

PHƯƠNG PHÁP MỚI TÁCH CHIẾT BETA GLUCAN TỪ MEN BÁNH MÌ (*SACCCHAROMYCES CEREVISIAE*)

Nguyễn Duy Nhứt^{1,*}

Đỗ Thị Ánh Hòa²

¹Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang – VAST

²Trường Đại học Nha Trang

Tóm tắt

Thành phần chính của nấm men bánh mì bao gồm mannoprotein, protein, khoáng, beta-glucan và một lượng rất nhỏ chitin. Nhiều kỹ thuật tách chiết beta-glucan từ nấm men bánh mì, đã được công bố, tuy nhiên, tất cả đều tiến hành tách các chất khác ra khỏi thành tế bào bằng nhiều bước khác nhau, beta-glucan còn lại ở dạng không tan, độ tinh khiết không cao. Sử dụng chất lỏng ion, toàn bộ các chất đều tách rời nhau, kể cả beta-glucan, nấm men tan hoàn toàn trong [bmim]Cl thành dung dịch trong suốt. Sau khi thêm nước vào dịch chiết, chỉ có beta-glucan được tách ra ở dạng kết tủa. Phổ NMR của beta-glucan được xác định. Đây là phương pháp mới, sử dụng để điều chế beta-glucan tinh sạch từ nấm men bánh mì.

Từ khóa: chất lỏng ion, beta glucan

Abstract

New method of preparing for beta glucan from bread-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

The main components of bread-yeast include mannoproteins, proteins, minerals, beta-glucan and a very small amount of chitin. Various techniques for extracting beta-glucan from bread-yeast have been applied. However, all of which removed the other compounds from the cell walls with different steps, the remaining beta-glucan is insoluble, and its purity is not high. By using the ionic liquid, all the substances are separated, including beta-glucan, completely dissolved in [bmim] Cl into a clear solution. After adding some water to the extract, only beta glucan was separated in form of a precipitate. The NMR spectrum of beta-glucan was determined. This is a new method used to prepare for purified beta-glucan from bread-yeast.

Keywords: ionic liquid, beta glucan

1. Đặt vấn đề

β -glucans là một polysaccharide được tìm thấy trong các thành tế bào của vi khuẩn, nấm, nấm men, tảo, địa y và thực vật, chẳng hạn như yến mạch, lúa mạch. Glucan là polymer của các phân tử glucose, liên kết với nhau bằng liên kết đường (IUPAC Recommendations 1995). Trong thành tế bào nấm men bánh mì, các gốc đường glucose liên kết với nhau bằng liên kết $\beta(1-3)$ hoặc $\beta(1-6)$.

Trong cuốn sách “What is beta-glucan” của Roger Mason, in tại U.S.A năm 2001, ISBN: 1-884820-66-2, tác giả đã khẳng định, beta-glucan là hợp chất tự nhiên tăng cường miễn dịch mạnh nhất mà khoa học đã từng biết đến.

* Email: ndnhut@yahoo.com

Trong công bố trên tạp chí “Carbohydrate Polymers v. 28, pp. 3-14”, nhóm tác giả đã chứng minh được, beta-glucan hoạt động bằng cách hỗ trợ đại thực bào, tế bào T và các tế bào NK làm việc hiệu quả hơn. Đó cũng là kết quả của nghiên cứu khác như “Advances in Experimental and Medical Biology v. 383, 1995, pp. 13-22”

Trên tạp chí “Journal of Nutrition v. 133, 2003, pp. 808-13” tại trung tâm nghiên cứu lâm sàng Chicago, 268 người bao gồm cả nam lẫn nữ, có hàm lượng cholesterol cao đã được cho sử dụng beta glucan, “Kết quả của thử nghiệm ngẫu nhiên, mù đôi, chứng minh rằng các đối tượng mắc phải hiện tượng tăng cholesterol huyết (hypercholesteremia) ở mức độ nhẹ đến vừa phải, có thể làm giảm lượng LDL và cholesterol bằng cách hấp thụ một nhóm các sterol thực vật và beta glucan chứa trong thực phẩm, như là một phần của một chế độ ăn ít chất béo bão hòa và cholesterol.” Đây là bằng chứng thực tế rằng chúng ta không cần, loại thuốc statin rất đắt, độc hại và nguy hiểm nhằm làm giảm mỡ máu.

Cho đến nay, đã có quá nhiều qui trình công nghệ sản xuất beta-glucan từ nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, hầu hết các qui trình bao gồm 2 bước:

Bước 1: cho nấm men tự phân bằng các enzyme có sẵn trong tế bào, thành tế bào sau khi tự phân sẽ tách rời ra dưới dạng không tan, chứa beta-glucan, mannoprotein và một ít chitosan.

Bước 2: tách beta-glucan ra khỏi thành tế bào bằng hóa chất, enzyme hoặc các phương pháp vật lý như siêu âm, áp suất cao...

Ví dụ như United States Patent Application 20100190872 A1: “PRODUCTION OF BETA-GLUCANS AND MANNANS”, nấm men được tự phân ở 55⁰C, phá hủy tế bào, sau đó thu màng tế bào, chỉnh pH kiềm, cho tác dụng với enzyme protease, tách rời chất không tan, trung hòa với HCl và rửa sạch bằng nước nhiều lần thu được beta-glucan.

Tự phân thu màng tế bào sau đó xử lý lipid bằng acetone, siêu âm, tách protein bằng enzyme là phương pháp được sử dụng trong công bố “International Food Research Journal 20(4): 1953-1959 (2013)”.

Công bố trên tạp chí Food Sci. Technol, Campinas, 37(1): 124-130, năm 2017 đưa ra 4 phương pháp tách chiết beta-glucan cũng tuân theo hai bước đã nêu, trong đó bước thứ hai sử dụng NaOH/ HCl, NaOH/ CH₃COOH, NaOH/ NaClO và NaOH/ NaClO/ DMSO.

Cũng trong năm 2017, quy trình tách chiết beta-glucan công bố trên “EXCLI J. 2017; 16: 210–228” vẫn sử dụng bước tự phân sau đó xử lý NaOH/HCl.

Toàn bộ các qui trình tách chiết beta glucan đã công bố đều tách lấy phần “tạp chất” ra khỏi màng tế bào nấm men, phần rắn không tan sau cùng là beta-glucan, phương pháp này không thể làm sạch triệt để các thành phần khác beta-glucan trong nấm men, đồng thời tốn thời gian rất dài cho nhiều phản ứng liên tiếp.

Trong nghiên cứu này, nấm men được hòa tan hoàn toàn trong chất lỏng ion, mọi thành phần đều được tách ra khỏi nhau đi vào dung dịch, chỉ cần một lần chiết, sau đó pha loãng chất lỏng ion, chỉ có beta-glucan, không tan được trong dung dịch chất lỏng ion/nước, tách ra dạng kết tủa, được thu nhận bằng cách li tâm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Men bánh mì được sử dụng cho nghiên cứu là Saf-Instant® đỏ/ Đầu bếp lát: dành cho các loại bột bánh mì lát (từ 0 – 10% đường tùy theo tỷ lệ trọng lượng bột), sản phẩm của

Công ty TNHH AB Mauri Việt Nam hoặc Công ty TNHH liên doanh SAF-VIỆT.

2.2. Hóa chất và phương pháp phân tích

2.2.1. Hóa chất phân tích

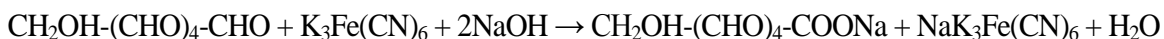
Beta-glucan 98%, Butylimidazolium chloride ([BMIM]Cl), $K_3Fe(CN)_6$, NaOH tinh thể, H_2SO_4 đặc của hãng Sigma.

2.2.2. Phương pháp phân tích

- Xác định cấu trúc β -glucan bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1H – NMR và ^{13}C – NMR được ghi trên máy Burcker Advance DPX – 500 NMR spectrometer (Đức) (đo tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam)

- Xác định hàm lượng glucose trong sản phẩm: Cân chính xác 0.5g mẫu β -glucan vào ống nghiệm có nút vặn chặt. Sau đó cho thủy phân trong dung dịch H_2SO_4 15%, trong 24 giờ. Sau 24 giờ lọc thu dịch bỏ bã, tiếp đó thêm 3 giọt methyl đỏ và trung hòa từ từ bằng NaOH 5% cho đến khi xuất hiện màu vàng nhạt. Sau đó cho hỗn hợp vào bình định mức 100ml định mức tới vạch và lắc đều. Lấy dung dịch mẫu chứa đường khử cho vào burette. Cho vào bình tam giác 10ml dung dịch $K_3Fe(CN)_6$ 1% và 2,5ml dung dịch NaOH 2,5N. Đun sôi và chuẩn độ ngay trên bếp bằng dung dịch mẫu đã xử lý từ burette, cho từng giọt một lắc mạnh. Dung dịch ban đầu có màu vàng chanh của kali ferricyanure. Điểm dừng chuẩn độ xác định khi màu vàng chanh biến mất, dung dịch trong suốt không màu khoảng 30 giây rồi chuyển sang màu vàng rom rất nhạt của ferrocyanure, tiêu tốn hết V_1 ml dung dịch mẫu. Thực hiện tương tự và đồng thời với chất chuẩn là beta-glucan 98% của Sigma, tiêu tốn hết V_2 ml dung dịch chuẩn. Tiến hành chuẩn độ 3 lần. Phản ứng xảy ra

Hàm lượng beta-glucan có trong sản phẩm = $98.V_2/V_1$.



2.3. Bố trí thí nghiệm

Tách chiết beta-glucan từ men bánh mì (Saccharomyces cerevisiae):

- Lấy 5g men bánh mì khô Saf-Viet®, trộn với 100g [BMIM]Cl trong cốc thủy tinh 500 ml. Vừa đun nóng khoảng $80^{\circ}C$ vừa khuấy liên tục, sau khoảng 30 phút, men bánh mì tan hoàn toàn trong chất lỏng ion [BMIM]Cl.

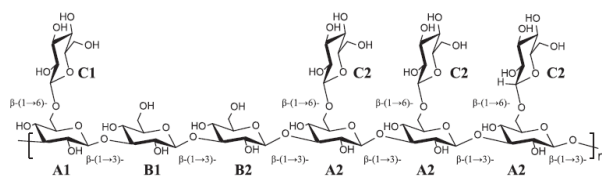
- Dừng đun nóng, thêm 200 ml nước vào dung dịch, tiếp tục khuấy trong 15 phút nữa, toàn bộ các chất khác beta-glucan trong men bánh mì đều tan trong dung dịch nước của [BMIM]Cl, riêng beta-glucan tách ra dưới dạng kết tủa bông xốp.

- Gạn rửa kết tủa bằng nước, lọc, kết tủa bằng nước nóng nhiều lần, sấy khô, thu được beta-glucan.

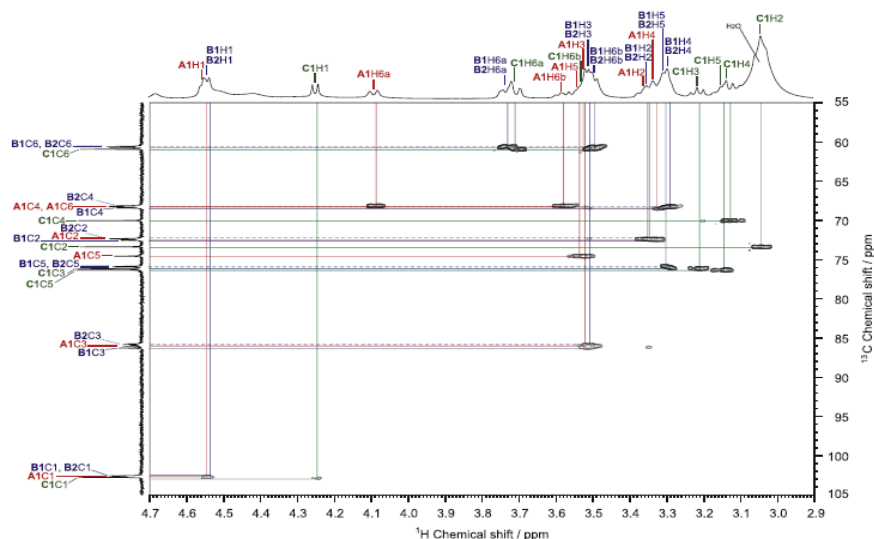
3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Phổ NMR:

Theo kết quả công bố trên tạp chí DatinBrief 15(2017)382–388: “Two-dimensional NMR data of a water-soluble β -(1→3,1→6)-glucan from *Aureobasidium pullulans* and *schizophyllan* from *Schizophyllum commune*”, sản phẩm β -(1→3,1→6)-glucan, có cấu trúc thể hiện trên hình 1, có phổ HSQC như hình 2:

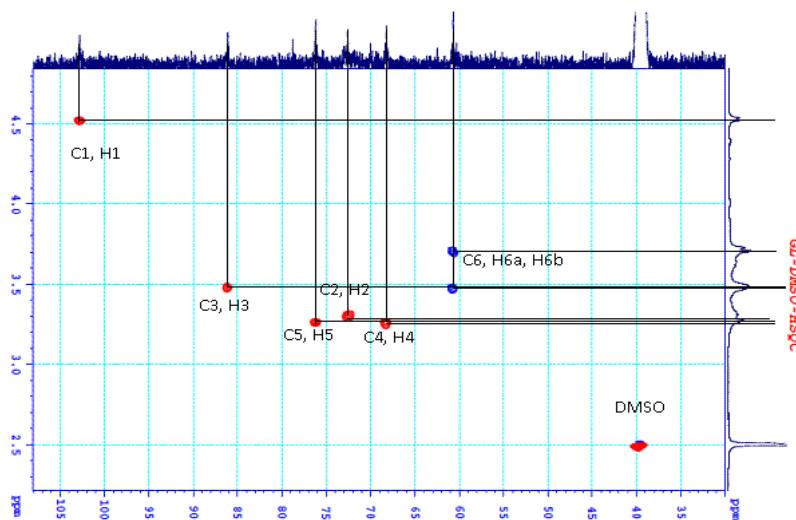


Hình 1. Cấu trúc của β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-glucan theo DatainBrief 15(2017)382–388



Hình 2. Phổ HSQC của β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-glucan theo DatainBrief 15(2017)382–388

So sánh với các tín hiệu cộng hưởng của phổ HSQC của sản phẩm β -glucan tách chiết bằng [BMIM]Cl của nghiên cứu này trên hình 3, cho thấy các tín hiệu tương tác C-H của sản phẩm trùng khớp tương ứng với cấu trúc của B1, chính là tín hiệu của (1 \rightarrow 3)- β -glucan, với các độ dịch chuyển hóa học của C1, C3, C5, C2, C4, C6 tương ứng với 102.79ppm, 86.09ppm, 76.19ppm, 72.59ppm, 68.22ppm, 60.70ppm và H1, H6a, H3, H6b, H2, H5, H4 là 4.537ppm, 3.729ppm, 3.487ppm, 3.473ppm, 3.326ppm, 3.311ppm, 3.273ppm.



Hình 3. Phổ HSQC của sản phẩm β -glucan

Đồng thời phổ HSQC của sản phẩm ngoài tín hiệu của dung môi đo DMSO, còn lại toàn bộ đều được gán hết lên cấu trúc, chứng tỏ đây là một sản phẩm tinh sạch.

Hàm lượng β -glucan :

Bảng 1. Hàm lượng beta-glucan trong sản phẩm của mẫu V1 và V2

Thế tích chuẩn độ	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
V1	10.03	10.02	10.02	10.43 \pm 0.057
V2	10.1	10.1	10.1	10.1

Hàm lượng glucan trong sản phẩm là 94.8%.

Từ các phân tích dữ liệu nêu trên, cho thấy tách chiết từ men bánh mì bằng [BMIM]Cl cho ra sản phẩm beta-glucan có độ tinh sạch cao, dẫn đến phổ NMR có thể gán được một cách tương đối đơn giản.

Theo công bố của Gonzalez García E trong “Anal Bioanal Chem, (2014):73-84”, protein tan được trong dung dịch [BMIM]/nước và có thể dùng dung môi này để tách DNA. Đồng thời khi bị tách ra khỏi mannoprotein, mannan nằm ở dạng oligo [Z. Naturforsch. 63c, 919D921 (2008)]. Công bố này phù hợp và giải thích được kết quả nghiên cứu, khi thêm nước vào [BMIM]Cl, protein, mannan, mannoprotein đều tan trong dung dịch [BMIM]/nước, chỉ có β -glucan vẫn tách ra dưới dạng kết tủa.

4. Kết luận

Tách chiết beta-glucan từ men bánh mì Saf-Viet®, bằng [BMIM]Cl là một phương pháp đơn giản, cho ra sản phẩm tinh sạch, khả năng ứng dụng cho sản xuất beta-gucan có yêu cầu độ tinh sạch cao.

Lời cảm ơn: Công trình này được tài trợ kinh phí từ đề tài của Viện Hàn Lâm KHCNVN mã số: VAST04.04/17-18□

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Gonzalez García E1, Ressmann AK, Gaertner P, Zirbs R, Mach RL, Krska R, Bica K, Brunner K, 2014. Direct extraction of genomic DNA from maize with aqueous ionic liquid buffer systems for applications in genetically modified organisms analysis, Anal Bioanal Chem, 73-84.
- [2] Hiroyuki Kono, Nobuhiro Kondo, Katsuki Hirabayashi, Makoto Ogata, Kazuhide Totani, Shinya Ikematsu, and Mitsumasa Osada, 2017. Two-dimensional NMR data of a water-soluble β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan from Aureobasidium pullulans and schizophyllan from Schizophyllum commune, Data Brief, 382–388.
- [3] J. A. Bohn and J. N. BeMiller, “(1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans as Biological Response Modifiers: A Review of Structure-Functional Activity Relationships,” Carbohydrate Polymers, Vol. 28, 1995, pp. 3-14. doi:10.1016/0144-8617(95)00076-3
- [4] M. Naruemon; S. Romanee; P. Cheunjit; H. Xiao; McLandsborough, L. A.; M. Pawadee, Influence of additives on Saccharomyces cerevisiae β -glucan production. International Food Research Journal . 2013, Vol. 20 Issue 4, p1953-1959.
- [5] Maki KC, Shinnick F, Seeley MA, et al. Food products containing free tall oil-based phytosterols and oat beta-glucan lower serum total and LDL cholesterol in

- hypercholesterolemic adults. *J Nutr.* 2003;133(3):808-813.
- [6] Mason, R., (2001), *What is Beta-glucan?*, ISBN#: 1-884820-66-2, USA.
- [7] Mohaghehpour, N., M. Dawson, et al.(1995). Glucans as immunological adjuvants. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 383(13-22), ISSN:0065-2598.
- [8] Naohito Ohno, Michiharu Uchiyama, AikoTsuzuki, 1999. Solubilization of yeast cell-wall β -(1 \rightarrow 3)-d-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction, *Carbohydrate Research*, Volume 316, Issues 1–4, 161-172.
- [9] Naohito OHNO, Kazuo SAITO, Jiro NEMOTO, Shinya KANEKO, Yoshiyuki ADACH, 1993. Immunopharmacological Characterization of a Highly Branched Fungal (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucan, OL-2, Isolated from *Omphalia lapidescens*, *Biology Pharmacy Bulletin* v., 414-9.
- [10] PENGKUMSRI, Noppawat et al. Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. *Food Sci. Technol (Campinas)* [online]. 2017, vol.37, n.1, pp.124-130.
- [11] Tomoko Sugawara, SeizoTakahashi, Masako Osumi, Naohito Ohno, 2004. Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy, *Carbohydrate Research*, Volume 339, Issue 13, 2255-2265.
- [12] Upadhyay TK, Fatima N, Sharma D, Saravanakumar V, Sharma R, Preparation and characterization of beta-glucan particles containing a payload of nanoembedded rifabutin for enhanced targeted delivery to macrophages, *EXCLI Journal* 2017;16:210-228

(Ngày nhận bài: 28/12/2018; ngày phản biện: 03/01/2018; ngày nhận đăng: 04/01/2019)