

**VÒNG HÓA TẠO GAMMA CYCLODEXTRIN Ở TRẠNG THÁI PHỨC
VỚI METYLETYL XETON VÀ 1-NAPHTHOL**
GAMMA CYCLODEXTRIN PRODUCTION USING SOLVENT-COMPLEXING AGENTS
(METHYETHYL KETONE AND 1-NAPHTHOL)

Phạm Thu Thủy, Nguyễn Lan Hương, Đào Thị Thanh Thủy

Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

TÓM TẮT

Cyclodextrin (CDs) có cấu trúc vòng gồm 6, 7, hoặc 8 đơn vị glucoza trong phân tử, đó chính là α , β , và γ -CD. Do cấu trúc hình nón cụt nên các CDs có khả năng tạo phức với nhiều hợp chất hữu cơ, và làm thay đổi những đặc tính hóa lý của các khách thể. Vì vậy, CDs có nhiều ứng dụng quan trọng trong công nghiệp thực phẩm và mỹ phẩm. Gamma-cyclodextrin (γ -CD) là một trong những CDs được ứng dụng rộng rãi, do có kích thước vòng lớn, hòa tan tốt trong nước và linh hoạt sinh học hơn các CDs khác. γ -CD không những được tổng hợp từ dịch thủy phân tinh bột ở dạng tự do, mà còn được vòng hóa bằng các tác nhân tạo phức. Các tác giả đã nghiên cứu các điều kiện vòng hóa tạo γ -CD ở trạng thái phức với metyletyl xeton (MEX) và 1-naphthol. Phương pháp bề mặt đáp ứng với bố trí thí nghiệm kiểu tâm xoay đối xứng đã được sử dụng nhằm tối ưu điều kiện vòng hóa. Các biến được thay đổi đó là: nồng độ enzym, thời gian vòng hóa tự do, nhiệt độ và tỷ lệ phức sử dụng vòng hóa tạo phức. Phân tích thống kê cho thấy, tỷ lệ chất tạo phức có ảnh hưởng nhiều đến hiệu suất tạo γ -CD. Điều kiện tối ưu cho quá trình vòng hóa: nồng độ enzym (2%), thời gian (30 phút), nhiệt độ (55°C) và tỷ lệ chất tạo phức (30%). Hiệu suất tạo phức γ -CD đạt $66,4 \pm 1,57\%$ theo mô hình tối ưu, và 64,6% bằng thực nghiệm.

ABSTRACT

Cyclodextrins (CDs) are closed-ring structure containing six, seven or eight glucose units, and known as α , β , and γ -CD, respectively. Due to their caverned structure, CDs can easily form inclusion complexes with many organic substances which can change the physicochemical properties of the guest molecule. This property makes CDs become increasingly important in the food and pharmaceutical industries. Gamma-cyclodextrin (γ -CD) is the most widely used because of its larger cavity, higher water solubility, and more bioavailability than other cyclodextrins. A process for producing γ -CD from starch hydrolysate solution with cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) and presence of methylethylketone and 1-naphthol was studied. Response surface methodology and central composite rotary design was employed to optimize γ -CD production from liquefied starch using solvent-complexing agents. The four variables involved in this study were: amount of CGTase, reaction time, temperature and amount of solvent-complexing agents. The statistical analysis of the results showed that the amount of solvent-complexing agents had a significant effect on γ -CD productivity. The optimized conditions were found to be comprised of: amount of CGTase (2%), reaction time (30 min), temperature (55°C), and amount of solvent-complexing agents (30%). The yield of γ -CD complex was obtained $66.4 \pm 1.57\%$ by model, and 64.6% by experiment.

I. MỞ ĐẦU

Cyclodextrins (CDs) có thể tạo phức với nhiều hợp chất khác nhau bao gồm các hợp chất béo, các aldehyt, axit hữu cơ, các chất thơm, chất khí, các hợp chất phân cực như halogen, oxit axit và amin. Đây là hiện tượng một chất “khách thể” bị giữ, bị bao bọc trong lỗ hổng của phân tử chủ thể CDs. Phức bao CDs làm thay đổi đặc tính hóa lý của các chất khách thể, từ những thay đổi ấy ta có thể sử dụng những chất khách thể ở một vai trò mới hữu ích hơn. Chính

nhờ đặc tính quan trọng này, CDs có nhiều ứng dụng to lớn trong các ngành công nghiệp cơ bản. Đồng thời, cũng nhờ vào khả năng tạo phức mà quá trình tổng hợp và tách các CDs dễ dàng hơn nhờ kết hợp đặc hiệu với chất khác. Quá trình tổng hợp γ -CD thường sử dụng hai tác nhân tạo phức. Dịch tinh bột sau khi được xử lý bằng enzym vòng hóa sẽ bổ sung đồng thời hai tác nhân tạo phức. Tác nhân đầu tiên là một xeton béo (*aliphatic ketone*) hay là rượu béo (*aliphatic alcohol*) và tác nhân thứ hai là hợp

chất vòng chứa 12 nguyên tử cacbon [4]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, bổ sung chất tạo phức với γ -CD trong quá trình vòng hóa sẽ giảm nồng độ γ -CD tự do có trong dung dịch, khi đó phản ứng vòng hóa sẽ ưu tiên tạo γ -CD. Seres và cộng sự (1989) đã bổ sung chất tạo phức sau một thời gian vòng hóa 50 phút, kết hợp 2 tác nhân phức như MEX và 2,4-dimetyl phenol (2,4-DMP), MEX và 2,6-DMP, MEX và 1-naphtol, MEX và 2-naphtol với tỷ lệ giữa chúng là 1:1 về khối lượng, tổng khối lượng 2 phức chiếm 10% so với cơ chất tinh bột. Kết quả cho thấy cặp phức cho hiệu suất cao nhất là cặp phức MEX và 1-naphtol, hiệu suất thực tế là 35% phức γ -CD thô tính theo khối lượng nguyên liệu [3]. Trong nghiên cứu này chúng tôi tối ưu điều kiện vòng hóa tạo γ -CD ở trạng thái phức với mong muốn nâng cao hiệu suất tạo γ -CD.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên vật liệu

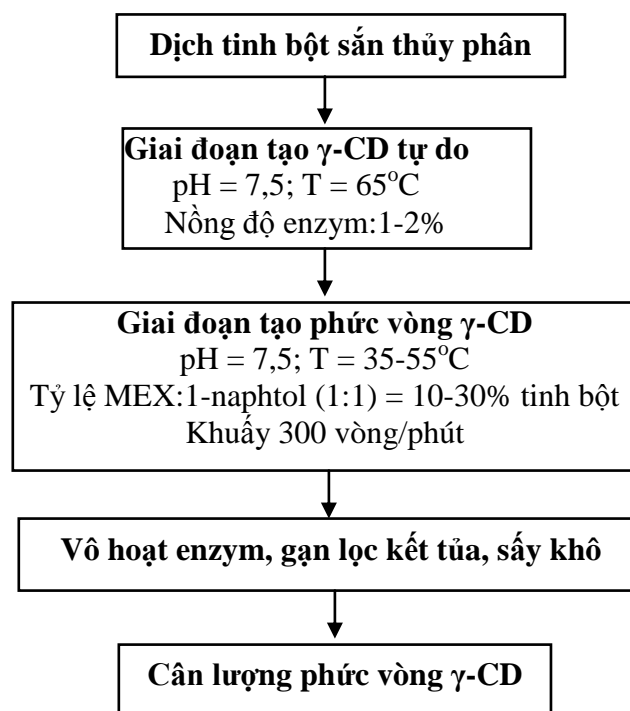
- Tinh bột sắn: sử dụng tinh bột sắn ở tỉnh Tây Ninh [1].
- Chế phẩm TORUZYM 3.0L (3KNU/g) dạng lỏng, hãng Novo (Đan Mạch) cung cấp.
- Các hóa chất phân tích: α -, β -, γ -cyclodextrin chuẩn (Sigma-Aldrich); thuốc thử Bromocresol Green (BCG, Trung quốc).
- Hóa chất: MEX, 1-naphtol (Trung quốc).

2.2 Phương pháp phân tích

Hiệu suất tạo phức γ -CD được tính bằng lượng phức γ -CD nhận được sau khi sấy khô trên khối lượng tinh bột sắn sử dụng.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

- 100 ml dịch tinh bột thủy phân nhận được trong các điều kiện như sau: nồng độ tinh bột: 10g; CaCl_2 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 [1].
- Quá trình tạo phức vòng γ -CD được thực hiện theo sơ đồ hình 1.



Hình 1. Sơ đồ quá trình vòng hóa tạo γ -CD ở trạng thái phức

- Phương pháp quy hoạch thực nghiệm: Bốn yếu tố lựa chọn để xây dựng mô hình tối ưu cho hiệu suất tạo phức giữa γ -CD và hỗn hợp chất tạo phức MEX và 1-naphtol cao là các yếu tố có ảnh hưởng mạnh đến khả năng vòng hóa tạo γ -CD: nồng độ enzym, thời gian vòng hóa tạo γ -CD tự do, nhiệt độ vòng hóa với hỗn hợp chất tạo phức, tỷ lệ hỗn hợp chất tạo phức so với khối lượng nguyên liệu. Thí nghiệm được bố trí theo ma trận trình bày ở bảng 1. Kết quả được xử lý bằng chương trình Design-Expert 7.1 (Stat-Ease, USA) [2].

Bảng 1. Thí nghiệm tiến hành và kết quả

TT	Nồng độ enzym (%)	Thời gian (phút)	Nhiệt độ (°C)	Tỷ lệ phức (%)	Hiệu suất (%)
1	2,0	30	55	10	30,0
2	1,0	30	35	30	59,6
3	2,0	30	35	10	33,8
4	2,0	80	55	10	32,0
5	1,5	55	25	20	47,0
6	1,5	5	45	20	54,2
7	1,5	55	45	0	0,0
8	1,5	55	65	20	41,0
9	0,5	55	45	20	55,8
10	1,0	30	55	10	31,8

TT	Nồng độ enzym (%)	Thời gian (phút)	Nhiệt độ (°C)	Tỷ lệ phức (%)	Hiệu suất (%)
11	1,0	80	55	10	33,0
12	2,0	30	55	30	64,6
13	1,5	55	45	20	56,8
14	1,5	55	45	20	56,8
15	1,5	105	45	20	55,0
16	1,5	55	45	20	56,8
17	1,0	80	35	10	43,6
18	1,0	30	35	10	31,0
19	2,0	80	35	30	42,6
20	2,0	80	55	30	64,8
21	2,5	55	45	20	62,3
22	1,0	80	55	30	64,0
23	1,5	55	45	40	53,4
24	2,0	80	35	10	30,4
25	1,0	30	55	30	62,6
26	1,5	55	45	20	56,8
27	2,0	30	35	30	64,4
28	1,0	80	35	30	53,0
29	1,5	55	45	20	56,8
30	1,5	55	45	20	56,8

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khả năng tạo phức của MEX + 1-naphtol với CDs và glucoza

Để nghiên cứu khả năng tạo phức của hỗn hợp MEX và 1-naphtol với các thành phần trong dịch tinh bột thủy phân đưa vào quá trình vòng hóa, chúng tôi tiến hành cho lần lượt α -, β -, γ -CD chuẩn và glucoza tinh khiết (0,05g) vào 50 ml nước cất, nâng nhiệt độ của dịch lên 40°C và bổ sung 4% chất tạo phức. Lắc đều trong 24 giờ. Quan sát kết quả thu được (bảng 2).

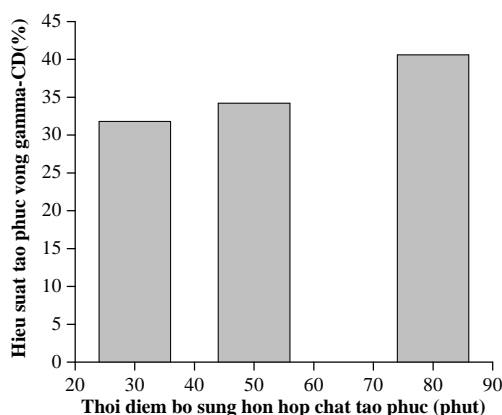
Bảng 2. Khả năng tạo phức của MEX + 1-naphtol với CDs và glucoza

Mẫu	Khả năng tạo phức với MEX + 1-naphtol
α -CD	Không tạo phức
β -CD	Không tạo phức
γ -CD	Tạo phức màu trắng đục, kết tủa lắng từ từ xuống đáy
Glucoza	Không tạo phức

Kết quả quan sát cho thấy chỉ có γ -CD tạo phức với MEX+1-naphtol, còn α -, β -CD và glucoza không có hiện tượng tạo phức trong điều kiện vòng hóa. Như vậy lượng phức nhận được trong thực nghiệm là phức vòng γ -CD, kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Seres và cộng sự [3].

3.2 Thời điểm bổ sung hỗn hợp chất tạo phức

Nghiên cứu lựa chọn thời điểm bổ sung hỗn hợp chất tạo phức cho hiệu suất tạo phức vòng γ -CD cao chúng tôi bổ sung hỗn hợp chất tạo phức (10% so với tinh bột) sau khi tiến hành vòng hóa tạo γ -CD tự do được 30, 50, và 80 phút [3], quá trình tạo phức vòng γ -CD được tiến hành trong 36 giờ tiếp theo.

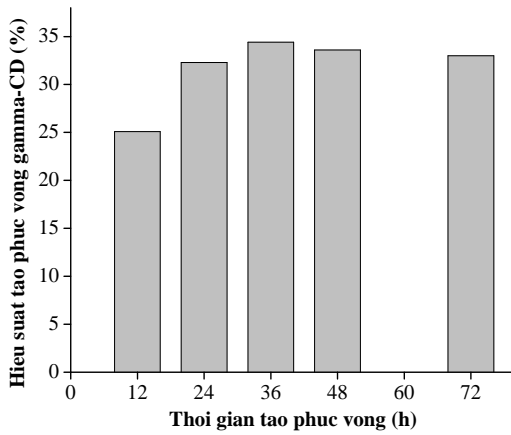


Hình 2. Ảnh hưởng của thời điểm bổ sung hỗn hợp chất tạo phức đến hiệu suất tạo phức vòng γ -CD

Hình 2 cho thấy khi bổ sung hỗn hợp chất tạo phức sau 50 phút thì hiệu suất tăng lên 1,08 lần so với bổ sung phức sau 30 phút, sau 80 phút thì hiệu suất tăng 1,19 lần so với 50 phút. Như vậy thời điểm bổ sung hỗn hợp chất tạo phức có ảnh hưởng đến hiệu suất tạo phức vòng γ -CD.

3.3 Thời gian tạo phức vòng

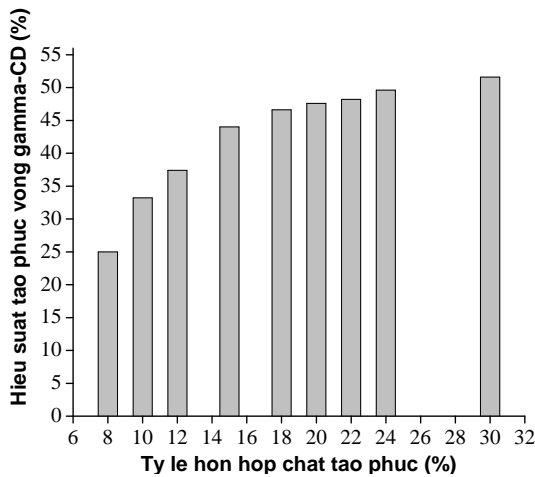
Để xác định thời gian tạo phức vòng γ -CD triệt để chúng tôi đã tiến hành bổ sung hỗn hợp chất tạo phức (10%) sau 50 phút vòng hóa tự do, và thay đổi thời gian tạo phức vòng từ 12 đến 72 giờ (hình 3). Kết quả cho thấy hiệu suất tạo phức vòng tối đa ở 36 giờ.



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian tạo phức vòng đến hiệu suất tạo phức vòng γ -CD

3.4 Tỷ lệ hỗn hợp chất tạo phức

Tiến hành bổ sung hỗn hợp chất tạo phức (MEX+1-naphtol) sau 50 phút vòng hóa tự do, tỷ lệ hỗn hợp chất tạo phức tăng từ 8% đến 30% so với tinh bột, và giữ thời gian tạo phức vòng 36h. Kết quả hình 4 cho thấy, tỷ lệ hỗn hợp chất tạo phức càng tăng thì hiệu suất tạo phức vòng càng tăng.



Hình 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ hỗn hợp chất tạo phức đến hiệu suất tạo phức vòng γ -CD

Để nghiên cứu điều kiện tối ưu cho quá trình tạo phức vòng γ -CD chúng tôi chọn thời gian tạo phức vòng γ -CD (36h), đồng thời xét đến ảnh hưởng của thời gian vòng hóa tạo γ -CD tự do (30-80 phút), tỷ lệ hỗn hợp chất tạo phức (10-30%). Ngoài ra lượng phức vòng γ -CD nhận được còn phụ thuộc vào nồng độ enzym CGTase đưa vào và nhiệt độ giai đoạn tạo phức vòng γ -CD [3], do đó chúng tôi thay đổi nồng

độ enzym (1-2%) và nhiệt độ tạo phức vòng (35-55°C).

3.5 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 1 cho thấy hiệu suất đạt được từ 0% đến 64,8%. Phức vòng γ -CD không tạo thành khi ta không sử dụng hỗn hợp chất tạo phức trong quá trình vòng hóa, như vậy hỗn hợp chất tạo phức có 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.

Bảng 3. Kết quả phân tích hồi quy

Thông số	Phương sai	Chuẩn F	Mức có nghĩa ($p>F$)
Mô hình	452,51	29,07	< 0,0001
A-Nồng độ E	0,38	0,024	0,8787
B-Thời gian	6,83	0,44	0,5179
C-Nhiệt độ	6,41	0,41	0,5308
D-Tỷ lệ phức	4181,76	268,65	< 0,0001
AB	62,41	4,01	0,0637
AC	16,00	1,03	0,3267
AD	6,76	0,43	0,5199
BC	36,00	2,31	0,1491
BD	96,04	6,17	0,0253
CD	146,41	9,41	0,0078
A ²	9,94	0,64	0,4366
B ²	7,15	0,46	0,5084
C ²	273,96	17,60	0,0008
D ²	1536,86	98,73	< 0,0001

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 29,07 cũng khẳng định mô hình là có nghĩa. Hệ số hồi quy bội (R^2) của phương trình là 0,9645. Các phân tích thống kê cho thấy, khi các biến thay đổi trong khoảng biến thiên thì tỷ lệ hỗn hợp chất tạo phức có ảnh hưởng nhất đến hiệu suất tạo phức vòng γ -CD, điều đó thể hiện ở mức có nghĩa $p<0,0001$. Bề mặt đáp ứng của thí nghiệm tâm xoay đối xứng được biểu diễn theo mô hình bậc 2.

Hiệu suất tạo phức vòng γ -CD (Y) = 56,80-0,13A-0,53B+0,52C+13,2D-1,97AB+

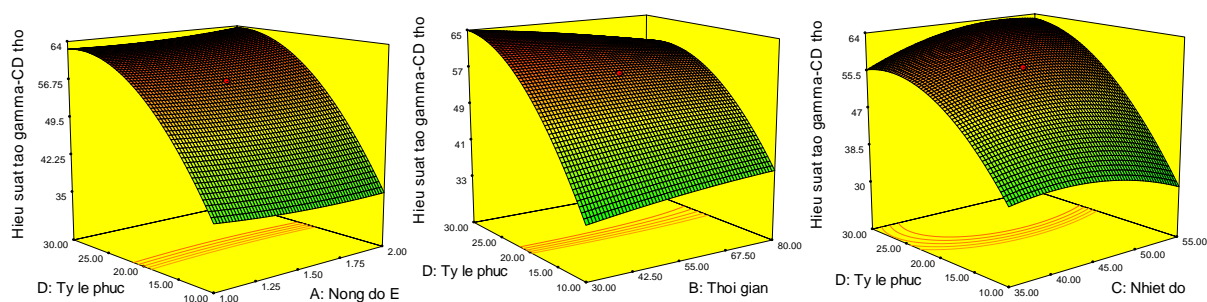
$$1,0AC+0,65AD+1,5BC-2,45BD+3,03CD \\ +0,6A^2-0,51B^2-3,16C^2-7,49D^2$$

Hình ảnh không gian 3 chiều bề mặt đáp ứng của hiệu suất tạo phức vòng γ -CD đã được biểu diễn ở hình 5. Phân tích bề mặt đáp ứng của Y cho thấy điểm cho hiệu suất tạo phức vòng γ -CD cao nhất ($66,4 \pm 1,57\%$) là điểm có: nồng độ enzym (2%), thời gian vòng hóa (30 phút), nhiệt độ (55°C), và tỷ lệ hỗn hợp chất tạo phức (30%). Kết quả kiểm tra lại bằng thực nghiệm tại điểm tối ưu cho hiệu suất tạo phức vòng γ -CD đạt 64,6%, cao hơn so với kết quả của một số tác giả trước. Theo nghiên cứu của Seres và các cộng sự (1989), hiệu suất phức vòng γ -CD chỉ đạt được 35% [3], hay 43,5% [4] trong thí nghiệm của Shieh (1996). Sự khác biệt được giải thích có thể do tỷ lệ hỗn hợp chất tạo phức sử dụng trong các nghiên cứu này chỉ

dùng 10%. Tuy nhiên đây mới chỉ đề cập đến phức vòng γ -CD thô, việc tách và tinh chế γ -CD từ phức cần được nghiên cứu để hoàn chỉnh công nghệ tổng hợp và tinh chế γ -CD.

IV. KẾT LUẬN

Vòng hóa γ -CD bằng phương pháp tạo phức đã cho kết quả khả quan. Sử dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm với phương pháp bề mặt đáp ứng của 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 phức: nồng độ enzym (2%), thời gian vòng hóa bằng enzym (30 phút), nhiệt độ vòng hóa (55°C), và tỷ lệ hỗn hợp chất tạo phức (30%). Hiệu suất tạo phức γ -CD đạt $66,4 \pm 1,57\%$ theo mô hình tối ưu và 64,6% theo thực nghiệm.



Hình 5. Bề mặt đáp ứng của hiệu suất tạo phức vòng γ -CD (Y).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lan Hương, Phạm Thu Thủy, Vương Nguyệt Minh, Lê Phương Thanh; Tối ưu điều kiện vòng hóa tạo gamma cyclodextrin ở trạng thái tự do bằng phương pháp bề mặt đáp ứng; Tạp chí khoa học và công nghệ các trường đại học kỹ thuật, 70, 101-105, (2009).
2. 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).
3. Seres Gabor et al.; Process for the preparation of high-purity gamma- and alpha-cyclodextrins; US-Patent No: 4,835,105 (1989).
4. Shieh Wen; Process for producing gamma-cyclodextrin; US-Patent No: 5,550,222 (1996)

Địa chỉ liên hệ: Phạm Thu Thủy - Tel: (04) 3868.2453, Email: pttthuy@mail.hut.edu.vn
Viện CNSH-CNTP, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội
Số 1, Đại Cồ Việt, Hà Nội