

PHÂN TÍCH DẠNG TỒN TẠI CỦA KẼM TRONG MẪU NẤM MEN

Nguyễn Thị Trang^{1,✉}, Nguyễn Thị Minh Khanh¹, Lê Đức Mạnh¹, Vũ Kim Thoa², Chu Đình Bính³, Phạm Thị Lan Anh⁴

¹Viện Công nghiệp Thực phẩm

²Trường Đại học Mở Hà Nội

³Viện Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

⁴Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: vantrangibt@gmail.com

Ngày nhận bài: 01.4.2019

Ngày nhận đăng: 10.9.2019

TÓM TẮT

Kẽm là nguyên tố vi lượng cần thiết để duy trì chức năng sinh lý ở người và động vật. Kẽm hữu cơ được hấp thu tốt hơn, có hoạt tính sinh học cao và độc tính thấp hơn dạng vô cơ. *S. cerevisiae* có khả năng tích lũy kẽm hữu cơ và đã được ứng dụng nhiều trong sản xuất. Tuy nhiên, hiện chưa có nghiên cứu nào tiến hành phân tích các dạng liên kết của kẽm trong nấm men. Trong nghiên cứu này, hợp chất kẽm hữu cơ, vô cơ trong nấm men được tách pha trên nhựa D101 và định lượng bằng phổ khối phổ plasma cảm ứng (ICP-MS). Các hợp chất kẽm được chiết bằng phương pháp nghiền bi và tách phân đoạn trên nhựa D101. Các thông số của quá trình chiết và điều kiện tách của hợp chất kẽm trên nhựa D101 đã được nghiên cứu tối ưu hóa. Ngoài ra, việc phân tích các dạng hợp chất kẽm cũng được thực hiện với sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối phổ khối phổ cảm ứng cao tần plasma (HPLC-ICP-MS). Kết quả cho thấy, kẽm tồn tại trong sinh khối nấm men chủ yếu ở dạng hữu cơ, dao động trong khoảng 51,56 - 88,17%. Kẽm hữu cơ tích lũy cao nhất trong sinh khối chủng *S. cerevisiae* A112 đạt giá trị 88,17%. Ở tất cả các chủng, dạng kẽm liên kết với polysaccharit lớn hơn dạng kẽm liên kết với protein. Nghiên cứu này của chúng tôi có ý nghĩa trong y học, việc phân tích các dạng tồn tại của kẽm trong nấm men sẽ làm sáng tỏ cơ chế tác dụng của dịch chiết nấm men giàu kẽm.

Từ khóa: hợp chất kẽm, HPLC-ICP-MS, kẽm hữu cơ, nấm men kẽm, nhựa D101

MỞ ĐẦU

Nguyên tố vi lượng kẽm từ lâu đã được biết đến là một trong những yếu tố quan trọng đối với cơ thể con người. Kẽm tham gia vào thành phần cấu trúc tế bào, hệ thống các enzyme và đặc biệt là tác động đến hầu hết các quá trình sinh học trong cơ thể (Bao *et al.*, 2007). Vì vậy, các cơ quan và hệ cơ quan như hệ thần kinh trung ương, da và niêm mạc, hệ tiêu hóa, tuần hoàn rất nhạy cảm với sự thiếu hụt kẽm. Hiện nay tình trạng thiếu kẽm ở trẻ em là vấn đề sức khỏe cộng đồng đang được quan tâm ở nhiều nước, đặc biệt là các nước đang phát triển với khoảng 2 tỉ người bị thiếu kẽm (Sandstead, 2015). Chính vì vậy, việc tìm ra các nguồn thực phẩm chức năng giàu kẽm bổ sung vào chế độ dinh dưỡng hàng ngày là hết sức cần thiết.

Kẽm thường được bổ sung vào cơ thể dưới 2 dạng hữu cơ và vô cơ. Ở dạng hữu cơ, kẽm được gắn kết

với các phân tử hữu cơ như protein, vitamin, axit amin, polisaccharit hay các hợp chất hữu cơ khác... Ở dạng vô cơ, kẽm được gắn kết với các thành phần vô cơ, phổ biến nhất là muối kẽm sulphat, kẽm nitorat, kẽm oxit... Đã có rất nhiều nghiên cứu đánh giá, so sánh khả năng hấp thu và chuyển hóa giữa 2 dạng kẽm vô cơ và kẽm hữu cơ trên động vật (Lu *et al.*, 2012; Sandstead, 2015; Bao *et al.*, 2007). Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng động vật được bổ sung kẽm ở dạng hữu cơ có nồng độ kẽm huyết thanh và hàm lượng kẽm dự trữ trong xương, thịt, các cơ quan nội tạng cao hơn khi được bổ sung kẽm ở dạng vô cơ. Hơn nữa, hợp chất kẽm hữu cơ được đánh giá là có hoạt tính sinh học cao hơn kẽm vô cơ (Brooks *et al.*, 2018; Hill *et al.*, 2014; Stehlik-tomas *et al.*, 2004).

Có rất nhiều phương pháp để tạo ra các hợp chất của kẽm như: tổng hợp hóa học, chiết xuất từ tự nhiên, hoặc bằng con đường sinh hóa... Tuy nhiên, phương pháp tổng hợp hóa học có hạn chế là dễ sinh ra các

sản phẩm phụ, khó kiểm soát ảnh hưởng tới sức khỏe con người. Phương pháp chiết xuất hợp chất kẽm từ tự nhiên an toàn hơn nhưng chi phí sản xuất cao. Vì vậy, hiện nay thế giới đang tập trung nghiên cứu sử dụng nấm men là đối tượng chuyển hóa ion kim loại (Zn, Cr, Se...) từ môi trường thành dạng hợp chất kim loại hữu cơ và tích lũy trong nấm men.

Ở Việt Nam, hướng nghiên cứu tạo nấm men giàu kẽm khá mới mẻ. Đồng thời, hiện chưa có nghiên cứu khoa học nào phân tích dạng tồn tại của kẽm trong tế bào nấm men. Chính vì vậy, việc thiết lập xây dựng quy trình phân tích dạng kẽm tồn tại trong tế bào nấm men là hết sức cần thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào phát triển phương pháp phân tích các dạng tồn tại của các hợp chất chứa Zn trong tế bào nấm men. Các dạng Zn vô cơ, hữu cơ được tách phân đoạn trên cột sắc ký chứa chất nhồi D101 macro và rửa giải bằng dung môi thích hợp. Hàm lượng Zn trong các phân đoạn này được xác định bằng phương pháp phân tích ICP-MS ở điều kiện tối ưu sử dụng dung dịch ngoại chuẩn. Bên cạnh đó, các dạng vô cơ và hữu cơ của Zn còn được xác định trực tiếp bằng sắc ký trao đổi cation sử dụng detector khối phổ kế nguyên tử nguồn ion hóa bằng plasma cao tần cảm ứng (HPLC-ICP-MS).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hóa chất và chủng vi sinh vật

Cao nấm men, pepton được cung cấp bởi hãng Himedia, Ấn Độ. $ZnSO_4$ và các hóa chất khác phân tích khác được cung cấp bởi Meck, Đức. Các chủng nấm men *S. cerevisiae* mã số CNTP 4007, CNTP 4017, CNTP 4059, CNTP 4080, CNTP 4087, CNTP 4130, CNTP 4131, CNTP 4157, CNTP 4158 được cung cấp bởi Sru tập giống VSVCN-Viện Công nghiệp Thực phẩm. Các chủng nấm men phân lập từ các nguồn trong tự nhiên gồm: CO8 từ cơm rượu lên men, A78 và *S. cerevisiae* A112 được phân lập từ mẫu đất tại Sông Công, Thái Nguyên.

Quy trình lên men chuyển hóa tạo nấm men kẽm

Các chủng nấm men được lên men trong môi trường lên men có bổ sung muối kẽm $ZnSO_4$ ở nồng độ 1000 mg/L. Các điều kiện cho quá trình lên men được tiến hành trong máy lắc 150 vòng/phút, ở 28°C. Ở thời điểm cuối quá trình lên men, bắt hoạt nấm men bằng phương pháp sốc nhiệt, ly tâm dịch sau lên men. Rửa 3 lần sinh khối nấm men bằng nước khử ion để loại bỏ môi trường và muối kẽm bám trên bề mặt tế bào. Thu sinh khối khô bằng phương pháp sấy

2 pha, đầu tiên sấy ở điều kiện 60°C trong 2 h, sau đó kết thúc quá trình sấy ở 105°C đến khối lượng không đổi. Cân sinh khối nấm men để xác định tốc độ phát triển của nấm men.

Phương pháp phá tế bào thu hồi các phân đoạn kẽm

Các hợp chất của kẽm trong mẫu nấm men được giải phóng ra khỏi tế bào bằng phương pháp phá tế bào nghiên cứu được mô tả chi tiết trong nghiên cứu của Ramper và đồng tác giả (Liu *et al.*, 2015; Rampler *et al.*, 2012). Cân 50 mg mẫu nấm men đông khô cho vào ống polypropylene (PP) dung tích 15 mL, thêm 1,5 mL dung dịch đệm photphat, bi thủy tinh đã được rửa sạch bằng axit HCl và nước cất. Thí nghiệm được tiến hành trên hệ thống máy nghiền bi ở tốc độ 5000 vòng/phút. Mẫu được li tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút và tách pha. Dịch trong thu được được lọc qua màng lọc 0,45 μm và phân tích bằng HPLC-ICPMS.

Phân tích hàm lượng Zn tổng trong mẫu nấm men

Hàm lượng Zn tổng số được phân tích bằng phương pháp ICP-MS. Mẫu được vô cơ hóa bằng cách: cân 50 mg mẫu nấm men chuyển vào bình phá mẫu, thêm vào 2 mL HNO_3 đặc và ngâm qua đêm, thêm 1 mL H_2O_2 đặc và tiến hành phá mẫu bằng lò vi sóng. Mẫu sau khi để nguội được định mức thành 10 mL, lấy 1 mL pha loãng thành 10 mL bằng dung dịch HNO_3 2% và đo nồng độ Zn trong mẫu loãng này bằng phương pháp ICP-MS. Xây dựng đường chuẩn để tính toán lượng kẽm tổng trong mẫu thí nghiệm. Phương trình đường chuẩn của Zn bằng phương pháp ICP-MS như sau: $Y = 114 \cdot X - 833$; $R^2 = 0,9999$, trong đó Y là cường độ của $^{66}Zn^+$, X là nồng độ của Zn, đơn vị ng ml^{-1} .

Tách các phân đoạn vô cơ và hữu cơ bằng nhựa D101 macro

Các dạng vô cơ và hữu cơ chứa kẽm trong dịch chiết nấm men được phân tách sử dụng nhựa D101 macro trên cột tách sắc ký (kích thước 1,2 cm x 60 cm, Sigma Aldrich). Dịch chiết nấm men được điều chỉnh pH 4 bằng HCl 6 M sau đó được chuyển lên cột sắc ký. Dạng kẽm vô cơ được rửa giải bằng HNO_3 1% trong nước khử ion. Phân đoạn hữu cơ được rửa giải bằng 500 mL axeton nguyên chất (Sigma Aldrich). Phân đoạn vô cơ được cô cạn bằng cách sục khí N_2 ở nhiệt độ 40°C. Hàm lượng kẽm trong phân đoạn vô cơ và hữu cơ phân tích bằng ICP-MS.

- Tách phân đoạn protein theo phương pháp của Karadijova và đồng tác giả (2002): 25 mL của phân đoạn hữu cơ được chuyển vào ống falcon 50 mL và

bão hòa với dung dịch ammoni sunphat (Sigma Aldrich, 5,4 g ammoni sunphat trong 10 mL). Dung dịch được lắc đều và để qua đêm tại 4°C. Kết tủa hình thành được tách ra khỏi dung dịch bằng li tâm ở 3000 x g trong 5 phút. Hàm lượng kẽm trong phân đoạn protein được phân tích bằng ICP-MS sau khi vô cơ hóa mẫu bằng HNO₃ trong lò vi sóng (Karadijova *et al.*, 2002).

- Tách phân đoạn polysacarit được thực hiện theo phương pháp của Liu và đồng tác giả (2015): 25 mL phân đoạn hữu cơ được chuyển vào bình nhựa và thêm vào 100 mL etanol tuyệt đối (Sigma Aldrich, nồng độ etanol của dung dịch cuối cùng là 80% (v/v)). Dung dịch được giữ yên tại 4°C trong 24 h. Kết tủa hình thành được tách ra khỏi dung dịch bằng li tâm ở 3000 x g trong 5 phút. Hàm lượng kẽm trong phân đoạn polysacarit được phân tích bằng ICP-MS sau khi vô cơ hóa mẫu bằng HNO₃ trong lò vi sóng (Liu *et al.*, 2015).

Tách các dạng liên kết kẽm trong mẫu bằng hệ liên hợp HPLC-ICP-MS

Các dạng vô cơ và hữu cơ trong mẫu dịch chiết

nấm men được phân tích trên hệ liên hợp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối với quang phổ nguyên tử nguồn ion hóa plasma cao tần cảm ứng (HPLC-ICP-MS). Các điều kiện phân tích kẽm bằng ICP-MS được tối ưu bằng cách sử dụng dung dịch chuẩn kẽm 1000 µg/L (Merck). Độ ổn định của máy đo được kiểm tra hàng ngày bằng dung dịch chuẩn máy và dung dịch kẽm chuẩn. Phần mềm MassHunter (Agilent, Mỹ, version 6) được dùng để chuyển đổi dữ liệu và xử lý số liệu. Ưu điểm chính của detector ICP-MS là tín hiệu phân tích không phụ thuộc vào dạng tồn tại của chất, chỉ phụ thuộc vào tổng nồng độ chất đi vào plasma. Các dạng tồn tại của chất được xác định dựa vào thời gian lưu trên cột tách sắc ký so sánh với thời gian lưu của chất chuẩn. Trong nghiên cứu này, dạng vô cơ và hữu cơ của kẽm được tách bằng cột trao đổi cation sử dụng pha động NH₄CH₃COO với nồng độ khác nhau trong quá trình tách sắc ký (Karasinski *et al.*, 2014; Ovca *et al.*, 2011). Tỷ lệ kẽm vô cơ và hữu cơ được tính dựa theo tỉ lệ diện tích pic của dạng chất tương ứng trên sắc ký đồ HPLC-ICP-MS. Các điều kiện phân tích kẽm được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Các điều kiện phân tích kẽm bằng hệ thống liên hợp HPIC-ICP-MS.

Thiết bị	Thông số	Giá trị
HPLC (Shimadzu LC 10A)		
	Cột tách	Dionex IonPAC CS12A, L = 250 mm, d = 4,0 mm, dp= 8.5µm
	Nhiệt độ cột tách	Nhiệt độ phòng (25-27°C)
	Thành phần pha động	Kênh A: 25 mM NH ₄ CH ₃ COO, pH 5,0 Kênh B: 250 mM NH ₄ CH ₃ COO, pH 5,0
	Tốc độ pha động	1,0 mL/ phút, rửa giải theo gradient
	Thể tích mẫu	100 µL
ICP-MS (Perkin Elmer ELAN 9000)		
	Khí plasma	16 L / phút
	Khí phụ trợ	1,25 L / phút
	Khí tạo sol	0,8 L / phút
	Công suất plasma	1250 W
	Bộ tạo sol	PFA
	Buồng phun	Scott, double pass
	Ion đo	Zn ⁺ (m/z 66),
	Thời gian đo	100 ms
	Chế độ đo	Peak hopping
	Tỉ lệ Zn vô cơ/Zn hữu cơ	Tỉ lệ % diện tích pic trên sắc đồ

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

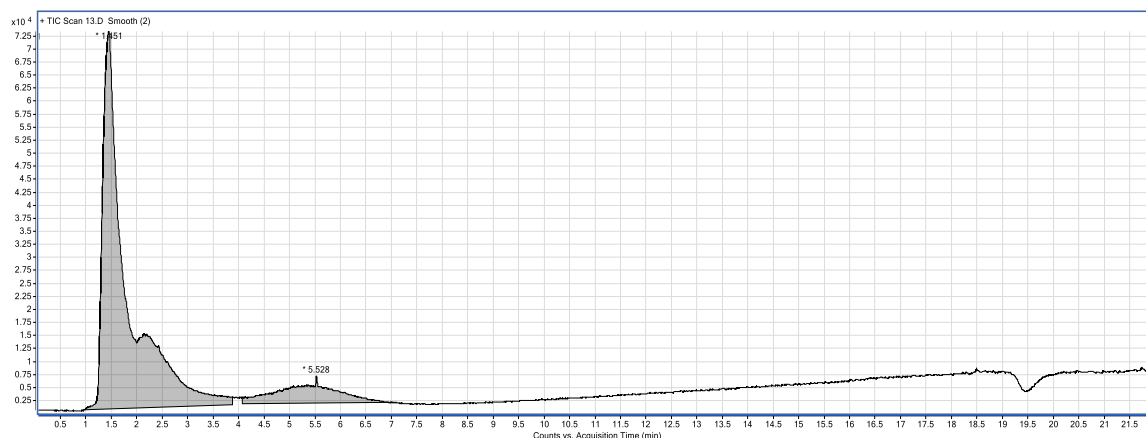
Kết quả phân tích hàm lượng kẽm hữu cơ trong sinh khối nấm men

Sau khi tiến hành sàng lọc các chủng nấm men có khả năng tích lũy kẽm cao, 12 chủng nấm men có khả năng tích kẽm với hàm lượng trên 5 mg/g sinh khối được lựa chọn để phân tích định lượng kẽm hữu cơ và dạng liên kết của kẽm trong sinh khối nấm

men. Các mẫu nấm men được xử lý theo phương pháp nghiền bi được mô tả chi tiết trong nghiên cứu của Ramper và đồng tác giả (Liu *et al.*, 2015; Rampler *et al.*, 2012). Dịch nấm men sau khi phá tế bào được lọc qua màng lọc với kích thước lỗ 0,45 µm. Dịch lọc thu được bơm lên hệ thống HPLC-ICP-MS trong điều kiện tối ưu được đưa ra ở phần phương pháp. Kết quả được thể hiện ở Hình 1 và Bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng kẽm hữu cơ tồn tại trong 12 chủng nấm men giàu kẽm.

STT	Chủng nấm men	Sinh khối khô (g/100 ml)	Hàm lượng kẽm trong sinh khối khô (mg/g)	Tỉ lệ kẽm hữu cơ (%)
1	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4007	0,93 ± 0,08	7,50 ± 0,21	80,43 ± 2,13
2	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4017	0,90 ± 0,09	5,23 ± 0,22	51,56 ± 1,53
3	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4059	0,89 ± 0,09	7,05 ± 0,19	78,64 ± 1,46
4	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4080	0,87 ± 0,08	7,65 ± 0,12	85,86 ± 1,24
5	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4087	0,94 ± 0,11	8,91 ± 0,21	86,86 ± 1,51
6	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4130	0,87 ± 0,09	5,47 ± 0,19	78,92 ± 2,16
7	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4131	0,95 ± 0,13	5,89 ± 0,3	62,65 ± 3,05
8	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4157	0,89 ± 0,09	7,19 ± 0,12	74,98 ± 1,34
9	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4158	0,91 ± 0,09	6,35 ± 0,19	71,12 ± 1,12
10	<i>S. cerevisiae</i> A112	1,02 ± 0,07	10,95 ± 0,13	88,17 ± 1,27
11	CO8	0,83 ± 0,08	8,16 ± 0,18	86,05 ± 1,13
12	A78	0,71 ± 0,09	6,43 ± 0,17	70,87 ± 2,16



Hình 1. Sắc ký đồ phân tích dạng kẽm trong sinh khối nấm men A112

Kết quả thực nghiệm ở bảng 2 cho thấy, trong 12 mẫu sinh khối nấm men được nghiên cứu, kẽm liên kết với các phân đoạn hữu cơ tương đối cao. Kẽm trong mẫu dịch chiết của các chủng nấm men được nghiên cứu phân bố chủ yếu dưới dạng liên kết với hợp chất hữu cơ, dao động từ 51,56 tới 88,17% so với lượng kẽm có trong dịch chiết của các mẫu được

phân tích. Tuy nhiên, ở hầu hết các chủng, hàm lượng kẽm liên kết với các phân đoạn hữu cơ đều cao hơn 70%. Kết quả này đã chứng minh khả năng chuyển hóa nguồn kẽm vô cơ trong môi trường nuôi cấy, thành dạng kẽm liên kết với hợp chất hữu cơ tích lũy trong tế bào của các chủng nấm men. Đồng thời, có sự khác biệt rõ rệt về tỉ lệ kẽm hữu cơ tích

lũy ở các chủng nấm men. Kẽm dạng hữu cơ chiếm tỉ lệ cao nhất trong sinh khối chủng nấm men phân lập A112 đạt giá trị 88,17% và thấp nhất trên chủng *S.cerevisiae* CNTP 4017 với giá trị 51,56%. Điều này có thể giải thích, do đặc tính của chủng quyết định tới khả năng hấp thu và chuyển hóa kẽm vô cơ thành kẽm hữu cơ tích lũy trong tế bào. Roepcke và đồng tác giả khi tiến hành tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy thu nấm men giàu kẽm trên chủng *Pichia guilliermondii* LBP 063 kết quả cho thấy trên 91% kẽm liên kết với các dạng hợp chất hữu cơ (Roepcke *et al.*, 2011). Trong nghiên cứu này, tỉ lệ kẽm hữu cơ cao nhất đạt 88,17% trên chủng *S.cerevisiae* A112, giá trị này thấp hơn nghiên cứu của Roepcke và đồng tác giả. Tuy nhiên, đây cũng là chủng có khả năng tích lũy kẽm hữu cơ với hàm lượng cao trong sinh khối.

Kết quả xác định một số dạng kẽm tồn tại trong sinh khối nấm men

Trong quá trình lên men tạo sinh khối nấm men giàu kẽm, kẽm được bổ sung ở nồng độ cao trong môi trường nuôi cấy. Tế bào nấm men hấp thu kẽm thông qua việc hình thành các hợp chất protein, polysacarit... liên kết với kẽm, hiện tượng metalloprotein cũng như việc khoáng hóa và dự trữ kẽm ở không bào. Trong nghiên cứu này, việc tiến hành phân tích thành phần hợp chất kẽm liên kết với protein và polysacarit đã được tiến hành thông qua tách phân đoạn trên cột nhựa macro D101, kết tủa polysacarit và protein theo phương pháp của Liu và đồng tác giả (2015), Karadjo và đồng tác giả (2005), kết quả được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xác định một số dạng kẽm tồn tại trong sinh khối nấm men.

STT	Chủng nấm men	Tỉ lệ kẽm liên kết với protein (%)	Tỉ lệ kẽm liên kết với polysacarit (%)
1	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4007	9,70 ± 0,19	12,16 ± 0,27
2	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4017	8,42 ± 0,17	11,18 ± 0,19
3	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4059	14,50 ± 0,21	19,21 ± 0,20
4	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4080	6,47 ± 0,09	16,61 ± 0,50
5	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4087	15,40 ± 0,18	20,52 ± 0,81
6	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4130	11,01 ± 0,26	14,84 ± 0,19
7	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4131	14,65 ± 0,18	17,90 ± 0,23
8	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4157	9,12 ± 0,23	11,86 ± 0,27
9	<i>S. cerevisiae</i> CNTP 4158	6,80 ± 0,85	12,40 ± 0,31
10	<i>S. cerevisiae</i> A112	15,86 ± 0,25	28,25 ± 0,16
11	CO8	12,86 ± 0,25	18,25 ± 0,19
12	A78	10,81 ± 0,11	15,01 ± 0,18

Kết quả phân tích dạng kẽm tồn tại trong sinh khối nấm men cho thấy, tỉ lệ kẽm liên kết với protein dao động từ 6,47 đến 15,86% và tỉ lệ kẽm liên kết với polysacarit dao động từ 11,18 đến 28,25% tùy thuộc vào chủng nấm men. Đồng thời, ở mỗi chủng nấm men, dạng kẽm liên kết với polysacarit lớn hơn dạng kẽm gắn với các phân đoạn protein. Kẽm có vai trò rất quan trọng trong quá trình trao đổi chất của cơ thể. Kẽm liên kết với hợp chất hữu cơ có thể được hấp thụ dễ dàng và ứng dụng trong y học. Dạng kẽm liên kết với polysacarit đã được chứng minh có tác dụng giải độc khi bị ngộ độc kim loại nặng (Sibikina *et al.*, 2009). Liu và đồng tác giả (2015) khi tiến hành phân tích dạng kẽm tồn tại ở loài nấm *Flammulina velutipes* cho rằng dạng kẽm liên kết

trong loài này chủ yếu gắn với các phân đoạn polysacarit và các phân đoạn protein. Hơn nữa, dạng kẽm liên kết với polysacarit lớn hơn dạng kẽm gắn với các phân đoạn protein ở tất cả các chủng (Liu *et al.*, 2015). Chủng nấm men *S. cerevisiae* A112 có tỉ lệ kẽm liên kết với hợp chất hữu cơ cao nhất, dạng kẽm liên kết với protein và polysacarit tương ứng đạt 15,86% và 28,25% cao nhất trong số các chủng. Đây sẽ là các chủng tiềm năng cho sản xuất bột nấm men giàu kẽm ứng dụng trong sản xuất thực phẩm bổ sung nguyên tố vi lượng kẽm cho con người.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng ghép nối với detector khối phổ kế nguyên

từ nguồn plasma cao tần cảm ứng đã được giới thiệu và nghiên cứu áp dụng thành công cho phân tích liên kết của Zn trong mẫu nấm men. Kết quả phân tích chỉ ra rằng, trong mẫu nấm men giàu kẽm, dạng liên kết của Zn với các hợp chất hữu cơ là chủ yếu. Ở hầu hết các chủng được nghiên cứu dạng kẽm liên kết với polysaccharit lớn hơn dạng kẽm liên kết với protein. Trong nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi tập trung vào xác định khối lượng phân tử của dạng liên kết của Zn với hợp chất hữu cơ dựa trên sắc ký lọc gel (SEC: Size exclusion chromatography) kết hợp với khối phổ kế phân giải cao. Đồng thời, phân tích thêm các dạng tồn tại của kẽm liên kết với các phân tử nhỏ khác trong mẫu dịch chiết nấm men.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài nghiên cứu thuộc nhiệm vụ khoa học và công nghệ cấp quốc gia: “Nghiên cứu công nghệ sản xuất bột nấm men giàu kẽm hữu cơ làm nguyên liệu sản xuất thực phẩm chức năng”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- BaoYM, Choct M, Iji PA, Bruerton K (2007) Effect of organically complexed copper, iron, manganese and zinc on broiler performance, mineral excretion and accumulation. *J Appl Poult Res* 16(3): 448–455.
- Brooks MA, Grimes JL, Lloyd KE, Verissimo S, Spears JW, Carolina N (2018) Bioavailability in chicks of zinc from zinc propionate. *J Appl Poult Res* 22(2): 153–159.
- Hill GM, Mahan DC, Jolliff JS (2014) Comparison of organic and inorganic zinc sources to maximize growth and meet the zinc needs of the nursery pig. *J Anim Sci* 92(4): 1582–1594.
- Karadjova I, Izgi B, Gucer S (2002) Fractionation and speciation of Cu, Zn and Fe in wine samples by atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 57(3): 581–590.
- Karasiński J, Cegiełkowska W, Wojciechowski M, Wierzbicka M, Bulska E (2014) Analytical protocol for investigation of zinc speciation in plant tissue. *Chem Pap* 68(3): 291–299.
- Liu F, Pei F, Mariga AM, Gao L, Chen G, Zhao L (2015) Separation and speciation analysis of zinc from *Flammulina velutipes*. *J Food Drug Anal* 23(4): 630–635.
- Lu L, Jia-ping L, Yan-hong G (2012) Selection of high organic chromium yielding yeast strain after space piggyback experiment and its characteristic. *Afr J Microbiol Res* 6(1): 127–136.
- Ovca A, Van Elteren JT, Falnoga I, Šelih VS (2011) Speciation of zinc in pumpkin seeds (*Cucurbita pepo*) and degradation of its species in the human digestive tract. *Food Chem* 128(4): 839–846.
- Rampler E, Rose S, Wieder D, Ganner A, Dohnal I, Dalik T, Hann S, Koellensperger G (2012) Monitoring the production process of selenized yeast by elemental speciation analysis. *Metallomics* 4(11): 1176.
- Roepcke CBS, Vandenberghe LPS, Socol CR (2011) Optimized production of *Pichia guilliermondii* biomass with zinc accumulation by fermentation. *Anim Feed Sci Technol* 163: 33–42.
- Sandstead HH (2015) Chapter 61, *Zinc*, in Handbook on the Toxicology of Metals, no. 13530: 1369–1385.
- Sibikina O, Iozep A, Moskvina A (2009) Polysaccharide complexes with metal cations: structure and application (a review). *Pharm Chem J* 43:341-345.
- Stehlik-tomas V, Zeti VVG, Stanzer D, Grba S (2004) Zinc, Copper and Manganese Enrichment in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol Biotechnol* 42(2): 115–120.

DETERMINATION OF ZINC COMPOUNDS IN YEAST BIOMASS

Trang Nguyen Thi¹, Manh Le Duc¹, Khanh Nguyen Thi Minh¹, Thoa Vu Kim², Binh Chu Dinh³, Anh Pham Thi Lan⁴

¹Food Industries Research Institute

²Ha Noi Open University

³School of Chemical Engineering, Ha Noi University of Science and Technology

⁴University of Science, Vietnam National University, Hanoi

SUMMARY

Zinc is an essential trace element for many physiological function in human and animal. When bound to organic substrate, zinc is more efficiently absorbed by organisms, has a high biological activity and a low toxicity. The ability of *S. cerevisiae* to accumulate zinc can be used for production of a zinc-rich ingredient for

functional food products. However, only a few investigations on the form of Zn in *S. cerevisiae* have been reported. In this study, organic and inorganic compounds of zinc in yeast extract samples was separated on D101 macro-resin and quantified by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Inorganic and organic compounds of zinc in yeast samples were extracted with phosphate buffer by bead mills method and fractionated on the D101 macro-resin. All critical parameters of extraction conditions as well as separation conditions of zinc compounds on D101 macro-resin were investigated and optimized. In addition, speciation analysis of zinc compounds also was performed with online high-performance ion chromatography in combination with inductively coupled plasma mass spectrometry (HPIC-ICP-MS). Analyzed results indicated that the content of the organic state of Zn was more than that of the inorganic state. Organic zinc was the most abundance in yeast samples in the 51.56 – 88.17%. The highest organic zinc was found in *S. cerevisiae* A112 at 88.17%. In all of the samples, the organic zinc was found in the polysaccharide fraction was more than that of protein fraction. Our research results are significant for medical and food applications. Speciation analysis of trace element Zn is helpful to elucidate its pharmacological mechanism.

Keywords: *D101 macro-resin, HPLC-ICP-MS, speciation analysis, yeast sample, zinc compounds*