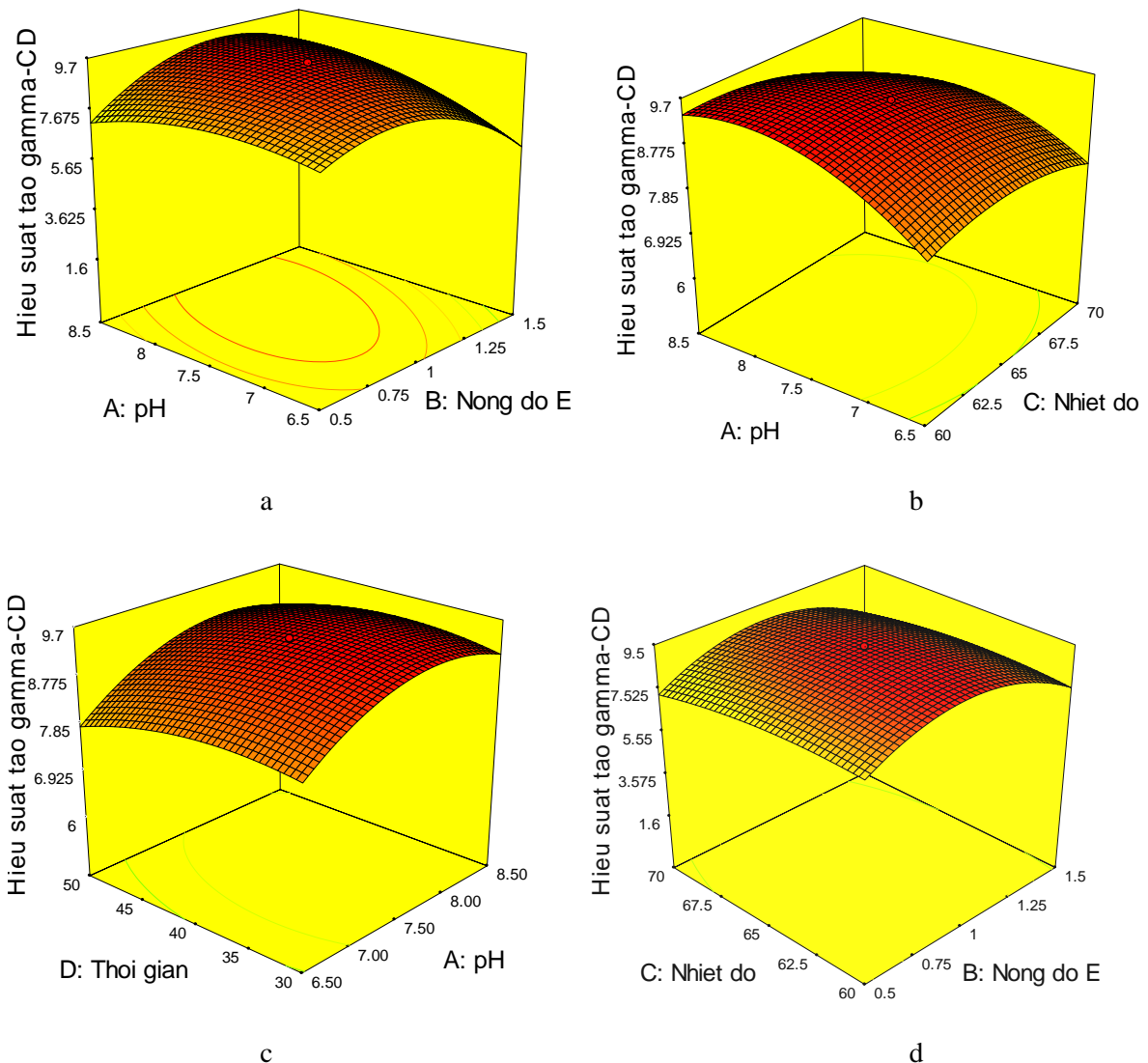
Thông số	Phương sai	Chuẩn F	Mức có nghĩa ($p > F$)
Mô hình	5,96	6,27	0,0005
A-pH	4,84	5,09	0,0394
B-Nồng độ E	0,49	0,51	0,4850
C-Nhiệt độ	2,15	2,26	0,1536
D-Thời gian	0,71	0,74	0,4020
AB	8,38	8,81	0,0096
AC	0,61	0,64	0,4363
AD	0,076	0,080	0,7818
BC	0,18	0,19	0,6655
BD	0,80	0,84	0,3732
CD	0,090	0,095	0,7626
A ²	10,65	11,20	0,0044
B ²	60,13	63,24	< 0,0001
C ²	3,59	3,78	0,0710
D ²	2,38	2,50	0,1347

Bề mặt đáp ứng của thí nghiệm tâm xoay đối xứng được biểu diễn theo mô hình bậc 2 như sau:

$$\text{Hiệu suất tạo } \gamma\text{-CD (Y)} = 9,42 + 0,45A - 0,14B - 0,3C - 0,17D + 0,72AB - 0,19AC + 0,069AD + 0,11BC + 0,22BD + 0,075CD - 0,62A^2 - 1,48B^2 - 0,36C^2 - 0,29D^2$$

Hình ảnh không gian 3 chiều bề mặt đáp ứng của hiệu suất tạo γ -CD đã được biểu diễn ở hình 2. Phân tích bề mặt đáp ứng của Y cho thấy điểm cho hiệu suất tạo γ -CD cao nhất chính là tâm của các hình elip (hình 1a, 1b, 1d). Điểm này có pH (7,5), nồng độ enzym (1%), nhiệt độ (65°C), thời gian (40 giờ), cho hiệu

suất tạo γ -CD: 9,42%. Kết quả này hoàn toàn tương thích với kết quả kiểm tra lại bằng thực nghiệm tại điểm tối ưu. Điều kiện tối ưu phù hợp với kết quả của một số tác giả, tuy nhiên hiệu suất γ -CD đạt được chưa cao. Hiệu suất γ -CD đạt được của các tác giả này từ 6 – 11% [2, 3]. Thực tế enzym CGTase vừa có khả năng tham gia phản ứng thủy phân tinh bột, phản ứng trao đổi giữa các mạch oligosacarit, phản ứng vòng hóa và phản ứng phá vòng. Như vậy đặc tính tạo vòng chỉ là một trong các hoạt tính xúc tác của CGTase. Do đó, để nâng cao hiệu suất tạo γ -CD việc sử dụng enzym γ -CGTase từ các chủng tái tổ hợp là hướng đi cần được quan tâm.



Hình 2. Bề mặt đáp ứng của hiệu suất tạo γ -CD (Y). Mối quan hệ giữa: a) pH và nồng độ enzym; b) pH và nhiệt độ; c) pH và thời gian, và d) nhiệt độ và nồng độ enzym.

IV. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm sử dụng bề mặt đáp ứng trong mô hình tối ưu bậc 2 chúng tôi đã tìm được điều kiện

tối ưu cho quá trình vòng hóa tạo γ -CD ở trạng thái tự do như sau: pH (7,5), nồng độ enzym (1%), nhiệt độ (65°C), và thời gian (40 giờ). Hiệu suất tạo γ -CD đạt cực đại là: 9,42%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Beesley Thomas E.*; Separation and purification of cyclodextrins; US-Patent N^o: 4,808,232 (1989).
2. *Horikoshi Koki et al.*; Process for recovering cyclodextrins; US-Patent N^o: 4,303,787 (1981).
3. *Okada Minoru et al.*; Process for producing cyclodextrins; US-Patent N^o: 4,384,898 (1983).
4. *Rahman Roshanida Abd et al.*; Optimisation of growth medium for the production of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* HR1 using response surface methodology; Process Biochemistry 39: 2053–2060, (2004).
5. *Seres Gabor et al.*; Process for the preparation of high-purity gamma- and alpha-cyclodextrins; US-Patent N^o: 4,835,105 (1989).
6. *Shieh Wen*; Process for producing gamma-cyclodextrin; US-Patent N^o: 5,550,222 (1996).
7. *Takasi Kato and Koki Horikoshi*; Clorimetric determination of γ -cyclodextrin; Anal. chem. 56, 1738-1740, (1984).

Địa chỉ liên hệ: Nguyễn Lan Hương – Tel: (04)3868.2453, Email: huongnl-ibft@mail.hut.edu.vn
Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm
Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội