

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

*****000*****



KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

TINH SẠCH ENZYME BROMELAIN TỪ THÂN DỨA (*Ananas comosus* (L.) Merr.) BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION

NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NIÊN KHÓA: 2002 – 2006

SINH VIÊN THỰC HIỆN: NGUYỄN THANH ĐIỀN

Thành phố Hồ Chí Minh

2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**TINH SẠCH ENZYME BROMELAIN TỪ THÂN DỨA
(*Ananas comosus* (L.) Merr.) BẰNG PHƯƠNG PHÁP
SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION**

GVHD: TS. BÙI MINH TRÍ

SVTH: NGUYỄN THANH ĐIỀN

Thành phố Hồ Chí Minh

2006

LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn:

- Ban Giám Hiệu trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh đã tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt thời gian học tập.
- Các Thầy Cô trong Bộ môn Công Nghệ Sinh Học cùng các Thầy Cô đã trực tiếp giảng dạy trong suốt bốn năm qua.
- TS. Bùi Minh Trí đã tận tình hướng dẫn, dìu dắt và động viên em trong thời gian thực hiện đề tài tốt nghiệp.
- Th.S Trần Nhật Phương, Th.S Dương Thị Hương Giang đã dành cho em nhiều sự hỗ trợ cần thiết và cung cấp nhiều kiến thức quý báu.
- Th.S Huỳnh Văn Biết, KS. Hồ Bích Liên, KS. Hồ Viết Thế và đặc biệt là KS. Lý Hồng Phát đã theo sát, tận tình giúp đỡ em vượt qua những khó khăn trong quá trình thực hiện đề tài.
- Các anh chị phụ trách phòng CNSH thuộc Trung Tâm Phân Tích Thí Nghiệm Đại học Nông Lâm Tp. HCM.
- Phòng Công Nghệ Enzyme-Viện Công Nghệ Sinh Học – Đại Học Cần Thơ.
- Cùng toàn thể lớp CNSH 28 thân thiện đã hỗ trợ, giúp đỡ và động viên tôi trong suốt thời gian làm đề tài.

Thành kính ghi ơn ba mẹ cùng những người thân trong gia đình luôn tạo điều kiện và động viên con trong suốt quá trình học tập tại trường.

Tháng 08 năm 2006
Nguyễn Thanh Điền

TÓM TẮT

NGUYỄN THANH ĐIỀN, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh. Tháng 08/2006.
TINH SẠCH ENZYME BROMELAIN TỪ THÂN DỨA (*Ananas comosus* (L.) Merr.)
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION

GVHD: TS. BÙI MINH TRÍ

Bromelain thân (EC 3.4.22.33) là một trong các enzyme cystein proteinase được tìm thấy nhiều nhất trong dứa (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Các enzyme này được áp dụng rộng rãi trong công nghiệp và trong y dược. Bromelain có ba hoạt tính khác nhau: peptidase, amidase, esterase. Trong đó đặc biệt bromelain thân có thể phân hủy cả cơ chất tự nhiên lẫn cơ chất tổng hợp. Chúng là enzyme có giá trị kinh tế và hầu hết sản phẩm bromelain thương mại được ly trích từ thân dứa. Do đó yêu cầu bức thiết được đặt ra là cần có một sản phẩm bột bromelain tinh sạch thuận lợi cho sử dụng, vận chuyển, tồn trữ. Những kết quả nghiên cứu bước đầu trong tinh sạch bromelain từ thân dứa cho thấy enzyme này có thể được rửa bằng acetone, tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion trên cột trao đổi cation UNO-S và đông khô bằng máy Lyopro 6000. Từ 97 gam thân dứa nhận được 50 ml dịch, sau khi rửa bằng acetone thu được 9 ml dịch rửa, sau khi qua cột sắc ký nhận được 108 ml dịch enzyme tinh khiết với nồng độ là 0,53 mg/ml (chiếm 11,7 % protein tổng số), hiệu suất thu hồi hoạt tính 65,65 %. Và cuối cùng đông khô sản phẩm nhận được 4,6 gam bột bromelain với hàm lượng và hoạt tính enzyme nguyên vẹn sau 4 tuần nếu giữ ở -20°C. Kiểm tra qua SDS-PAGE cho thấy sản phẩm bromelain có độ tinh sạch cao.

SUMMARY

NGUYEN THANH DIEN, Nong Lam University of Ho Chi Minh City. August, 2006.

PURIFICATION OF BROMELAIN ENZYME FROM PINEAPPLE STEM (*Ananas comosus* (L.) Merr.) BY ION CHROMATOGRAPHY

Stem bromelain (EC 3.4.22.33) is the most abundant enzyme among cysteine proteinases found in the stem of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). These enzymes widely used in various industrial and medical applications. Bromelain has three different activities: *peptidase*, *amidase*, *esterase*. Among those, stem bromelain can hydrolyze natural substance as well as synthetic substance. In the market, almost commercial enzyme products are extracted from stem bromelain. For commercializing, it is important to produce a fine powder bromelain product that is easy to use, transport, and store. Preliminary study on purification of bromelain from pineapple stem showed that this enzyme could be precipitated by acetone, purified by cation exchange chromatography on UNO-S column and freeze-dried by Lyopro 6000 machine. 50 ml solution was obtained from 97 gr pineapple stem, then 9 ml precipitated solution achieved after acetone precipitation, and bromelain solution achieved after chromatography was 108 ml enzyme with the concentration of 0,53 mg/ml (11,7 % of total protein), and the recovery activity was 65,65 %. After freeze-dried process, we achieved 4,6 gr purified fine powder bromelain that remained activity after at least 4 weeks in -20°C. SDS-PAGE showed that the bromelain product was well purified.

MỤC LỤC

<i>Nội dung</i>	<i>Trang</i>
LỜI CẢM ƠN.....	iii
TÓM TẮT.....	iv
SUMMARY.....	v
MỤC LỤC	vi
DANH SÁCH CÁC BẢNG	x
DANH SÁCH CÁC HÌNH VÀ SƠ ĐỒ	xi
PHẦN 1. MỞ ĐẦU	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục tiêu của đề tài	2
1.3. Mục đích.....	2
1.4. Giới hạn của đề tài.....	2
1.5. Nội dung thực hiện	2
PHẦN 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
2.1. Giới thiệu sơ lược về cây dứa.....	3
2.2. Giới thiệu về enzyme.....	5
2.2.1. Sơ lược về enzyme	5
2.2.1.1. Định nghĩa về enzyme.....	5
2.2.1.2. Phân loại enzyme	5
2.2.1.3. Sự khác nhau về chất lượng enzyme và thị trường enzyme công nghiệp.....	7
2.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến vận tốc phản ứng enzyme.	8
2.2.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme.....	8
2.2.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất.....	8
2.2.2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ	8
2.2.2.4. Ảnh hưởng của pH	9
2.3. Enzyme Protease	9
2.3.1. Giới thiệu sơ lược các enzyme protease.....	10
2.3.1.1. Protease vi sinh vật.....	10
2.3.1.2. Protease động vật	10
2.3.1.3. Protease thực vật	10

2.3.2. Ứng dụng của enzyme protease.....	10
2.4. Enzyme bromelain thu nhận từ dứa.....	11
2.4.1. Giới thiệu Enzyme bromelain.....	11
2.4.2. Tính chất vật lí.....	11
2.4.3. Tính chất hóa học	12
2.4.3.1. Cấu tạo hóa học.....	12
2.4.3.2. Cấu trúc không gian	13
2.4.4. Hoạt tính của bromelain	13
2.4.4.1. Cơ chế tác động.....	14
2.4.4.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính.....	14
2.4.4.3. Các chất bảo vệ enzyme	16
2.4.5. Ứng dụng của bromelain	17
2.4.6. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước về enzyme Protease (chủ yếu là enzyme bromelain).....	17
2.4.6.1. Nghiên cứu trong nước.....	17
2.4.6.2. Nghiên cứu ngoài nước	18
2.5. Các kỹ thuật cơ bản trong quá trình tinh sạch protein/enzyme	19
2.5.1. Chuẩn bị dịch protein thô	19
2.5.2. Ổn định protein trong dịch chiết thô.	19
2.5.3. Các phương pháp rửa protein.....	20
2.5.3.1. Rửa bằng muối Sulfate ở các nồng độ khác nhau.	20
2.5.3.2. Rửa bằng dung môi hữu cơ.....	20
2.5.3.3. Rửa bằng điểm đẳng điện	21
2.5.3.4. Rửa bằng các loại polymer	21
2.5.3.5. Rửa bằng chất đa điện phân.....	21
2.6. Tinh sạch protein	21
2.6.1. Tại sao cần tinh sạch enzyme?	21
2.6.2. Mục tiêu và chiến lược tinh sạch enzyme	22
2.6.2.1. Mục tiêu	22
2.6.2.2. Chiến lược tinh sạch enzyme	22
2.6.3. Giới thiệu các phương pháp phân tách cơ bản trong tinh sạch enzyme	23
2.6.4. Sự lựa chọn phương pháp tinh sạch protein	23
2.7. Giới thiệu phương pháp sắc ký sinh Học	24
2.7.1. Các kỹ thuật sắc ký sinh học cơ bản.....	25

2.7.2. Sắc ký trao đổi ion.....	25
2.7.2.1. Khái niệm.....	25
2.7.2.2. Chọn chất trao đổi ion.....	27
2.7.2.3. Chọn dung dịch đệm.....	29
2.7.2.4. Phương pháp rửa trôi protein.....	29
2.8. Phương pháp đông khô sản phẩm (Freeze-drying).....	30
2.8.1. Khái niệm.....	30
2.8.2. Các giai đoạn của quá trình đông khô.....	30
2.8.3. Máy đông khô được sử dụng trong nghiên cứu.....	32
2.8.4. Ứng dụng của phương pháp đông khô.....	32
2.9. Phương pháp điện di trên Gel SDS-PAGE (Hames, 1998).....	32
2.9.1. Giới thiệu.....	32
2.9.2. Cấu tạo của gel Polyacrylamide.....	33
2.9.3. Nguyên tắc hoạt động của SDS-PAGE.....	34
PHẦN 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	35
3.1. Thời gian và địa điểm tiến hành.....	35
3.1.1. Thời gian.....	35
3.1.2. Địa điểm.....	35
3.2. Vật liệu.....	35
3.2.1. Thân dứa.....	35
3.2.2. Hóa chất.....	35
3.2.3. Dụng cụ và thiết bị.....	35
3.3. Nội dung và phương pháp nghiên cứu.....	36
3.3.1. Nội dung.....	36
3.3.1.1. Cách lấy mẫu.....	36
3.3.1.2. Các bước chính để thu nhận enzyme bromelain từ dứa.....	36
3.3.1.3. Xác định hoạt tính và protein tổng số.....	36
3.3.1.4. Điện di SDS-PAGE xác định trọng lượng phân tử và độ tinh sạch của enzyme.....	36
3.3.2. Phương pháp thí nghiệm.....	37
3.3.2.1. Thí nghiệm ly trích và khảo sát các tác nhân kết tủa.....	37
a. Thí nghiệm ly trích enzyme bromelain từ thân dứa ở quy mô nhỏ.....	37
b. Thí nghiệm khảo sát các tác nhân kết tủa.....	37
3.3.2.2. Thí nghiệm xác định hàm lượng và hoạt tính enzyme.....	38

a. Định lượng protein theo phương pháp Bradford (1976).....	38
b. Xác định hoạt tính protease theo phương pháp Anson	39
3.3.2.3. Thí nghiệm tinh sạch enzyme bromelain bằng sắc ký trao đổi ion.....	42
a. Nguyên tắc	42
b. Các bước tiến hành thí nghiệm	42
3.3.2.4. Thí nghiệm điện di enzyme bromelain sau tinh sạch.....	44
PHẦN 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	47
4.1. Khảo sát các tác nhân rửa	47
4.1.1. Kết quả xây đường chuẩn albumin theo phương pháp Bradford	47
4.1.2. Kết quả xây dựng đường chuẩn tyrosine theo phương pháp Anson	48
4.1.3. Kết quả xác định hàm lượng protein và hoạt tính enzyme của dịch thô	48
4.1.4. Kết quả xác định hàm lượng protein và hoạt tính enzyme của dịch rửa.....	49
4.1.4.1. Rửa với tác nhân amonium sulfate	49
4.1.4.2. Rửa với tác nhân acetone.....	50
4.1.4.3. Hiệu suất thu nhận enzyme bromelain thân bằng tác nhân rửa amonium sulfate và acetone ở 4°C.....	51
4.2. Kết quả tinh sạch enzyme bromelain bằng hệ thống tinh sạch BioLogic DuoFlow.	54
4.2.1. Kết quả thiết lập qui trình các bước cho máy BioLogic DuoFlow thực hiện.....	54
4.2.2. Kết quả của quá trình tinh sạch	60
a. Hàm lượng protein và hoạt tính bromelain trước tinh sạch	60
b. Hàm lượng protein và hoạt tính bromelain sau tinh sạch	61
c. Hiệu suất tinh sạch qua các giai đoạn	61
4.3. Đông khô sản phẩm.....	62
4.3.1. Kết quả đo hàm lượng protein enzyme sau đông khô 2 tuần; 4 tuần.	63
4.3.2. Kết quả hoạt tính enzyme sau đông khô 2 tuần; 4 tuần.....	63
4.4. Kết quả điện di xác định trọng lượng phân tử và độ tinh sạch.....	64
PHẦN 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	68
5.1. Kết luận	68
5.2. Đề nghị	69
PHẦN 6. TÀI LIỆU THAM KHẢO	70

DANH SÁCH CÁC BẢNG

<i>Bảng</i>	<i>Trang</i>
Bảng 2.1 Sự khác nhau về chất lượng enzyme.....	7
Bảng 2.2 Thị trường enzyme công nghiệp	7
Bảng 2.3 Protease động vật	10
Bảng 2.4 Ứng dụng protease trong công nghiệp	11
Bảng 2.5 Các phương pháp phân tách cơ bản trong tinh sạch enzyme.....	23
Bảng 2.6 Các loại nhựa trao đổi ion	28
Bảng 2.7 Chọn chất trao đổi ion.....	29
Bảng 3.1 Xây dựng đường chuẩn albumin.....	39
Bảng 3.2 Xây dựng đường chuẩn tyrosine	40
Bảng 3.3 Xác định lượng tyrosine trong dung dịch nghiên cứu	41
Bảng 4.1 Số liệu kết quả xây dựng đường chuẩn albumin.....	47
Bảng 4.2 Số liệu kết quả xây dựng đường chuẩn tyrosine	48
Bảng 4.3 Kết quả xác định hàm lượng protein và hoạt tính enzyme của dịch thô.....	49
Bảng 4.4 Kết quả xác định hàm lượng protein và hoạt tính enzyme của dịch tủa với tác nhân tủa amonium sulfate.....	49
Bảng 4.5 Kết quả xác định hàm lượng protein và hoạt tính enzyme của dịch tủa với tác nhân tủa acetone	50
Bảng 4.6 Hiệu suất thu nhận enzyme bromelain thân bằng tác nhân tủa amonium sulfate và acetone	51
Bảng 4.7 Qui trình 1: Các bước cho máy BioLogic DuoFlow thực hiện.....	56
Bảng 4.8 Qui trình 2: Các bước cho máy BioLogic DuoFlow thực hiện.....	57
Bảng 4.9 Qui trình 3: Các bước cho máy BioLogic DuoFlow thực hiện.....	59
Bảng 4.10 Hàm lượng protein và hoạt tính enzyme của dịch tủa acetone trước tinh sạch	60
Bảng 4.11 Hàm lượng protein và hoạt tính bromelain của hai peak sau tinh sạch	61
Bảng 4.12 Hiệu suất tinh sạch qua các giai đoạn	61
Bảng 4.13 Hàm lượng protein enzyme sau đông khô 2 tuần; 4 tuần.	63
Bảng 4.14 Hoạt tính enzyme sau đông khô 2 tuần; 4 tuần	63
Bảng 4.15 Trọng lượng phân tử các protein chuẩn của hãng Fermentas	64

DANH SÁCH CÁC HÌNH VÀ SƠ ĐỒ

Hình	Trang
Hình 2.1 Thân dừa Queen; thân dừa Cayenne.....	4
Hình 2.2 Đường biểu diễn ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến tốc độ phản ứng	8
Hình 2.3 Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của tốc độ phản ứng vào nồng độ cơ chất.....	8
Hình 2.4 Cấu trúc phần hydratcarbon của bromelain thân	12
Hình 2.5 Nguyên tắc cơ bản của phương pháp sắc ký sinh học.....	24
Hình 2.6 Các quá trình cơ bản của phương pháp sắc ký sinh học.....	24
Hình 2.7 Mô tả nguyên lý của quá trình sắc ký trao đổi ion	26
Hình 2.8 Cơ chế tương tác của chất trao đổi ion âm	27
Hình 2.9 Cơ chế tương tác của chất trao đổi ion dương.....	27
Hình 2.10 Yếu tố ảnh hưởng pH trên mạng lưới trao đổi protein	28
Hình 2.11 Máy sấy thăng hoa Lyopro 6000	32
Hình 2.12 Cấu tạo Gel Polyacryamide	33
Hình 2.13 Sự phân tách protein bằng phương pháp điện di SDS-PAGE.....	34
Hình 3.1 Hệ thống sắc ký tinh sạch protein áp suất cao BioLogic Duo-Flow	42
Hình 3.2 Thiết bị điện di đứng SDS-PAGE	44
Hình 4.1 Đồ thị đường chuẩn albumin.	47
Hình 4.2 Đồ thị đường chuẩn tyrosine	48
Hình 4.3 Sắc ký đồ tinh sạch enzyme bromelain của quy trình 1	56
Hình 4.4 Sắc ký đồ tinh sạch enzyme bromelain của quy trình 2.	58
Hình 4.5 Sắc ký đồ tinh sạch enzyme bromelain của quy trình 3	59
Hình 4.6 Sản phẩm đông khô	63
Hình 4.7 Kết quả điện di SDS-PAGE	64
Sơ đồ	
Sơ đồ 2.1 Chiến lược chung cho quá trình tinh sạch enzyme	22
Sơ đồ 4.1 Quy trình tinh sạch enzyme bromelain thân thô bằng tác nhân tủa amonium sulfate.....	53
Sơ đồ 4.2 Quy trình tinh sạch enzyme bromelain thân bằng phương pháp trao đổi ion.....	67

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Ace:	acetone
APS:	amonium persulfate
Amo:	amonium sulfate
BAEE:	benzoyl arginine ethyl ester
CTAce15:	Cayenne thân tủa acetone pha loãng 15 lần
CTAmo50:	Cayenne thân tủa amonium sulfate pha loãng 50 lần
CTpeakI12:	Cayenne thân peak I pha loãng 12 lần
CtpeakII8:	Cayenne thân peak II pha loãng 8 lần
Ctv:	cộng tác viên
DịchCT10:	dịch Cayenne thân pha loãng 10 lần
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
Enzymedk120T2:	enzyme đông khô pha loãng 120 lần (tuần thứ 2)
Enzymedk120T4:	enzyme đông khô pha loãng 120 lần (tuần thứ 4)
MW:	molecular weight
OD:	optical density
SDS:	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE:	sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis
Tp. HCM:	Thành phố Hồ Chí Minh
TEMED :	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
UV:	ultra violet

PHẦN 1. MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây người ta dành sự quan tâm rất nhiều đến việc tách chiết enzyme bromelain để sử dụng làm tác nhân kích thích tiêu hóa, chữa vết thương, ổn định dịch lên men. Nhưng việc nghiên cứu thành công một enzyme không phải ở việc chiết xuất, xác định đặc tính, yếu tố ảnh hưởng hoạt động của enzyme mà phải tinh chế được enzyme ở dạng sạch, để chế phẩm có hoạt độ cao. Việc tinh chế enzyme hết sức cần thiết bởi làm cho enzyme tinh sạch ít còn lẫn tạp chất (các protein không phải enzyme), nâng cao hoạt tính enzyme so với dạng thô nhiều lần thuận lợi cho nghiên cứu, bảo quản, nhất là nguyên liệu dùng làm thuốc trong điều trị và sản xuất.

Ngày nay, enzyme đã được sản xuất và sử dụng trong nhiều lĩnh vực như công nghệ thực phẩm, y học, dược phẩm và các ngành công nghiệp khác. Đối với nước ta nguồn enzyme từ thực vật có triển vọng lớn vì nguồn nguyên liệu rất phong phú (dứa, đu đủ...). Trong quá trình chế biến dứa đóng hộp chỉ khoảng 30 % quả dứa được sử dụng, còn lại 70 % phụ phẩm mà chủ yếu là vỏ dứa, thân dứa (Hội thảo quốc gia “Cây có múi, xoài và dứa”, 2005). Nếu tận dụng được nguồn phế phẩm thì vừa có thể giảm thiểu chất thải hữu cơ gây ô nhiễm môi trường vừa có thể sản xuất được sản phẩm bromelain bởi vì hầu như trên tất cả cả bộ phận của cây dứa đều có enzyme. Bromelain có ba hoạt tính khác nhau: *peptidase*, *amidase*, *esterase*. Bromelain thân có thể phân hủy cả cơ chất tự nhiên lẫn cơ chất tổng hợp, chúng là enzyme có giá trị kinh tế và hầu hết sản phẩm bromelain thương mại được ly trích từ thân dứa. Một yêu cầu bức thiết cũng được đặt ra là cần có một sản phẩm bột bromelain tinh sạch thuận lợi cho sử dụng, vận chuyển, tồn trữ.

Trong đề tài này chúng tôi đã tiến hành xây dựng qui trình trích ly, tinh sạch enzyme bromelain ở qui mô nhỏ. Đó là qui trình sản xuất bromelain tinh khiết dạng bột bằng phương pháp tủa bằng acetone ($C_3H_6O_2$) và tinh sạch dạng dung dịch lỏng bằng cách sử dụng cột sắc ký trao đổi ion.

1.2. Mục tiêu của đề tài

Thiết lập qui trình tinh sạch enzyme bromelain từ thân dứa bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion và đông khô sản phẩm ở quy mô nhỏ.

1.3. Mục đích

Làm cơ sở để sản xuất enzyme bromelain từ thân dứa bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion ở quy mô lớn hơn.

1.4. Giới hạn của đề tài

Do thời gian và phương tiện hạn chế nên chỉ bước đầu tiến hành sản xuất enzyme bromelain ở quy mô nhỏ.

1.5. Nội dung thực hiện

- Phương pháp ly trích protein tổng số
- Khảo sát các tác nhân kết tủa protein
- Phương pháp xác định protein tổng số và phương pháp xác định hoạt tính enzyme
- Tinh sạch enzyme bằng cột sắc ký lỏng trao đổi ion
- Đông khô sản phẩm
- Điện di protein theo trọng lượng phân tử

PHẦN 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Giới thiệu sơ lược về cây dứa

Cây dứa có nguồn gốc từ Nam Mỹ, được người Châu Âu phát hiện vào năm 1493. Cây dứa thuộc loài *A. comosus* var *ananassoides* được thuần hóa bởi những người thổ dân Tupi-Guarani và được phát tán đến Antilles, Bắc Andes và Trung Mỹ (Bertoni, 1919; trích dẫn bởi Nguyễn Văn Kế, 2001).

Ở nước ta dứa trồng trên khắp cả các vùng nhưng chủ yếu là miền Bắc và miền Nam:

- ❖ Ở miền Bắc có các giống như:
 - Dứa hoa Phú Thọ (Natal Queen): Victoria
 - Dứa hoa Na Hoa (Nam Phi Queen): Paris, Yellow Mauritius
 - Dứa hoa Nam Bộ (Nam Phi Queen): khóm, thơm ta.
 - Dứa ta (Red Spanish): thơm bẹ đỏ, thơm lửa, dứa Sần, dứa Buộm, Tam dương.
 - Độc bình không gai (Cayenne): thơm tây, Sarawak, Hồng Kông.
- ❖ Ở miền Nam khóm trồng chủ yếu là nhóm Queen, tập trung ở một số tỉnh như: Cần Thơ, Kiên Giang, Minh Hải, Long An, Tiền Giang và thành phố Hồ Chí Minh, gồm có các giống Singapore Canning, Alexandra, Mac-grégor...Nhóm Cayenne chỉ được trồng nhiều ở Bảo Lộc (Lâm Đồng) (Trần Thế Tục và Vũ Mạnh Hải, 2000).

❖ Các bộ phận trên cây dứa có thể cho enzyme bromelain

Quả

Quả dứa thuộc loại quả tụ do 100 – 200 quả nhỏ hợp lại. Các giống khác nhau thì hình dạng quả và mắt quả cũng khác nhau. Bộ phận ăn được của dứa là do trục của chùm hoa và lá bắc phát triển nên. Sau khi hoa tàn thì quả bắt đầu phát triển. Đây là bộ phận cho nhiều enzyme bromelain nhất, chiếm 50% protein của quả dứa. bromelain quả là một dạng acid protease với số hiệu phân loại là EC 3.4.22.33.

(Nguồn: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/3422.html>)

Thân

Thân cây dứa chia làm 2 phần: một phần trên mặt đất và một phần dưới mặt đất. Phần ở trên thường bị các lá che kín nên khó nhìn thấy. Khi cây đã phát triển đến mức độ nhất định, có thể dùng các mầm ngủ trên các đọt để nhân giống. Năm 1957, Heinicke nhận thấy trong thân cây dứa có một lượng lớn bromelain và người ta bắt đầu tìm cách tách chiết nó và sản xuất dưới dạng thuốc để chữa bệnh. Bromelain thân là một dạng protease kiềm (với số hiệu phân loại là EC 3.4.22.32) nó khác với protease acid của bromelain quả.

(Nguồn: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/3422.html>)



Hình 2.1 Thân dứa Queen; thân dứa Cayenne (bên phải)

Lá

Lá dứa mọc trên thân cây theo hình xoắn ốc. Lá thường dày, không có cuống, hẹp ngang và dài. Bề mặt và lưng lá thường có một lớp phấn trắng hoặc một lớp sáp có tác dụng làm giảm độ bốc hơi nước ở lá. Các giống dứa thường có gai nhọn và cứng ở mép lá, nhưng cũng có giống lá không gai như Cayenne. Tùy theo giống, một cây dứa trưởng thành có khoảng 60 – 70 lá. Đây cũng là nguồn có thể thu nhận được enzyme bromelain cùng loại với enzyme bromelain thân.

Rễ

Rễ dứa gồm rễ cái và rễ nhánh (mọc ra từ phôi hạt); rễ bất định (mọc ra từ mầm rễ trên các đọt của các loại chồi dứa trước khi đem trồng). Rễ dứa thuộc loại ăn nông,

phần lớn do nhân giống bằng chồi nên mọc từ thân ra, rễ nhỏ và phân nhiều nhánh. Bộ rễ dứa thường tập trung ở tầng đất 10 – 26 cm và phát triển rộng đến 1 m. (Nguyễn Văn Ké, 2001). Đây cũng là nguồn có thể thu nhận được enzyme bromelain cùng loại với enzyme bromelain thân.

2.2. Giới thiệu về enzyme

2.2.1. Sơ lược về enzyme

2.2.1.1. Định nghĩa về enzyme

Enzyme là nhóm protein chuyên biệt hóa cao có hoạt tính xúc tác sinh học, do tế bào sống tiết ra, có tác dụng tăng tốc độ và hiệu suất phản ứng hóa sinh, mà sau phản ứng vẫn còn giữ nguyên khả năng xúc tác (Nguyễn Tiến Thắng, 2004).

Các enzyme xúc tác cho hầu hết các phản ứng hóa học xảy ra trong cơ thể sống, đảm bảo cho các quá trình chuyển hóa các chất trong cơ thể sống tiến hành với tốc độ nhịp nhàng, có trật tự, theo những chiều hướng xác định. Pavlov đã nói : “Hoạt động đầu tiên của enzyme là biểu hiện đầu tiên của hoạt động sống. Không có sự sống nào lại không có quá trình enzyme”. Điều này càng làm sáng tỏ định nghĩa của Anghen : “Sự sống, đó là phương thức tồn tại của thể protein” (Lê Ngọc Tú và ctv, 1982).

2.2.1.2. Phân loại enzyme

- Năm 1930, Hiệp Hội Hóa Sinh Quốc Tế (IOB) đã thống nhất phân loại enzyme ra làm 6 lớp và được đánh số thứ tự từ một đến sáu. Các số thứ tự này là cố định cho mỗi lớp. Mỗi lớp lại chia làm nhiều tổ, mỗi tổ có nhiều nhóm. Chính vì thế theo hệ thống phân loại, mỗi enzyme thường có bốn số: số thứ tự một chỉ lớp, số thứ tự hai chỉ tổ, số thứ ba chỉ nhóm, số thứ tư chỉ enzyme. Tên của các lớp, tổ và nhóm như sau:

i. *Oxidoreductase*: xúc tác phản ứng oxy hóa khử

a. *Dehydrogenase*

b. *Oxidase*

c. *Oxygenase*

d. Peroxidase

ii. *Transferase*: xúc tác phản ứng vận chuyển nhóm

a. *Acytransferase*

b. *Glucosyltransferase*

c. *Aminotransferase*

d. *Phosphotransferase*

iii. *Hydrolase*: xúc tác phản ứng thủy phân

a. *Peptide hydrolase*

b. *Lipase*

iv. *Lyase*: xúc tác phản ứng tạo liên kết đôi

a. *Pyruvate decarboxylase*

b. *Fumarate hydrolase*

v. *Isomerase*: xúc tác phản ứng đồng phân hóa

vi. *Ligase*: xúc tác phản ứng kết gắn giữa các phân tử

- Theo Hội Đồng Enzyme Quốc tế được thành lập năm 1955 bởi Hội Liên Hiệp Hóa Sinh Quốc tế (Hội Liên Hiệp Hóa Sinh và Sinh Học Phân tử QT)

Tên gọi enzyme theo số EC (enzyme commission):

Gồm 4 phần: a,b,c,d.

(a) Số đầu tiên: chỉ nhóm, 1 trong 6 nhóm, (kiểu phản ứng xúc tác)

(b) Số thứ hai: chỉ phụ nhóm (kiểu cơ chất hay liên kết bị phân cắt)

(c) Số thứ ba: chỉ phụ phụ nhóm (kiểu chất cho hay nhận điện tử, hay kiểu nhóm được vận chuyển).

(d) Số thứ tư: chỉ số thứ tự của enzyme trong phụ phụ nhóm

Thí dụ

Enzyme bromelain thân có số EC 3.4.22.32: được ly trích từ thân, rễ, lá của cây dứa.

Enzyme bromelain quả có số EC 3.4.22.33: được ly trích từ quả, vỏ.

(Nguồn: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/3422.html>)

2.2.1.3. Sự khác nhau về chất lượng enzyme và thị trường enzyme công nghiệp

Nồng độ enzyme thấp là nguyên nhân gây khó khăn trong sản xuất enzyme. Ba lĩnh vực sử dụng enzyme có mức yêu cầu về số lượng và chất lượng rất khác nhau.

Bảng 2.1 Sự khác nhau về chất lượng enzyme

	Enzyme công nghiệp	Enzyme phân tích	Enzyme dược phẩm
Lượng sử dụng	Hàng tấn	mg-g	mg-g
Độ tinh khiết	Không tinh khiết	Tinh thể tinh khiết	Tinh thể tinh khiết
Nguồn gốc	Vi sinh vật, thường ngoại bào	Vi sinh vật, động vật, thực vật, thường nội bào	Vi sinh vật, động vật, thực vật, thường nội bào
Tái sử dụng nhiều lần	Một số có khả năng	Không phát triển nhưng có khả năng	Cho đến nay chưa có khả năng
Giá sản xuất	Thấp	Trung bình	Cao

(Nguyễn Tiến Thắng, 2004)

Bảng 2.2 Thị trường enzyme công nghiệp

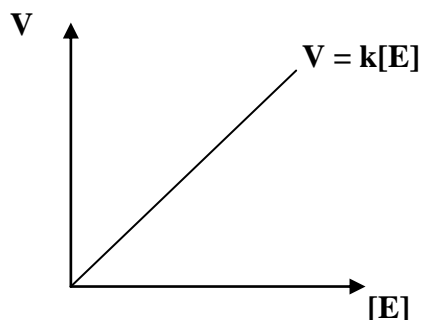
Ứng dụng	Doanh số 1996 (triệu đôla)	Doanh số ước đoán 2006 (triệu đôla)
Thực phẩm	170	214
Chất tẩy	160	414
Dệt	27	32
Da thuộc	11	13
Bột giấy	1	5
Ứng dụng khác	3	8
Tổng	372	686

(Nguồn: C.Wrotnowski, Genetic & Engineering News, pp, 14 and 30, Feb. 1. 1997.)

2.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến vận tốc phản ứng enzyme.

2.2.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme

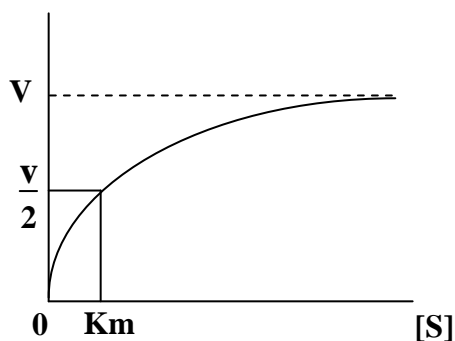
Trong điều kiện thừa cơ chất, tốc độ phản ứng phụ thuộc bậc nhất vào nồng độ enzyme. Đường biểu diễn có dạng như ở hình 2.1



Hình 2.2 Đường biểu diễn ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến tốc độ phản ứng

2.2.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất

Ở giai đoạn đầu của phản ứng, nếu nồng độ enzyme được giữ cố định và nồng độ cơ chất thay đổi, người ta nhận thấy vận tốc phản ứng tăng khi nồng độ cơ chất tăng. Khi nồng độ cơ chất tiếp tục gia tăng, đường biểu diễn uốn cong và với nồng độ cơ chất cao thì vận tốc không còn gia tăng nữa và đường biểu diễn tiệm cận với giá trị v_{\max} .



K_m : Hằng số Michalis, là nồng độ cơ chất ứng với vận tốc bằng 1/2 vận tốc v_{\max} .

Hình 2.3 Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của tốc độ phản ứng vào nồng độ cơ chất

2.2.2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ có ảnh hưởng rất lớn đến phản ứng enzyme và tốc độ phản ứng enzyme không phải lúc nào cũng tỷ lệ thuận với nhiệt độ phản ứng. Tốc độ

phản ứng chỉ tăng đến một giới hạn nhiệt độ nhất định. Vượt quá giới hạn đó, tốc độ phản ứng sẽ giảm và dẫn đến mức triệt tiêu.

Nếu đưa nhiệt độ lên cao hơn mức nhiệt độ tối ưu, hoạt tính enzyme sẽ bị giảm, khi đó enzyme không có khả năng phục hồi lại hoạt tính.

Ngược lại, ở nhiệt độ 0°C, enzyme bị hạn chế hoạt động rất mạnh, nhưng khi đưa nhiệt độ lên từ từ hoạt tính enzyme sẽ tăng dần đến mức tối ưu.

2.2.2.4. Ảnh hưởng của pH

Sự thay đổi pH gây nên :

- ♦ Sự biến đổi ion hóa của các nhóm chức năng trên chuỗi polypeptide của enzyme, do đó làm thay đổi điện tích cần thiết cho sự tạo thành phức hợp enzyme – cơ chất và sự duy trì cấu hình ba chiều nguyên thủy của chuỗi polypeptide của enzyme.
- ♦ Sự thay đổi mức độ ion hóa của cơ chất, điều này cho phép hoặc ngăn cản sự tạo thành enzyme – cơ chất trong trường hợp phản ứng đòi hỏi cơ chất phải ở dạng ion.

Như vậy, hoạt tính của enzyme phụ thuộc rõ rệt vào pH môi trường. Đó là vì pH môi trường có ảnh hưởng đến mức độ ion hóa của cơ chất, enzyme và trung tâm hoạt động của nó, phức chất enzyme – cơ chất và ảnh hưởng đến độ bền của enzyme.

Mỗi một enzyme có một pH tối ưu khác nhau, có thể rất acid (từ 1,5 -2), hoặc rất kiềm (9,5 – 10). pH tối ưu của đa số các enzyme vào khoảng chung quanh giá trị trung tính (6 – 8). Tuy nhiên pH tối ưu của một enzyme cũng không cố định mà phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như bản chất và nồng độ cơ chất, tính chất dung dịch đệm, nhiệt độ.

2.3. Enzyme Protease

Protease là enzyme thuộc nhóm *hydrolase*, xúc tác cho quá trình thủy phân liên kết peptide (-CO – NH-) của phân tử protein và peptide thành các acid amin tự do, một ít peptide ngắn, pepton.

2.3.1. Giới thiệu sơ lược các enzyme protease

2.3.1.1. Protease vi sinh vật

- ❖ Protease từ vi khuẩn: protease serine từ vi khuẩn *B.subtilis*.
- ❖ Protease serine từ nấm *Aspergillus.spp*.
- ❖ Metalloprotease (protease kim loại).
- ❖ Carboxyl protease (protease acid).
- ❖ Enzyme rennet từ vi sinh vật.

2.3.1.2. Protease động vật

Bảng 2.3 Protease động vật

Protease	pH	Chất hoạt hóa
<i>Pepsin</i>	1,5-4,0	H ⁺ , protease
<i>Chymosin</i>	5-6	Ca ²⁺
<i>Trypsin</i>	6,5-9,0	Enderkinase, Ca ²⁺
<i>Chymotrypsin</i>	7,0-8,5	Ca ²⁺
<i>Carboxypeptidase</i>	6,0-8,5	Trypsin
<i>Aminopeptidase</i>	6,5-8,0	-

(Nguyễn Tiến Thắng, 2004)

2.3.1.3. Protease thực vật

Protease thực vật tập trung chủ yếu ở một số cây vùng nhiệt đới như đu đủ, dứa, cây sung, articho và đậu tương. Tất cả protease thực vật đều cùng thuộc một nhóm enzyme chứa gốc –SH trong tâm hoạt động. Thí dụ: papain từ mủ đu đủ, bromelain từ dứa, ficin từ quả sung.

2.3.2. Ứng dụng của enzyme protease.

Trong các loại enzyme thì enzyme protease có vai trò quan trọng hơn cả vì nó thủy phân protein. Protein đóng vai trò vô cùng thiết yếu đối với đời sống con người, nó là thành phần dinh dưỡng cơ bản của người và vật nuôi, là nguồn cung cấp vật liệu như da, lông, tơ phục vụ sản xuất nhằm nâng cao chất lượng cũng như gia tăng thời gian bảo quản

Bảng 2.4 Ứng dụng protease trong công nghiệp

Sản phẩm	Ứng dụng
<i>Bia</i>	Làm tan protein hạt, làm ổn định bia.
<i>Phomat</i>	Tủa protein sữa và làm chín phomat.
<i>Làm mềm thịt</i>	Cắt một phần mô liên kết.
<i>Bánh mì</i>	Tăng độ dẻo của gluten.
<i>Bánh kẹo</i>	Tăng độ giòn.
<i>Da</i>	Loại bỏ lông, tóc, sắc tố, làm mềm da.
<i>Chất tẩy rửa</i>	Tẩy rửa vết protein.

Hiện nay chế phẩm protease thương mại một phần có nguồn gốc từ động vật và thực vật, nhưng chủ yếu là từ vi sinh vật (Nguyễn Tiến Thắng, 2004).

2.4. Enzyme bromelain thu nhận từ dứa

2.4.1. Giới thiệu Enzyme bromelain

Bromelain là nhóm protease thực vật được thu nhận từ họ *Bromelaceae*, đặc biệt là từ thân (EC 3.4.22.32) và trái dứa (EC 3.4.22.33). Ở mỗi bộ phận khác nhau thì bromelain có pH tối ưu khác nhau và cấu tạo cũng có sự khác nhau.

Bromelain có trong toàn bộ cây dứa, nhưng nhiều nhất là trong quả. Bromelain là nhóm endoprotease có khả năng phân cắt các liên kết peptide nội phân tử protein để chuyển phân tử protein thành các đoạn nhỏ gọi là các peptide (Dương Thị Hương Giang, 2005).

Thành phần chủ yếu của bromelain có chứa nhóm sulfhydryl thủy giải protein. Khi chiết tách và tinh sạch phân đoạn có chứa nhóm sulfhydryl của bromelain thì thu được một enzyme thủy phân protein hiệu quả in vitro (Nguyễn Đức Lượng, 2004).

2.4.2. Tính chất vật lí

Murachi và cộng sự năm 1964 đã nghiên cứu về tính chất vật lý của enzyme bromelain trích từ thân cây dứa và thấy như sau:

- Trọng lượng phân tử: 33.200 - 33.500 Da
- Hằng số sa lắng: 2,73 S

- Thể tích riêng phần: 0,743 ml/g
- Hằng số khuếch tán: 7,77-10 cm.sec
- Độ nhớt bên trong: 0,039 dl/gam
- Tỷ số ma sát f/f_0 : 1,26
- Điểm đẳng điện pI : 9,55
- Sự hấp thụ Al %cm: 20,1^a cm

Bromelain trích từ quả là protease acid với điểm đẳng điện pI: 4,6

(Murachi, 1964; trích dẫn bởi Nguyễn Đức Lượng)

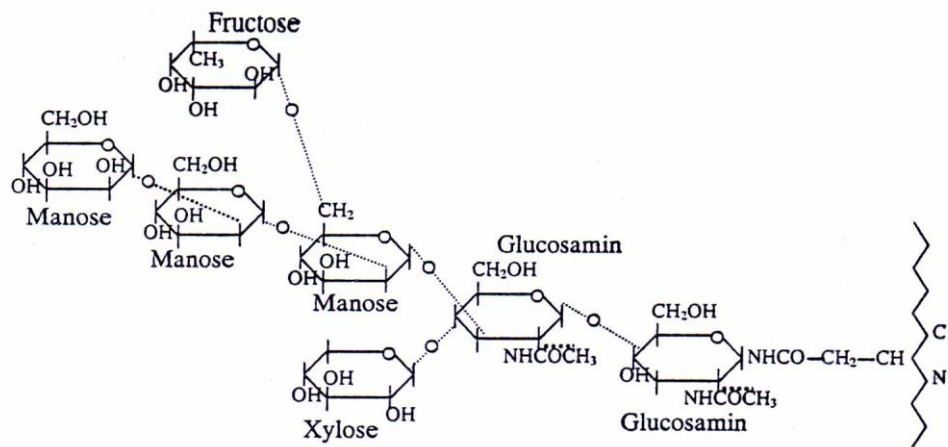
Alfonso và cộng sự 1994 qua nghiên cứu thực nghiệm đã cho rằng bromelain thân có trọng lượng phân tử 25.400 kD.

2.4.3. Tính chất hóa học

2.4.3.1. Cấu tạo hóa học

Bromelain thân là glycoproteinbase gồm phần protein và phần phi protein. Phần phi protein là một glucide, ở mỗi phân tử gồm 3 manose, 1 xylose, 1 fructose và 2 glucosamine. Glucosamine là phần nối trực tiếp với mạch polipeptide của phần protein. Sợi hydrate carbon liên kết hoán vị với polypeptide. Trong sợi hydrate carbon này dường như một nửa sợi không liên quan đến cơ chế xúc tác của phân tử.

Cấu trúc phần hydrate carbon của bromelain thân (Yasuda và ctv,1970):



Hình 2.4 Cấu trúc phần hydrate carbon của bromelain thân

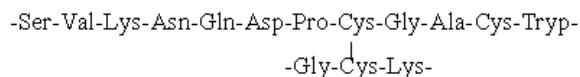
Tùy từng phương pháp thu nhận và phương pháp thí nghiệm, thành phần bromelain thân và quả khác nhau. Bromelain quả (ép từ quả) là protease acid với điểm đẳng điện là 4,6; cấu tạo hơi khác so với loại enzyme trên.

Bromelain thân có thành phần acid amin thay đổi trong khoảng 321-144 acid amin và 283-161 đối với bromelain quả.

Các nghiên cứu ghi nhận, polypeptide của bromelain thân có acid amin đầu $-NH_2$ là valine và đầu carboxyl là glycine; còn đối với bromelain quả, acid amin đầu $-NH_2$ là alanine. (Nguyễn Đức Lượng, 2004)

2.4.3.2. Cấu trúc không gian

Cấu trúc bậc một của bromelain theo Murachi và Bussain:



Bromelain cũng như papain, ficin đều là các protease có tâm hoạt động chứa cystein với cầu nối $-S-S-$ (disulfur) giữa 2 sợi polypeptide với nhau.

Tâm hoạt động $-Cys$ đặt cách nhóm imidazole của histidine là $5A^\circ$.

Chuỗi phân tử gấp nếp phức tạp thành dạng hình cầu.

Bromelain có một nhóm sulfhydryl cần cho hoạt tính xúc tác với 5 cầu nối disulfid ở mỗi phân tử. Ngoài ra trong bromelain thân còn có sự hiện diện của Zn^{2+} với hàm lượng 2 mg/gram enzyme có lẽ đóng vai trò duy trì cấu trúc không gian của enzyme (Nguồn: Yasuda và ctv, 1970).

2.4.4. Hoạt tính của bromelain

Thịt quả dứa chỉ có hoạt tính bromelain kể từ 3 tháng trước khi chín. Trong đó hoạt tính cao nhất là khoảng 20 ngày trước khi chín. Khi trái chín, hoạt tính bromelain giảm xuống nhưng không mất hẳn.

Một số nghiên cứu cho thấy bromelain có hoạt tính khác nhau trên những cơ chất khác nhau. Nếu cơ chất là hemoglobin thì khả năng phân giải của bromelain mạnh hơn papain gấp 4 lần, còn cơ chất là casein thì khả năng phân giải của hai enzyme này tương đương nhau. Đối với các cơ chất tổng hợp thì khả năng phân giải của bromelain yếu hơn papain.

Bromelain có 3 hoạt tính khác nhau: *peptidase*, *amidase* và *esterase*, hoạt tính *esterase* ở bromelain hơn papain và ficin (Nguyễn Đức Lượng, 2004).

2.4.4.1. Cơ chế tác động

Hầu hết các tác giả đều thừa nhận vai trò của nhóm –SH của cystein, nhóm imidazole của histidine và nhóm disulfur trong hoạt động thủy phân của bromelain.

Nhóm –SH tham gia tạo thành acyl-thioester trung gian với nhóm carboxyl của cơ chất (nơi các liên kết peptide bị cắt).

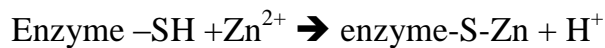
Nhóm imidazole làm chất trung gian nhận gốc acid và chuyển cho nhóm anion của chất nhận khác.

Cầu nối S-S có vai trò duy trì cấu trúc không gian của bromelain.

Casein và hemoglobin là 2 cơ chất tự nhiên được dùng nhiều nhất.

Đầu tiên, bromelain kết hợp với protein và thủy phân sơ bộ cho ra polypeptide và acid amin. Protein kết hợp với nhóm –SH của enzyme khiến nó bị ester hóa rồi nhóm imidazole sẽ khử ester để giải phóng enzyme, acid amin và peptide.

Ở giai đoạn đầu, Zn^{2+} rất quan trọng, chúng kết hợp với nhóm –SH của tâm hoạt động hình thành mercaptid phân ly yếu (nhưng vẫn còn khả năng tạo liên kết phối trí bổ sung với các nhóm chức năng khác của phân tử protein như amin, carboxyl...)



Do vậy nhóm –SH trong tâm hoạt động đã bị ester hóa bởi cơ chất, cấu trúc không gian được bảo vệ ổn định.

2.4.4.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính

Giống như các cấu trúc xúc tác sinh học khác, bromelain cũng bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như: cơ chất, nồng độ cơ chất, nồng độ enzyme, nhiệt độ, pH, ion kim loại, một số nhóm chức, phương pháp ly trích, phương pháp tinh sạch.

Các yếu tố nhiệt độ, pH thích hợp cho hoạt động của các phản ứng xúc tác của bromelain không ổn định mà phụ thuộc lẫn nhau và phụ thuộc vào các yếu tố khác như: bản chất cơ chất, nồng độ cơ chất, nồng độ enzyme, sự có mặt của chất hoạt hóa, thời gian phản ứng.

❖ Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ của phản ứng xúc tác chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố: thời gian tác dụng càng dài thì nhiệt độ sẽ có những thay đổi làm ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme, nồng độ enzyme, nồng độ cơ chất, dạng tồn tại của enzyme.

Ở dịch chiết quả (pH 3,5) khi tăng nhiệt độ lên đến 60°C thì bromelain vẫn còn hoạt tính nhưng bromelain tinh khiết nhạy cảm với nhiệt độ. Ở 5°C, pH 4-10 thì enzyme giữ hoạt tính tối đa trên casein trong vòng 24 giờ. Ở 55°C, pH 6.1 thì enzyme bị mất 50% hoạt tính trong vòng 20 phút (Nguyễn Đức Lượng, 2004).

❖ Ảnh hưởng của pH

pH là yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến hoạt tính xúc tác của enzyme. pH thích hợp nhất đối với bromelain không ổn định, mà phụ thuộc vào bản chất và nồng độ cơ chất, độ tinh sạch của enzyme, nhiệt độ và bản chất của dung dịch đệm, sự có mặt của chất tăng hoạt cũng như thời gian phản ứng.

Biên độ pH khá rộng từ 3-10 nhưng pH tối ưu trong khoảng 5-8 tùy cơ chất: gelatin: 5-6, casein: 7-8 (Nguyễn Đức Lượng, 2002).

❖ Ảnh hưởng của kim loại và một số chất khác

Các ion kim loại thường gắn với phân tử protein tại các trung tâm hoạt động, do đó ảnh hưởng đến hoạt tính xúc tác của enzyme.

Vì bromelain thuộc nhóm protease cystein, trung tâm hoạt động có nhóm -SH đều là hoạt chất hoạt hóa cho bromelain. Ví dụ: KCN, thioglycolic acid, cystein, sulfid, cyanit...

Bromelain bị ức chế bởi những ion hoạt hợp chất có ái lực mạnh hơn nhóm $-SH$, các tác nhân oxi hóa, halogen hóa, ankyl hóa,..như: iodoacetate, bromoacetate, H_2O_2 , methyl bromur...

Các ion kim loại như: Fe, Cu, Ag, Sb, Zn có xúc tác làm ổn định cấu trúc phân tử bromelain.

Theo Murachi, thì khi không có chất hoạt hóa, bromelain chỉ phát huy được 60-70 % hoạt tính tối đa trên casein và enzyme có hoạt tính tối đa khi có sự hiện diện 0,005 M cystein.

2.4.4.3. Các chất bảo vệ enzyme

Tác nhân bảo vệ có vai trò quan trọng trong quá trình đông khô. Một chất bảo vệ tốt phải bảo vệ tế bào ở nhiệt độ thấp trong suốt quá trình lạnh đông, dễ làm khô và tạo hỗn hợp ổn định, dễ hòa tan lại vào nước. Nhiều nhóm chức đã được kiểm tra về khả năng bảo vệ của chúng: polyol, polysaccharide, disaccharide, amino acid, protein, muối, vitamin, khoáng, acid hữu cơ. Tuy nhiên khả năng bảo vệ của từng nhóm chức thay đổi đối với từng loại phân tử sinh học. Có 4 nhóm ngăn chặn tác hại của quá trình đông khô đã được nghiên cứu, kiểm tra:

- Đường: trehalose, lactose, maltose, sucrose, fructose, glucose bổ sung với tỉ lệ 10 %.
- Acid amin: natri glutamate (2.5%), dịch trích nấm men (4%).
- Polyol: sorbitol (5%), mannitol (5%).
- Dung dịch đệm phosphate.

Đường tái sắp xếp cấu trúc của nước trong phân tử protein khi hòa tan lại vào nước và ngăn cản sự uốn cong, hợp nhất bằng cầu nối hydro giữa các gốc phân cực của protein.

Acid amin bảo vệ bằng cách phản ứng với nhóm carboxyl của protein và nhóm amin của tác nhân bảo vệ nhờ đó mà nó ổn định cấu trúc của protein. cystein ngăn cản sự oxi hoá nhóm $-SH$ thành cầu nối $-S-S-$

Polyol làm cho dung dịch chứa chúng nhanh chóng bị kết tinh trong quá trình đông khô nhờ vậy có thể bảo vệ được các phân tử sinh học (Nguyễn Đức Lượng, 2002).

2.4.5. Ứng dụng của bromelain

❖ Trong công nghiệp thực phẩm

- Sử dụng enzyme bromelain trong lên men nước mắm ngắn ngày (Beddows và Ardeshir, 1979, Salem và ctv., 1995)
- Làm mềm thịt (Melendo và ctv., 1996; Melendo và ctv., 1996)

❖ Trong y dược học

- Ngăn ngừa bệnh tiêu chảy ở heo con (Mynott và ctv., 1996; Chandler và Mynott, 1998)
- Trợ tiêu hóa (Nielsen và ctv., 1991)
- Điều trị các bệnh nhiễm trùng (Jayaran và ctv., 1991; Tanabe và ctv., 1996; Kelly, 1996; Maurer, 2001; Anthony và Cichoke, 1998)

2.4.6. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước về enzyme Protease (chủ yếu là enzyme bromelain)

2.4.6.1. Nghiên cứu trong nước

Ở nước ta có nhiều công trình công bố về việc nghiên cứu sử dụng enzyme bromelain, các công trình công bố tập trung trong các lĩnh vực tách chiết, tinh sạch và khả năng ứng dụng của enzyme này. Một số công trình nghiên cứu về enzyme bromelain như:

Phạm Thị Trân Châu và ctv (1987) nghiên cứu một số tính chất của enzyme bromelain tách từ chồi dừa tây cho thấy trong chồi dừa có chứa hai protease và bromelain có hoạt tính cực đại ở pH 6,5, nhiệt độ tối ưu là 60°C.

Lê Thị Thanh Mai (1997) nghiên cứu các phương pháp tinh sạch và ứng dụng bromelain cho thấy có thể thu nhận bromelain theo phương pháp kết tủa bằng aceton hay cô đặc theo phương pháp siêu lọc rồi kết tủa bằng aceton, cũng như có thể tinh sạch bromelin bằng phương pháp lọc gel sephadex G75

với hiệu suất cao. Nghiên cứu này còn cho thấy có thể sử dụng bromelain để rút ngắn thời gian chế biến nước mắm.

Dương Thị Hương Giang và Lê Thanh Hùng (2002) nghiên cứu các điều kiện nhằm ổn định phương pháp tinh sạch bromelain từ nước khóm thô cho thấy có thể thu nhận và tinh sạch bromelin bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên cột SP-Streamline với hiệu suất cao.

Dương Thị Hương Giang và ctv (2005) nghiên cứu tinh sạch Bromelin từ phụ phẩm vỏ dứa cho thấy có thể tinh sạch bromelain bằng phương pháp sắc ký gel mở rộng với hệ thống cột Streamline 50 và gel trao đổi ion âm SP-Streamline XL (Pharmacia) với hiệu suất cao.

2.4.6.2. Nghiên cứu ngoài nước

Corvisat (1857) chiết tách trypsin từ dịch tụy, đây là protease đầu tiên được thu nhận nhưng chưa tinh sạch.

Danivevski (1862) chiết tách trypsin, amylase tụy tạng bằng phương pháp hấp phụ. Nghiên cứu này có ý nghĩa quan trọng trong chiết tách và nghiên cứu các tính chất của enzyme cũng như protein. Tiếp theo đó là Hommarsten (1872) chiết tách được Chymosin. Wurtz (1879) chiết tách được papain, Crassman và Ambros (1926) chiết tách được bromelain...

Theo Salem và ctv (1995) đã sử dụng tỷ lệ là 0.3% enzyme so với cá gồm papain, trypsin, ficin và bromelain thêm vào cùng với 25% muối ngay từ lúc đầu của quá trình sản xuất nước mắm trên năm loại cá (sardine, macaroni, bolti, bourri và shark). Kết quả cho thấy với 0.3% papain cho hàm lượng đạm tổng số cao nhất so với các enzyme còn lại trên mẫu cá mòi (sardine) sau 180 ngày lên men và cao hơn so với mẫu đối chứng lên men cổ truyền là 30%.

Liang và ctv (1999) nghiên cứu hoạt tính của bromelain sau khi bổ sung polyphenol trà trích ly từ trà xanh của Trung Quốc cho thấy tính bền nhiệt của bromelain được tăng lên.

Nielsen (2001) nghiên cứu cải tiến phương pháp xác định mức độ thủy phân protein cho kết quả nhanh chóng và chính xác.

Stein (2004) sử dụng enzyme protease nội sinh thủy phân nội tạng cá tuyết Đại Tây Dương cho hiệu suất thủy phân khá cao.

2.5. Các kỹ thuật cơ bản trong quá trình tinh sạch protein/enzyme

2.5.1. Chuẩn bị dịch protein thô

Sau khi lựa chọn được nguồn cung cấp protein việc tiếp theo là phải đưa protein về dạng dịch. Có nhiều phương pháp: phá tế bào bằng áp suất thẩm thấu, nghiền bằng thiết bị trung tính, nghiền tay, phá tế bào bằng siêu âm. Các phương pháp kể trên thích hợp để xử lý các mô mềm, mô động vật, thực vật. Đối với vi khuẩn có vỏ bảo vệ chắc chắn thì tốt nhất là nghiền bằng cối thủy tinh có thêm vật liệu chà xát như cát hay bột nhôm, hoặc xử lý với lysozyme (enzyme phá vách tế bào). Đối với những loại tế bào có vách bảo vệ rất chắc như nấm men trong một số trường hợp phải sử dụng máy ép tạo áp suất cao để phá vỡ tế bào. Một số trường hợp có thể sử dụng máy nghiền để phá mẫu.

2.5.2. Ổn định protein trong dịch chiết thô.

Sau khi giải phóng khỏi vách tế bào, protein bắt đầu chịu tác động phá hoại của nhiều yếu tố khác nhau. Do vậy việc đầu tiên là phải tạo điều kiện ổn định cho protein. Sự ổn định của protein phụ thuộc vào độ phân cực hay lực ion, pH, sự có mặt hay vắng mặt của ion kim loại, sự oxy hóa, protease nội bào và nhiệt độ. Thông dụng nhất là sử dụng giá trị pH sinh lý hoặc đệm Tris và phosphate. Các ion Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} thường làm tăng sự ổn định của protein, trong khi các ion kim loại nặng Ag, Cu, Pb, Hg thường làm biến tính protein, đặc biệt protein chứa nhóm -SH. Để tránh nhiễm bẩn bởi ion kim loại nặng, nên chuẩn bị đệm từ hóa chất sạch trong dụng cụ thủy tinh hoặc dùng tác nhân EDTA 10^{-4} M bổ sung vào đệm. Để giảm thiểu tác động của quá trình oxy hóa (đặc biệt với các phân tử protein chứa nhóm -SH) cần bổ sung thêm mercaptoethanol, cystein và dithiothreitol 10^{-3} M vào đệm. Để giảm thiểu tác động của protease nội bào cùng giải phóng cần bổ sung chất ức chế protease như phenyl methyl sulfonyl flouride. Tốt nhất là dịch thô được bảo quản ở nhiệt độ thấp.

2.5.3. Các phương pháp tủa protein.

Có 5 phương pháp lắng tủa protein: tủa bằng muối, lắng tủa bằng dung môi hữu cơ, lắng tủa điểm đẳng điện, lắng tủa bằng polymer không mang điện và lắng tủa bằng các chất đa điện phân

2.5.3.1. Tủa bằng muối Sulfate ở các nồng độ khác nhau.

Để tinh sạch protein ở mức độ phòng thí nghiệm, tủa bằng amonium sulfate thường được sử dụng bước đầu trong quy trình tách chiết và tinh sạch protein. Ở các nồng độ muối cao protein sẽ tủa khỏi dung dịch mà không bị biến tính.

Khi cho thêm muối vào protein, các phân tử muối sẽ phân ly thành các ion, chính các ion này bắt lấy các phân tử nước khỏi protein, do vậy các phân tử protein có khuynh hướng liên kết với nhau và bắt đầu tập hợp lại. Khi đủ một lượng muối vào thì protein sẽ bắt đầu tủa. Nếu quá trình này được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ lạnh thì protein sẽ tủa mà không bị biến tính. Sau đó thu tủa protein bằng cách ly tâm và hòa tan trở lại trong dung dịch đệm có nồng độ muối thấp. Dung dịch lúc này vẫn chứa nhiều muối còn lại trong tủa. Có nhiều phương pháp để rửa muối khỏi protein nhưng người ta thường loại muối bằng phương pháp thẩm tích hay phương pháp lọc gel. Dung dịch sau khi rửa sạch muối được giữ để sử dụng cho các quá trình tinh sạch và phân tích tiếp theo. (Dương Thị Hương Giang, 2004)

2.5.3.2. Tủa bằng dung môi hữu cơ

Các dung môi hữu cơ như: acetone, isopropanol, ethanol (được dùng nhiều nhất). Ưu điểm của phương pháp là cho kết quả tủa tốt hơn so với tủa bằng muối, không cần loại muối trước khi chạy sắc ký, cách tiến hành đơn giản. Nhưng khi tủa bằng dung môi hữu cơ phải thực hiện trong điều kiện lạnh vì nếu tủa ở nhiệt độ thường sẽ làm biến tính protein, lượng dung môi cần dùng tương đối nhiều.

2.5.3.3. Tủa bằng điểm đẳng điện

Tại điểm đẳng điện, protein bị mất điện tích nên gây tủa. Phương pháp này cho kết quả rất cao, tuy nhiên cách tiến hành phức tạp và thường phải kết hợp với phương pháp tủa bằng dung môi hữu cơ.

2.5.3.4. Tủa bằng các loại polymer

Bao gồm: polyacrylic acid, polysaccharide, polyphosphate. Ưu điểm của phương pháp là có thể tiến hành ở nhiệt độ thường, dễ thu hồi polymer, hiệu suất tạo kết tủa cao. Chi phí cho phương pháp này cao.

2.5.3.5. Tủa bằng chất đa điện phân

Thường dùng polyethylene glycol có phân tử lượng 6.000 và 20.000. Có thể sử dụng với lượng chất này rất nhỏ, hiệu suất tạo kết tủa cao. Nhược điểm của phương pháp là rất đắt tiền và dễ gây biến tính protein (Nguyễn Tiến Thắng, 2004).

2.6. Tinh sạch protein

Sau khi nhận được dịch tủa protein, công việc tiếp theo sẽ là chiết tách, tinh sạch để nhận được các phân đoạn protein khác nhau.

2.6.1. Tại sao cần tinh sạch enzyme?

Nếu chúng ta muốn hiểu rõ về hoạt động của enzyme trong một phức hệ, (thí dụ như trong các bào quan như ty thể, hay trong tế bào hoặc trong toàn bộ cơ thể), trước hết chúng ta cần phải hiểu rõ hoạt động của enzyme này trong một môi trường càng đơn giản càng tốt, môi trường đơn giản nhất là môi trường dung dịch đệm có enzyme, các ion kim loại, các cofactor... Tuy nhiên trong một số trường hợp, như các enzyme trên màng tế bào, khi được tinh sạch enzyme có thể bị bất hoạt do không có các phospholipid hay các chất tẩy (detergent), và như vậy môi trường đơn giản cần phải thêm vào các chất này.

Nghiên cứu các đặc điểm của enzyme tinh sạch cho phép ta hiểu thêm về tính đặc hiệu của enzyme đối với cơ chất, các thông số về động học của phản ứng enzyme, và nếu có thể cả cơ chế điều hòa phản ứng. Tất cả những thông tin này sẽ

giúp ta nắm rõ hơn vai trò của enzyme trong phức hệ. Hơn nữa, enzyme còn ẩn chứa một số câu hỏi về cấu trúc của các đại phân tử và cơ chế của sự xúc tác.

Nghiên cứu cụ thể về các vấn đề này chỉ có thể trong trường hợp enzyme đã được tinh sạch hoàn toàn nghĩa là đã loại bỏ các enzyme tạp và các đại phân tử khác.

Các enzyme tinh sạch có giá trị cao trong y dược và trong công nghiệp.

2.6.2. Mục tiêu và chiến lược tinh sạch enzyme

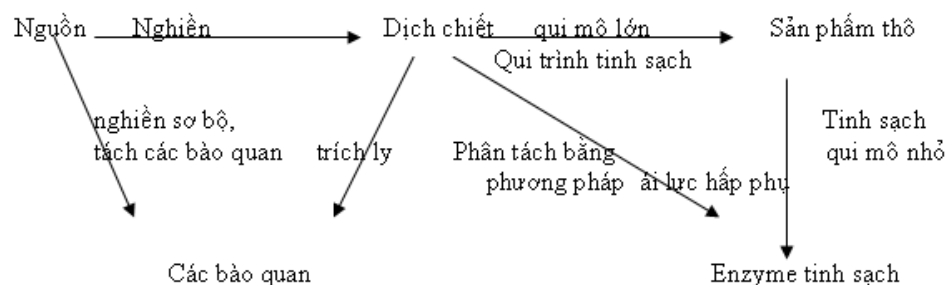
2.6.2.1. Mục tiêu

Mục tiêu của qui trình tinh sạch là nhằm thu được một lượng enzyme tối đa dựa trên lượng hoạt tính thu được so với hoạt tính tổng của enzyme trong dịch chiết ban đầu. Hơn nữa sản phẩm enzyme nhận được cũng phải đạt hoạt tính tối đa, có nghĩa là enzyme không bị mất hoạt tính trong quá trình bảo quản, không bị phân giải, và độ tinh sạch cũng phải đạt tối đa, nghĩa là không có sự hiện diện của các enzyme hay các đại phân tử sinh học khác.

Không có cách nào để dự đoán hoạt tính của một enzyme đã được tinh sạch trong một số điều kiện nhất định nào đó, vì vậy quá trình tinh sạch được tiến hành cho đến khi nào hoạt tính đặc hiệu của enzyme (Unit/mg) tăng đến một giá trị không đổi sau một vài công đoạn của qui trình tinh sạch.

2.6.2.2. Chiến lược tinh sạch enzyme

Chiến lược chung cho quá trình tinh sạch enzyme có thể được biểu diễn qua sơ đồ sau:



Sơ đồ 2.1 Chiến lược chung cho quá trình tinh sạch enzyme

Trong sơ đồ tổng quát này, qui trình tinh sạch cho một enzyme nào đó bao gồm: (a) Nguồn enzyme, (b) Phương pháp nghiền và (c) Phương pháp tinh sạch.

(Nguồn: [www.bio-rad.com/life-science-research /chromatography](http://www.bio-rad.com/life-science-research/chromatography))

2.6.3. Giới thiệu các phương pháp phân tách cơ bản trong tinh sạch enzyme

Bảng 2.5. Các phương pháp phân tách cơ bản trong tinh sạch enzyme

Đặc tính	Phương pháp	Qui mô
Kích thước hay khối lượng	<ul style="list-style-type: none"> – Ly tâm – Sắc ký lọc gel – Thẩm tích, siêu ly tâm 	<ul style="list-style-type: none"> – Lớn và nhỏ – Nhỏ – Nhỏ
Độ phân cực (a) Điện tích (b) Tính kỵ nước	<ul style="list-style-type: none"> – Sắc ký trao đổi ion – Sắc ký tập trung – Điện di – Điện di đẳng điện – Sắc ký tương tác kỵ nước 	<ul style="list-style-type: none"> – Lớn và nhỏ – Nhỏ – Nhỏ – Nhỏ – Nhỏ
Tính tan	<ul style="list-style-type: none"> – Thay đổi pH – Thay đổi lực ion – Thay đổi hằng số điện môi 	<ul style="list-style-type: none"> – Lớn – Lớn và nhỏ – Lớn
Tâm bám đặc hiệu hay Các tương tác cấu trúc đặc hiệu	<ul style="list-style-type: none"> – Sắc ký ái lực hấp phụ – Sắc ký với ion kim loại cố định trên giá thể – Giải ái lực hấp phụ – Sắc ký ái lực hấp phụ với các chất nhuộm màu. – Hấp phụ miễn dịch – Sắc ký đồng hóa trị 	

(Nguồn: [www.bio-rad.com/life-science-research /chromatography](http://www.bio-rad.com/life-science-research/chromatography))

2.6.4. Sự lựa chọn phương pháp tinh sạch protein

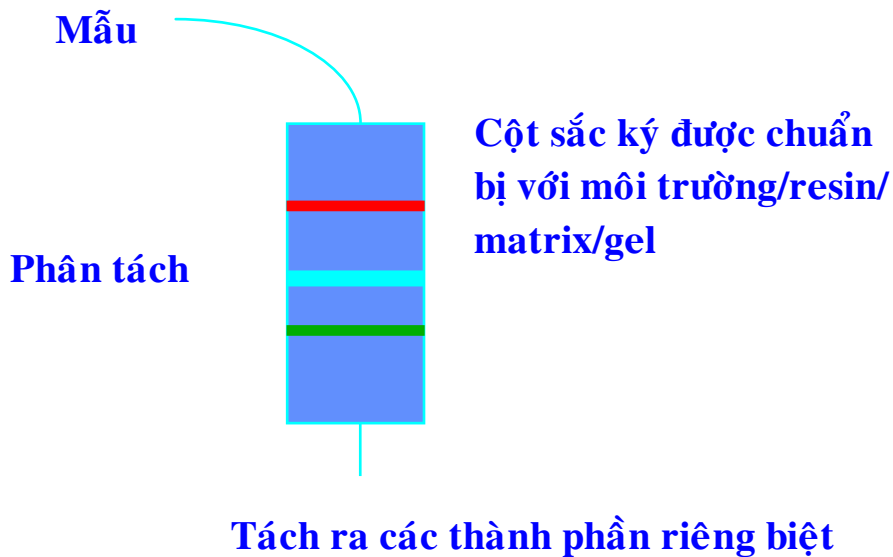
Sau khi đánh giá về những ưu và khuyết điểm của các phương pháp tinh sạch khác nhau, cần phải xác định một số yếu tố cơ bản ảnh hưởng đến các phương pháp tinh sạch và trình tự của các phương pháp này trong qui trình tinh sạch. Trong thực tế cần phải nhấn mạnh rằng rất ít khi chỉ cần một hay phối hợp của hai phương pháp mà có thể tinh sạch được enzyme. Qui trình tinh sạch cụ thể phụ thuộc vào nhiều yếu tố: (i) qui mô và hiệu suất tinh sạch, (ii) thời gian cần thiết cho quá trình tinh sạch, (iii) trang thiết bị hiện có.

Ngày nay, chưa có một phương pháp chuẩn nào thực sự có hiệu quả trong việc làm sạch enzyme. Do đó, việc làm sạch enzyme thật sự chỉ có hiệu quả khi ta biết lựa chọn các phương pháp riêng kết hợp với nhau, tạo ra phương pháp nối tiếp nhau một cách hài hòa nhất (Nguồn: Bio-Rad).

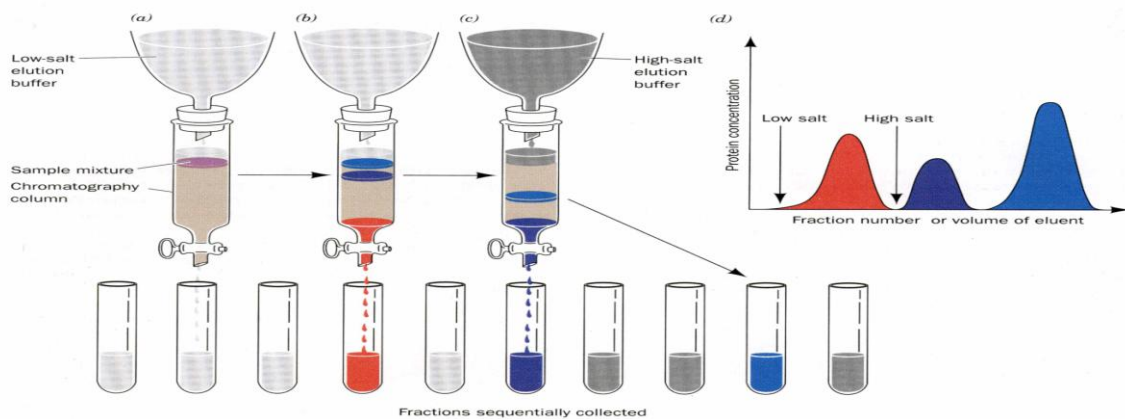
2.7. Giới thiệu phương pháp sắc ký sinh Học

Phương pháp sắc ký sinh học thường được dùng để tinh sạch enzyme, bởi vì chúng “nhẹ nhàng” để thực hiện với các phân tử sinh học và duy trì hoạt tính của chúng.

Chromatography



Hình 2.5 Nguyên tắc cơ bản của phương pháp sắc ký sinh học



Hình 2.6 Các quá trình cơ bản của phương pháp sắc ký sinh học

2.7.1. Các kỹ thuật sắc ký sinh học cơ bản

Ion Exchange (IEX) – Trao đổi ion

- Dựa trên điện tích, Có thể sử dụng bất kỳ lúc nào trong suốt quy trình, giữ lại tại giai đoạn đầu, phân đoạn, tinh sạch sau cùng

Size Exclusion (SEC) – Lọc gel

- Dựa trên kích thước, dùng để phân đoạn, loại muối, trao đổi buffer, tinh sạch sau cùng.

Ceramic Hydroxyapatite (CHT)

- Cơ chế duy nhất, cũng như trao đổi ion, có thể dùng bất kỳ lúc nào.

Hydrophobic Interaction (HIC) – Tương tác kỵ nước

- Dựa trên tính kỵ nước, tương tự như CHT và IEX

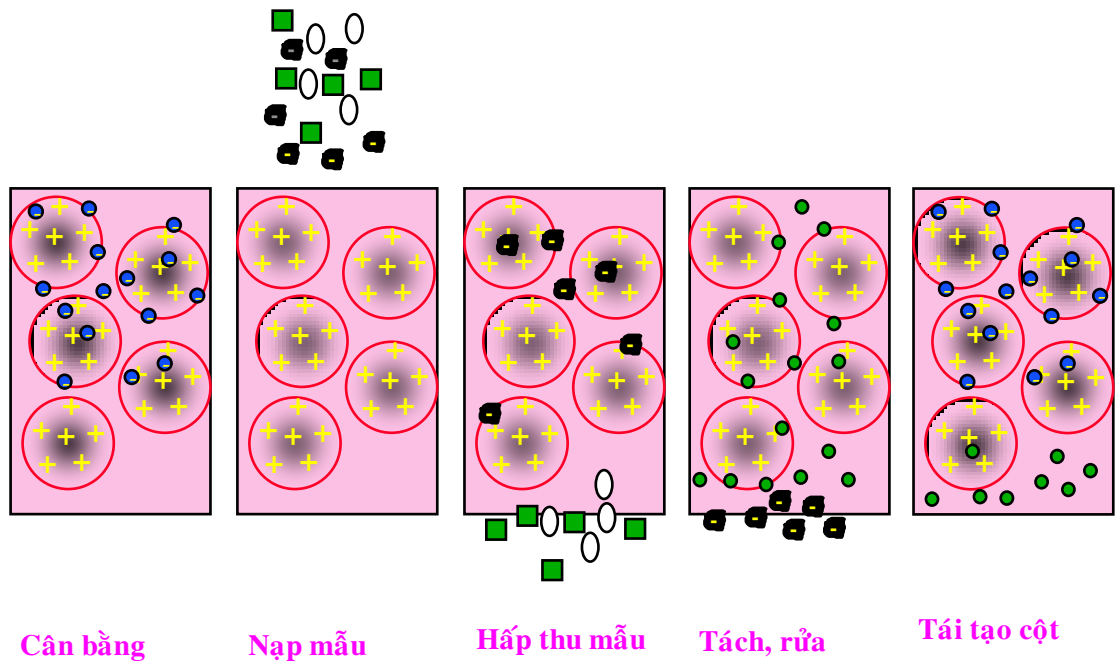
Affinity (AC) – Ái lực

- Dựa trên các tương tác sinh học, thường sử dụng ở các giai đoạn sau vì đắt tiền, nhưng hầu hết mọi người thích sử dụng ở các giai đoạn trước của quá trình tinh sạch.

2.7.2. Sắc ký trao đổi ion

2.7.2.1. Khái niệm

- **Sắc ký trao đổi ion:** là một dạng của sắc ký hấp phụ với bản chất tương tác chủ yếu giữa pha động và pha tĩnh là lọc trao đổi ion. Các bước trong sắc ký trao đổi ion được diễn tả như sau:



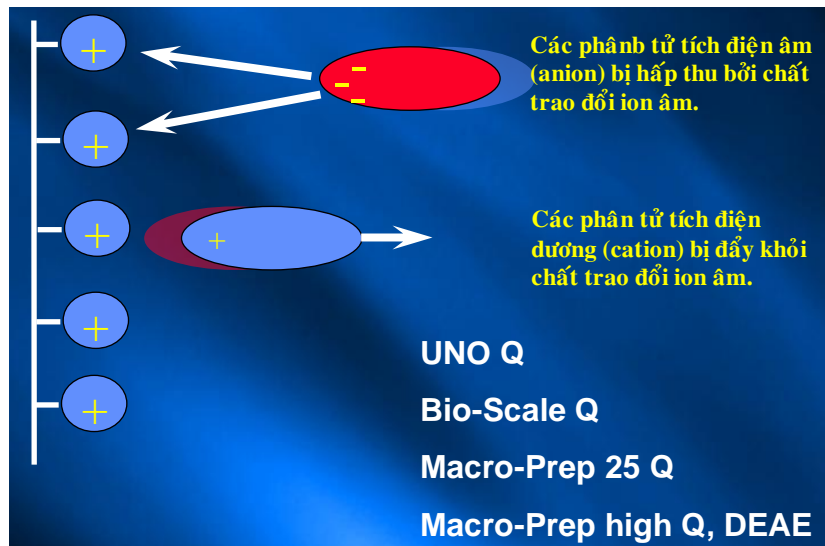
Hình 2.7 Mô tả nguyên lý của quá trình sắc ký trao đổi ion

– Các protein là các ion lưỡng tính do vậy tùy vào pH của môi trường có thể tích điện âm hay dương, dựa vào đặc điểm này sắc ký trao đổi ion có thể được áp dụng để tinh sạch protein. Trên hệ sắc ký pha tĩnh là gel trao đổi ion, có hai loại: gel trao đổi ion âm (các chất có các nhóm mang điện tích âm sẽ tương tác với gel mang điện tích dương) và gel trao đổi ion dương (các chất có các nhóm mang điện tích dương sẽ tương tác với gel mang điện tích âm). Các phân tử protein trong dung dịch sẽ liên kết trao đổi ion thuận nghịch với giá thể, protein không bám sẽ ra trước trong dung dịch đậm còn các protein có liên kết ion sẽ bám lại trên giá thể. Sau đó chúng sẽ được rửa giải bằng dung dịch đậm với các gradient nồng độ muối hoặc gradient pH tăng dần. Tùy theo mức độ tích điện của protein tức là sự tương tác mạnh hay yếu giữa protein và giá thể mà protein được đẩy ra trước hay sau trong quá trình rửa giải. Các protein có điện tích cao sẽ được đẩy ra sau.

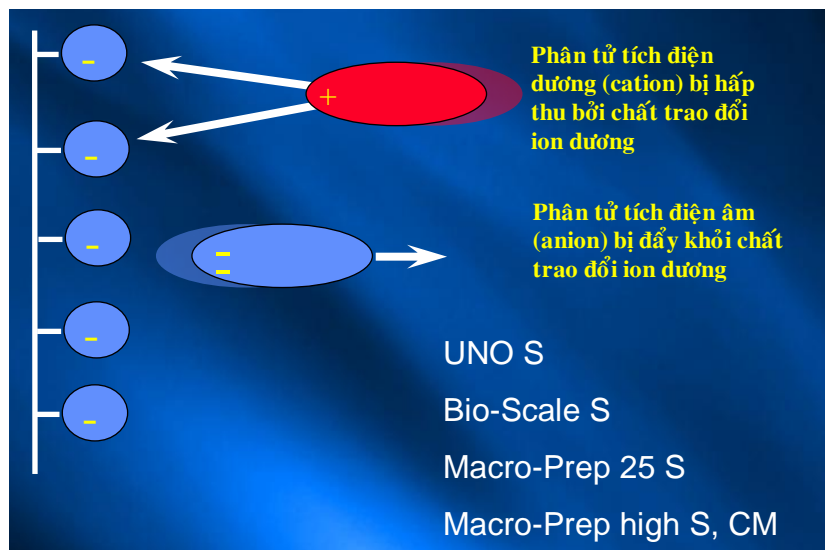
(Nguồn: Bio-Rad)

2.7.2.2. Chọn chất trao đổi ion

– Trước khi tiến hành chọn chất hấp phụ trao đổi ion người ta phải có thông tin tổng quát về thành phần mẫu cần phân tách. Để phân tách mẫu chứa các phân tử nhỏ như amino acid, lipid, carbohydrate hay chất sắc tố, người ta thường sử dụng nhựa trao đổi ion trên nền polystyrene có độ liên kết ngang cao vì các phân tử nhỏ có thể chui vào bên trong hạt. Để tách các phân tử lớn như peptide, protein, nucleic acid, polysaccharide..người ta thường sử dụng chất trao đổi ion dạng sợi ít chứa liên kết ngang (dextran và acrylic) cho phép phân tử có kích thước lớn dễ dàng trao đổi ion với chất hấp phụ trao đổi ion.



Hình 2.8 Cơ chế tương tác của chất trao đổi ion âm



Hình 2.9 Cơ chế tương tác của chất trao đổi ion dương

- Các loại nhựa trao đổi ion.

Bảng 2.6 Các loại nhựa trao đổi ion

Loại trao đổi ion	Nhóm chức năng	Tên thường gọi
Weak cation exchanger	Carboxymethyl	CM cellulose/sephadex
Strong cation exchanger	Sulfopropyl	SP sephadex
Weak anion exchanger	Diethylaminoethyl	DE cellulose/sephadex
Strong anion exchanger	Quaternary amine	QAE sephadex

- Sau khi chọn được chất trao đổi ion, người ta phải chọn chất trao đổi cation hay anion, điều này phụ thuộc vào các ion có mặt trong phân tử mẫu cần phân tách ở điều kiện tiến hành thực nghiệm. Nếu dịch mẫu chỉ chứa một loại ion thì vấn đề rất đơn giản vì dịch mẫu chứa điện dương, ta chọn chất trao đổi cation và ngược lại. Tuy nhiên, trong thực tế phân tử sinh học luôn chứa các ion khác nhau (cả ion âm và dương) và tổng điện tích của chúng phụ thuộc chủ yếu vào pH của dịch mẫu. Do vậy việc lựa chọn chất trao đổi ion phải theo giá trị pH mà ở đó hoạt tính của mẫu được ổn định nhất.



Hình 2.10 Yếu tố ảnh hưởng pH trên mạng lưới trao đổi protein (đường cong chuẩn độ protein)

- Theo kinh nghiệm người ta có thể lựa chọn chất trao đổi ion bằng phương pháp loại trừ như sau : cho vào các ống nghiệm các loại nhựa trao đổi ion khác nhau (mỗi ống một loại), cho một ít mẫu phân tách vào. Sau đó ly

tâm hoặc để lắng, tiến hành xác định chất còn lại trong dịch cặn (tủa). Nếu dịch cặn chứa ít chất nói trên, thì nhựa trong ống nghiệm đó là thích hợp. Cũng bằng cách như trên nhưng với dịch đệm bổ sung chứa chất cần phân tách theo chiều gradient tăng người ta cũng có thể xác định được điều kiện tách cần thiết.

– Sự lựa chọn chất trao đổi ion phụ thuộc vào điểm đẳng điện (pI) của protein quan tâm. pI là giá trị pH mà ở đó điện tích âm cân bằng với điện tích dương của protein. Thông thường: $\text{pH} > \text{pI}$ thì dùng trao đổi ion âm; $\text{pH} < \text{pI}$ thì dùng trao đổi ion dương.

Bảng 2.7 Chọn chất trao đổi ion.

Điểm đẳng điện	Ion	pH dung dịch đệm
8.5	Cation	≤ 7.0
7.0	Cation	≤ 6.0
	Anion	≥ 8.0
5.5	Anion	≥ 6.5

(Nguồn: [www.bio-rad.com/life science research /chromatography](http://www.bio-rad.com/life-science-research/chromatography))

2.7.2.3. Chọn dung dịch đệm

Để tránh sự tương tác đệm cùng dấu với chất trao đổi ion người ta sử dụng đệm cationic cho chất trao đổi anionic và ngược lại, pH dịch đệm phải phù hợp không làm mất hoạt tính của chất cần tách, phải có giá trị mà ở đó chất cần tách tạo liên kết với chất trao đổi ion và liên kết này lại không được quá chặt. Thường ta sử dụng nồng độ đệm trong khoảng 0,05-0,1 M.

2.7.2.4. Phương pháp rửa trôi protein

Về lý thuyết có hai phương pháp để rửa trôi protein:

- ❖ Thay đổi pH của đệm đến giá trị làm yếu liên kết của protein với ionit, đối với anionit là giảm các giá trị pH thấp hơn, còn đối với các cationit là tăng giá trị pH cao hơn.
- ❖ Tăng lực ion nhằm làm giảm tương tác tĩnh điện giữa protein với ionit

- Trong thực tế, phương pháp đầu không phải lúc nào cũng cho kết quả tốt. điều này được giải thích như sau: ở dung lượng đệm không đủ lớn, sự thay đổi đột ngột và đáng kể pH theo tiến trình rửa trôi protein sẽ dẫn đến sự phân tách không tốt các thành phần riêng biệt. Khi lực ion thấp, dung lượng đệm cũng phải thấp, khi ấy sự thay đổi pH nhờ sử dụng gradient pH sẽ không có hiệu lực do lực đệm của protein bị hấp phụ trên cột ngăn cản, còn trong trường hợp sử dụng chất hấp phụ chứa DEAE, thì lại do tính chất tạo đệm của chính nó gây ra.
- Vì vậy người ta thường sử dụng gradient nồng độ muối (NaCl, KCl) vì chúng có tác dụng sau đây:
 - + Muối có thể loại trực tiếp protein (thí dụ: Cl^- trong ionit DEAE) chiếm các tâm liên kết điện dương và ngăn trở protein gắn vào các tâm đó.
 - + Sự phân tách bởi sắc ký trao đổi ion được hoàn thành bởi sự gia tăng nồng độ muối trong quá trình rửa trôi từng bước hay liên tục của gradient. Trong nhiều trường hợp phân tách, sự biến đổi pH của buffer rửa giải được thêm vào 1 lượng muối có thể tạo thuận lợi.

2.8. Phương pháp đông khô sản phẩm (Freeze-drying)

2.8.1. Khái niệm

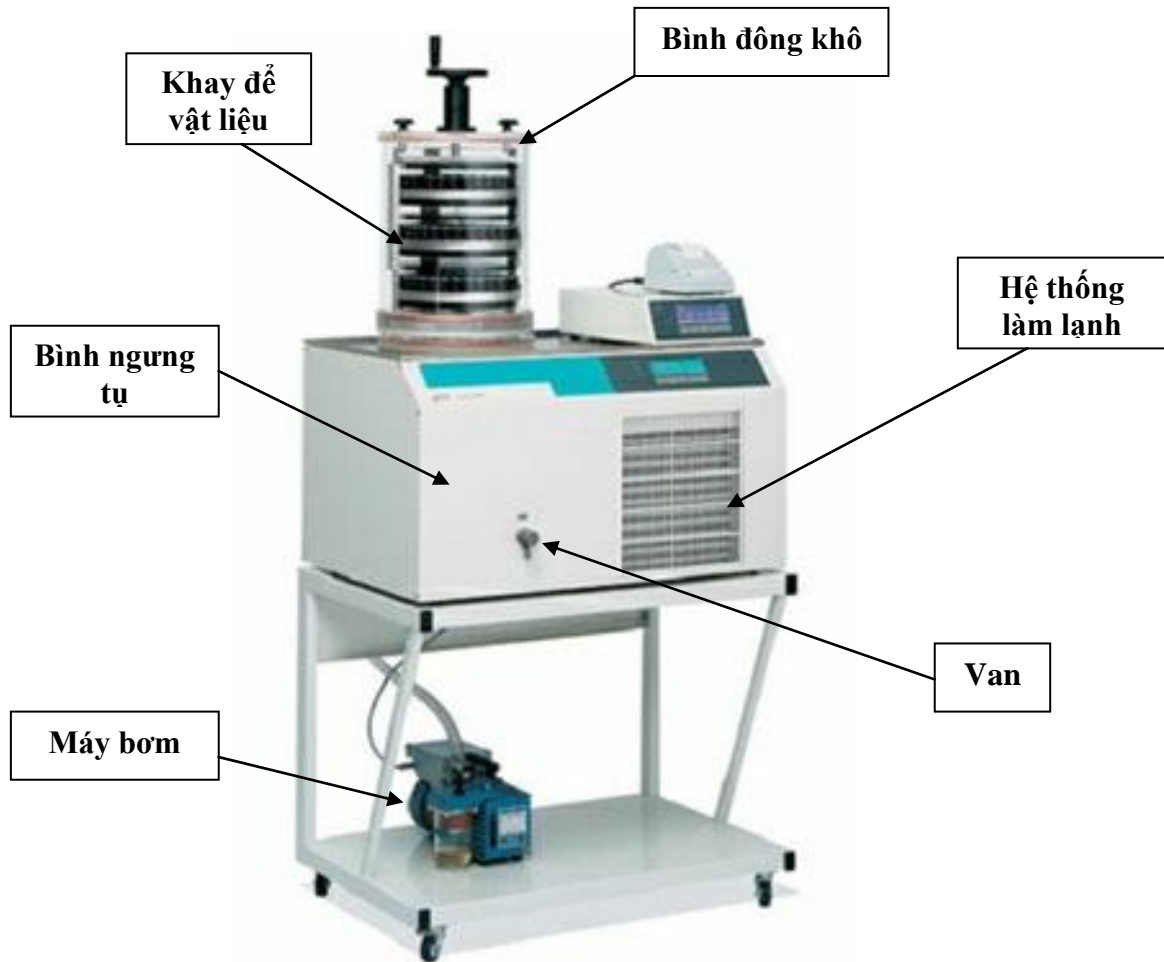
Đông khô là quá trình làm mất hơi nước của sản phẩm bằng cách trực tiếp chuyển ẩm từ trạng thái rắn sang trạng thái hơi không qua trạng thái lỏng ở điều kiện áp suất rất thấp. Sản phẩm thu được bằng phương pháp đông khô giữ lại gần như đầy đủ tính chất đặc trưng ban đầu: tính chất sinh học, màu sắc, hình dạng. Sản phẩm có thể tồn trữ lâu dài trong bao bì chống ẩm và không phụ thuộc vào điều kiện chống ẩm.

2.8.2. Các giai đoạn của quá trình đông khô

Quá trình đông khô được chia làm 3 giai đoạn:

- Giai đoạn làm lạnh: trong giai đoạn này vật liệu sấy được làm lạnh từ nhiệt độ môi trường (khoảng 20°C) xuống đến nhiệt độ -10°C ÷ -15°C (sấy thăng hoa liên tục) hoặc có thể làm lạnh vật liệu trong buồng lạnh riêng (từ -20°C đến -70°C). Trong giai đoạn này không gian của bình thăng hoa được hút chân không và áp suất trong bình giảm, do đó phân áp suất hơi nước trong không gian bình cũng giảm so với phân áp suất hơi nước trong lòng vật liệu sấy. Điều đó dẫn tới hiện tượng thoát ẩm từ vật liệu sấy vào không gian bình thăng hoa. Như vậy kết thúc giai đoạn làm lạnh nhiệt độ của vật liệu sấy nhỏ hơn nhiệt độ điểm ba thể. Áp suất trong bình thăng hoa cũng nhỏ hơn áp suất của điểm ba thể.
- Giai đoạn thăng hoa: trong giai đoạn này, nước trong vật liệu sấy bắt đầu thăng hoa mãnh liệt. Độ ẩm của vật liệu sấy giảm rất nhanh và gần như tuyến tính. Như vậy giai đoạn thăng hoa có thể Xem là giai đoạn có tốc độ sấy không đổi.
- Giai đoạn bốc hơi ẩm còn lại: sau giai đoạn thăng hoa, do trạng thái của nước trong vật liệu sấy nằm trên điểm ba thể nên ẩm trong vật liệu sấy trở về dạng lỏng. Vì khi đó áp suất trong bình thăng hoa vẫn được duy trì bé hơn áp suất khí trời nhờ bơm chân không và vật liệu sấy vẫn tiếp tục được gia nhiệt nên ẩm vẫn không ngừng từ dạng lỏng lên dạng hơi và đi vào không gian bình thăng hoa. Như vậy giai đoạn bốc hơi ẩm còn lại chính là quá trình sấy chân không bình thường.

2.8.3. Máy đông khô được sử dụng trong nghiên cứu



Hình 2.11 Máy đông khô Lyopro 6000

2.8.4. Ứng dụng của phương pháp đông khô

Do phương pháp này thu được sản phẩm có chất lượng cao, khi đông khô không bị biến chất albumin, bảo vệ nguyên vẹn các vitamine như lúc tươi, đặc biệt là ứng dụng trong sản xuất những sản phẩm có tính nhạy cảm với nhiệt độ cao như: sữa, rau, quả. Tuy nhiên phương pháp này còn phức tạp và đắt nên chỉ mới áp dụng rộng rãi trong sản xuất dược phẩm để đông khô các chất kháng sinh như: penicilline, streptomycine và đặc biệt là enzyme tinh khiết.

2.9. Phương pháp điện di trên Gel SDS-PAGE (Hames, 1998)

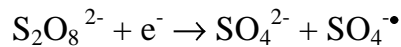
2.9.1. Giới thiệu

Sau khi qua các bước ly trích và tinh sạch, người ta thường kiểm tra lại độ tinh sạch của protein nhờ kỹ thuật điện di. Nhờ kỹ thuật này ta còn có thể xác định

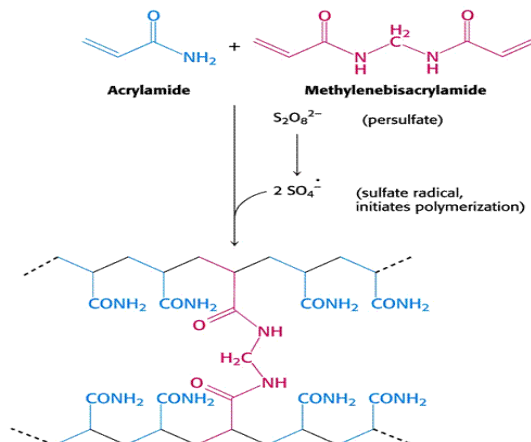
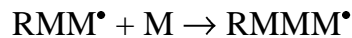
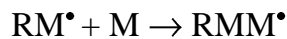
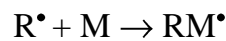
trọng lượng phân tử và độ tinh sạch của chúng. Kỹ thuật điện di dựa trên nguyên tắc trong một điện trường các phân tử tích điện âm sẽ di chuyển về cực dương của điện trường và ngược lại. Tốc độ di chuyển của các phân tử này tùy thuộc vào kích thước, hình dạng, điện tích, thành phần hóa học của phân tử và lực điện trường.

2.9.2. Cấu tạo của gel Polyacrylamide

Gel polyacrylamide được tạo thành do sự polymer hóa các phân tử acrylamide và N, N'-methylene-bis-acrylamide. Các đơn phân acrylamide được polymer hóa theo kiểu từ “đầu đến cuối” để hình thành chuỗi dài và một phân tử bis-acrylamide sẽ ngẫu nhiên gắn vào chuỗi này và hình thành nhánh thứ hai để chuỗi polymer này tiếp tục kéo dài. Nhờ cơ chế này cấu trúc mạng lưới do liên kết chéo mới được hình thành. Quá trình polymer hóa này được khởi đầu bởi ammonium persulfate và được xúc tác nhờ N, N, N', N'-tetra methylethylenediamine (TEMED). TEMED xúc tác phân tử ammonium persulfate phân ly cho ra gốc tự do:



Gốc tự do được kí hiệu R^{\cdot} và M là phân tử đơn phân acrylamide, quá trình polymer hóa được biểu diễn như sau:



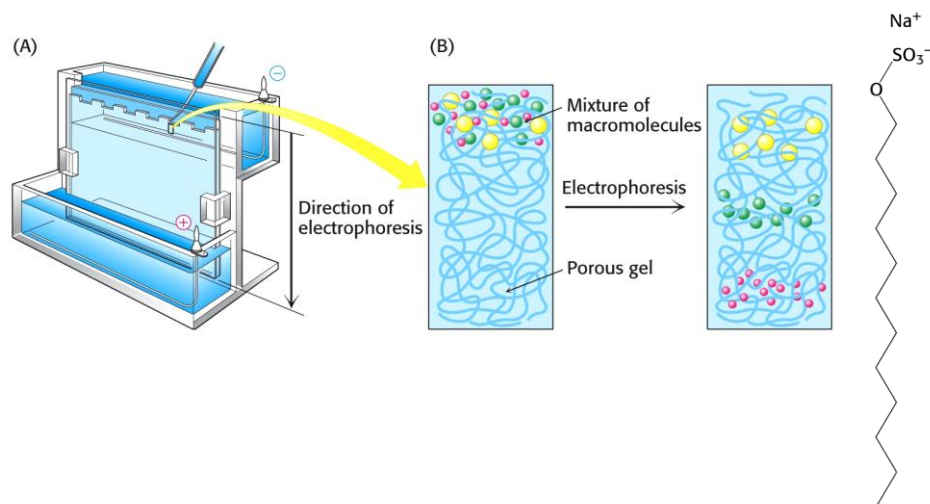
Hình 2.12 Cấu tạo Gel Polyacryamide

Trong quá trình này các phân tử oxy có thể bắt lấy các gốc tự do và vì thế hỗn hợp gel thường phải loại khí, có nghĩa dung dịch phải được hút chân không trước khi cho chất xúc tác vào.

2.9.3. Nguyên tắc hoạt động của SDS-PAGE

SDS-PAGE là kỹ thuật điện di trên gel polyacrylamide khi có sự hiện diện của sodium dodecyl sulfate (SDS), đây là một tác nhân làm biến tính và âm tính hóa các phân tử protein trong điều kiện nhiệt độ cao và có sự có mặt của mercaptoethanol hay dithithreitol (DTT) sẽ khử các cầu nối disulfite. Điều đó có nghĩa là các tiểu đơn vị protein trong hỗn hợp protein có cùng mật độ điện tích và cùng chạy trong một điện trường như nhau. Như vậy tốc độ di chuyển trong điện trường của protein phụ thuộc chủ yếu vào kích thước phân tử và phương pháp này được sử dụng để xác định trọng lượng phân tử, thành phần và độ sạch của các chế phẩm protein sau quá trình tinh sạch.

Trong thực tế để xác định được trọng lượng phân tử của một protein người ta thường so sánh với một thang phân tử lượng chuẩn, đây là hỗn hợp các protein có trọng lượng phân tử khác nhau đã được xác định.



Hình 2.13 Sự phân tách protein bằng phương pháp điện di SDS-PAGE

PHẦN 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Thời gian và địa điểm tiến hành

3.1.1. Thời gian

Đề tài được thực hiện từ tháng 03/2006 đến tháng 08/2006.

3.1.2. Địa điểm

- Thu thập mẫu tại nông trường Phạm Văn Hai, Bình Chánh, Tp.Hồ Chí Minh.
- Tiến hành thí nghiệm tại Phòng Thí Nghiệm Công Nghệ Sinh Học-Trung Tâm Phân Tích Và Thí Nghiệm Hóa Sinh Đại Học Nông Lâm Tp.HCM; Phòng Công Nghệ Enzyme-Viện Công Nghệ Sinh Học- Đại Học Cần Thơ.

3.2. Vật liệu

3.2.1. Thân dứa

Thu mẫu tại nông trường Phạm Văn Hai, Bình Chánh, Tp.Hồ Chí Minh.

3.2.2. Hóa chất

- Các hóa chất dùng trong ly trích enzyme bromelain: cystein, EDTA, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, acetone của hãng Merck.
- Các hóa chất dùng định lượng protein theo phương pháp Bradford: coomassie brilliant blue G250, Ethanol, H_3PO_4 , albumin của hãng Merck.
- Các hóa chất dùng xác định hoạt tính protease theo phương pháp Anson: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; KH_2PO_4 ; casein; TCA; NaOH; HCl; tyrosine của hãng Merck.
- Các hóa chất dùng tinh sạch enzyme bromelain: Đệm amonium acetate 0.05 M, pH 5.0; NaCl của hãng Merck.
- Các hóa chất dùng điện di: 30% acrylamide/bis (29:1); Tris- HCl; SDS; TEMED; ammonium persulfate của hãng Bio-rad.

3.2.3. Dụng cụ và thiết bị.

- Pipetman các loại (0,5-10 μl ; 10-100 μl ; 100-1000 μl)
- Đầu típ các loại (0,5-10 μl ; 10-100 μl ; 100-1000 μl)
- Cân phân tích 4 số (Precisa)
- Máy đo pH (Thermo)
- Máy đo quang phổ kế (HP 8453 – Aglient)

- Bồn ủ nhiệt (Memmert)
- Thiết bị hút chân không (Laboport)
- Thiết bị sắc ký tinh sạch protein (Biologic Duoflow - Bio-rad)
- Thiết bị điện di đứng (Mini Protean 3 cell – Bio-rad)

3.3. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

3.3.1. Nội dung

3.3.1.1. Cách lấy mẫu

Thu lấy thân dứa Cayenne cho vào bọc ny lông để mẫu tránh bị bốc hơi nước, ghi tên giống, ngày thu, cho vào thùng đá; sau đó chuyển vào tủ -20°C giữ mẫu. Nếu không thực hiện đúng các bước này thì có thể sẽ ảnh hưởng đến chất lượng protein của thân dứa.

3.3.1.2. Các bước chính để thu nhận enzyme bromelain từ dứa

- Ly trích enzyme bromelain từ thân dứa bằng cách nghiền mẫu trong máy nghiền, vắt lọc bằng vải, và ly tâm thu dịch trong.
- Bổ sung 20 mM cystein - 5 mM EDTA vào dịch trong và trữ ở -20°C
- Kết tủa protein bằng các tác nhân gây kết tủa: muối amonium sulfate hoặc dung môi hữu cơ acetone.
- Tinh sạch enzyme bromelain bằng phương pháp trao đổi ion trên hệ thống sắc ký cột trao đổi ion.
- Đông khô sản phẩm enzyme thô và enzyme tinh khiết.

3.3.1.3. Xác định hoạt tính và protein tổng số

- Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Bradford.
- Xác định hoạt tính enzyme bromelain theo phương pháp Anson.

3.3.1.4. Điện di SDS-PAGE xác định trọng lượng phân tử và độ tinh sạch của enzyme.

3.3.2. Phương pháp thí nghiệm

3.3.2.1. Thí nghiệm ly trích và khảo sát các tác nhân kết tủa

a. Thí nghiệm ly trích enzyme bromelain từ thân dứa ở quy mô nhỏ

Mẫu được thu tại nông trường Phạm Văn Hai: giống Cayenne Thái Lan được giữ lạnh trong quá trình vận chuyển và bảo quản ở điều kiện -20°C

Sơ lược cách ly trích

Thân dứa được cắt nhỏ rồi cho vào máy sinh tố xay nát (không cho thêm nước), đổ ra trên vải màn, vắt thật kỹ, lấy nước đem ly tâm 4000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C để được dịch dứa trong, bỏ cặn.

Bổ sung 20 mM cystein – 5 mM EDTA vào dịch thu được trữ ở -20°C .

b. Thí nghiệm khảo sát các tác nhân kết tủa

❖ Nguyên tắc

Độ hòa tan của protein trong dung dịch phụ thuộc vào nhiều yếu tố như là: sự tích điện của phân tử protein, mức độ hydrate hóa, nhiệt độ,...khi thay đổi các yếu tố này sẽ làm ảnh hưởng đến giá trị điện tích của phân tử protein, và ảnh hưởng đến lớp vỏ hydrate của chúng, khi đó các phân tử protein sẽ kết tụ lại với nhau để tạo thành khối lớn, tách khỏi dung dịch, thường gọi là tủa protein.

❖ Kết tủa protein bằng tác nhân kết tủa

i. Muối amonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

Ở thí nghiệm này dùng muối amonium sulfate do những ưu điểm: muối trung tính vừa làm trung hòa điện tích (do các ion tác động tương hỗ với các nhóm điện tích trái dấu), vừa loại bỏ lớp vỏ hydrate của phân tử keo làm cho phân tử protein kết tụ lại.

✓ Nguyên liệu và hóa chất:

Nguyên liệu: Dịch nước dứa thu được từ thí nghiệm trên

Hóa chất: amonium sulfate.

✓ **Tiến hành**

Lấy dịch chiết nước dừa tua với amonium sulfate với tỷ lệ: cho từ từ 23,6g muối vào trong 50ml nước dừa. Ở đây sử dụng muối amonium sulfate bão hòa có nồng độ 70% ở nhiệt độ 30° C).

Để yên dịch vừa tua trong tủ mát 4°C khoảng 1 giờ → ly tâm lạnh 4°C trong 4000 vòng/30 phút sau đó thu tua ướn protein đem cân.

ii. Dung môi hữu cơ acetone

✓ **Nguyên liệu và hóa chất**

Nguyên liệu: Dịch nước dừa thu được từ thí nghiệm trên

Hóa chất: acetone được làm lạnh trước khi tiến hành tua

✓ **Tiến hành**

Lấy dịch chiết nước dừa tua với acetone với tỷ lệ 2 acetone : 1 dịch dừa nghĩa là cho từ từ 100ml acetone lạnh vào trong 50ml dịch dừa.

Để yên dịch vừa tua trong tủ mát 4°C khoảng 1 giờ → ly tâm lạnh 4°C trong 4000 vòng/30 phút sau đó thu tua ướn protein đem cân.

3.3.2.2. Thí nghiệm xác định hàm lượng và hoạt tính enzyme

a. Định lượng protein theo phương pháp Bradford (1976)

✓ **Nguyên tắc**

Các protein khi phản ứng với coomassie (coomassie brilliant blue-CBB) sẽ hình thành hợp chất màu có khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 595 nm, cường độ màu tỉ lệ với nồng độ protein trong dung dịch. Phương pháp này có độ nhạy cao cho phép phát hiện tới vài mg protein/ml, dễ thực hiện và tiết kiệm thời gian.

✓ **Hóa chất**

Thuốc nhuộm Bradford: hòa tan 50 mg thuốc nhuộm coomassie brilliant blue G250 vào 23,5 g ethanol 96°, thêm 42,5 g H₃PO₄ 85% và chỉnh tới 500 ml bằng nước cất.

Dung dịch albumin 0.1 mg/ml: cân 10 mg albumin pha với nước cất thành 100 ml.

Dịch mẫu protein: 1 ml cho một phản ứng

✓ **Tiến hành thí nghiệm**

Bảng 3.1 Xây dựng đường chuẩn albumin

Ống số	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dung dịch albumin (0.1mg/ml) (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
Nồng độ albumin (μg)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
Nước cất (ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2
Thuốc thử Bradford (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Hút 1ml dung dịch protein vừa pha loãng như bảng trên, thêm vào 2 ml thuốc nhuộm Bradford, lắc đều. Sau đó đem ly tâm 10 phút đem đo OD tại bước sóng 595 nm. Vẽ đồ thị biểu diễn sự biến thiên mật độ quang (ΔOD) theo nồng độ protein chuẩn ($\mu\text{g/ml}$).

Xác định hàm lượng protein trong mẫu

Tương tự hút 1ml protein cần phân tích, thêm vào 2 ml thuốc nhuộm Bradford, để yên 10 phút, đem đo OD tại bước sóng 595nm.

Từ đường chuẩn suy ra hàm lượng protein cần phân tích ($\text{OD}_{595} * \text{Độ pha loãng của mẫu}$)

b. Xác định hoạt tính protease theo phương pháp Anson

✓ **Nguyên tắc**

Cho protease tác dụng với cơ chất là casein, sản phẩm tạo thành là các peptide ngắn hay các loại acid amin. Trong các loại acid amin, tyrosine chiếm đa số. Xác định tyrosine bằng phản ứng màu với thuốc thử Folin, từ đó xác định hoạt tính enzyme protease theo định nghĩa:

Hoạt tính protease được biểu thị là số micromol tyrosine sinh ra do thủy phân casein bởi 1 mg hỗn hợp chứa protease trong 1 phút ở điều kiện chuẩn ($35,5^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,6$)

✓ **Hóa chất**

Dung dịch Na_2HPO_4 1/15 M: hòa tan 2,967 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ trong nước thành 250 ml.

Dung dịch KH_2PO_4 1/15 M: hòa tan 0,9072 g KH_2PO_4 trong nước thành 100 ml.

Dung dịch đệm Sorosen 1/15 M, pH 7,6: trộn 177 ml dung dịch Na_2HPO_4 1/15 M và 23 ml dung dịch KH_2PO_4 1/15 M. Đo và chỉnh lại pH cho đúng.

Dung dịch casein 1 %: đun sôi cách thủy 1 g casein trong đệm Sorensen cho đến tan hoàn toàn rồi định mức bằng Sorensen cho đủ 100 ml.

Dung dịch TCA 10 %: hòa tan 10 g TCA trong nước cho đủ 100 ml.

Dung dịch NaOH 0,5 N: hòa tan 10g NaOH trong nước cho đủ 500 ml.

Dung dịch HCl 0,2 N: trộn 4,25 ml HCl đậm đặc với nước cho đủ 250 ml.

Dung dịch tyrosine 20 mM/l: khuấy nghiền 0,118 g tyrosine trong dung dịch HCl 0,2N vừa đủ 50 ml.

Dung dịch tyrosine chuẩn 1 mM/l: pha loãng 5 ml tyrosine 20 mM/l trong HCl 0,2 N thành 100 ml.

✓ **Tiến hành**

Bảng 3.2 Xây dựng đường chuẩn tyrosine

Ống nghiệm	0	1	2	3	4	5
Dung dịch tyrosine chuẩn 1 mM/l (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Dung dịch HCl 0,2 N (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Dung dịch NaOH 0,5 N (ml)	2	2	2	2	2	2
Thuốc thử Folin (ml)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Lượng tyrosine (μ mol)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1

Lắc và để yên 10 phút đem đo mật độ quang ở bước sóng 660 nm.

Vẽ đồ thị biểu diễn sự biến thiên mật độ quang (ΔOD) theo lượng tyrosine ở các ống.

Bảng 3.3 Xác định lượng tyrosine trong dung dịch nghiên cứu

Dung dịch hóa chất	Ống nghiệm	
	Thử thật (3 ống)	Thử không (3 ống)
casein 1% (ml)	5	5
TCA% (ml)	0	5
Dịch enzyme mẫu (ml)	1	0
Lắc đều và giữ ở 35,5°C, trong 30 phút		
TCA 10% (ml)	5	0
Dịch enzyme mẫu (ml)	0	1
Lọc, lấy 1ml dịch lọc thực hiện phản ứng màu		
Dịch lọc (ml)	1	1
Dung dịch NaOH 0,5N (ml)	2	2
Thuốc thử Folin (ml)	0,6	0,6
Lắc đều, để yên 10 phút, đo OD ở bước sóng 660nm		

✓ **Cách tính****Hoạt tính enzyme protease (UI)**

$$HT (UI) = (x.V.K)/(t.v)$$

x: số μ mol tyrosine suy ra từ đường chuẩn

V: tổng thể tích hỗn hợp phản ứng enzyme (11 ml)

v: thể tích dịch lọc đem phân tích (1 ml)

k: độ pha loãng mẫu

t: thời gian phản ứng

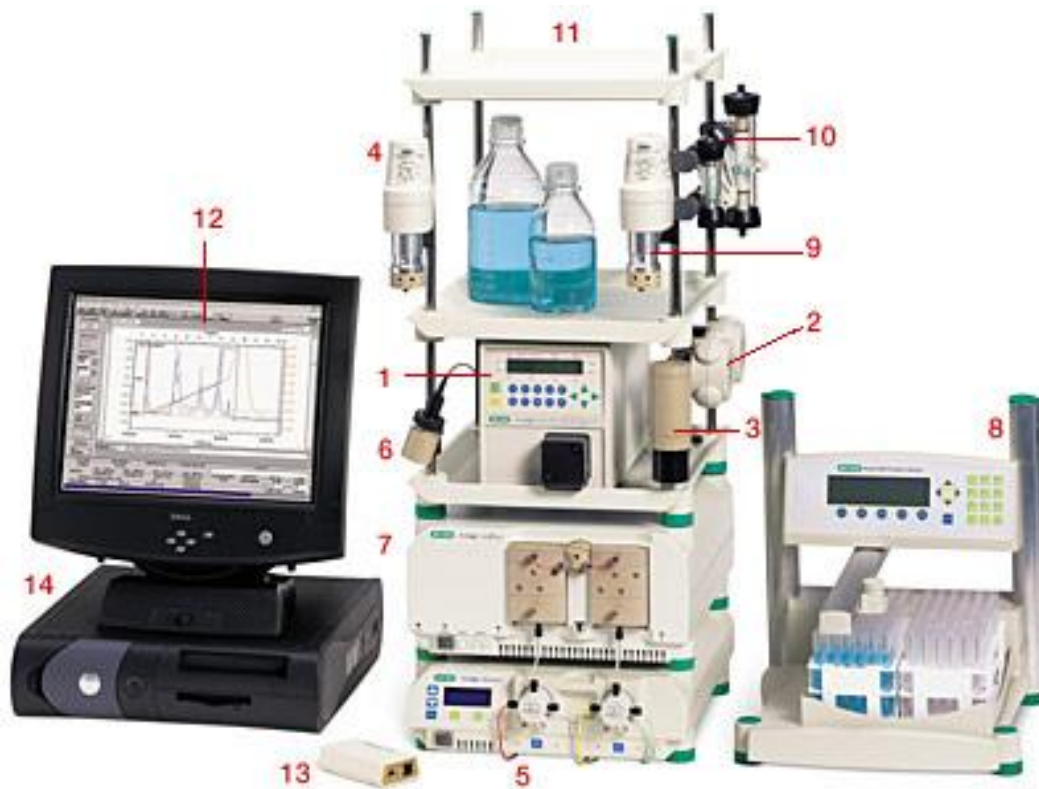
1UI (Anson)= 1 micromol tyrosine/ml/phút; hoặc = 1 micromol/mg/phút

Hoạt tính đặc hiệu của enzyme protease (UI/mg)

Từ kết quả hàm lượng protein (mg/ml) và hoạt tính enzyme protease (UI/ml). Tính hoạt đặc hiệu của enzyme (htđh):

$$HTĐH = \frac{\text{Số đơn vị hoạt tính}}{\text{mg protein enzyme}}$$

3.3.2.3. Thí nghiệm tinh sạch enzyme bromelain bằng sắc ký trao đổi ion



Hình 3.1 Hệ thống sắc ký tinh sạch protein áp suất cao BioLogic Duo-Flow
(Xem chú thích các bộ phận và thông số chính của hệ thống BioLogic Duo-Flow ở phần phụ lục 3)

a. Nguyên tắc

Tách các phân tử dựa trên điện tích, cụ thể trong trường hợp này là tách các phân tử protein dựa trên điểm đẳng điện của chúng.

b. Các bước tiến hành thí nghiệm

❖ Chuẩn bị cột

Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng cột sắc ký trao đổi cation UNO-S nhồi sẵn do hãng Bio-rad (Mỹ) cung cấp.

Như đã trình bày ở trên, điểm đẳng điện của bromelain thân khoảng 9,55 nên ta sử dụng loại cột với chất trao đổi cation.

UNO - S column được thiết kế phù hợp cho sắc ký sinh học với hiệu quả phân tách cao, tốc độ nhanh đối với các phân tử sinh học bao gồm protein, peptide, và polynucleotide. Chất trao đổi ion dương trong cột UNO là $-\text{SO}_3^-$.

Đặc tính của cột UNO - S

Thể tích cột: 1,3 ml

Lượng protein bơm tối đa vào cột: 20 mg

Tốc độ dòng khuyến cáo: 0,5-6,0 ml/phút

Kích thước cột: 7x35 mm

Áp suất tối đa: 700/4,5/48 (psi/Mpa/bar)

❖ Chuẩn bị dung dịch đệm

Dung dịch A: dung dịch đệm acetate 50 mM, pH 5 gồm 2 thành phần amonium acetate và acid acetic.

Dung dịch B: dung dịch A, bổ sung thêm lượng muối NaCl 1M

Dung dịch đệm phải được lọc bởi màng lọc 0,2-0,45 μm trở lên và khử bọt khí ít nhất 15 phút trước khi đưa vào máy.

❖ Chuẩn bị mẫu

Lọc mẫu enzyme bromelain qua màng lọc 0,2-0,45 μm sẽ làm gia tăng độ bền và thời gian sử dụng cột. Lưu ý: khi bơm mẫu nên tránh bọt khí vì sẽ ảnh hưởng đến sự phân tách của cột.

❖ Lập quy trình các bước cho máy thực hiện

Muốn thiết kế một thí nghiệm tinh sạch protein trên hệ thống BioLogic DuoFlow thì phải thiết lập được quy trình các bước cho máy thực hiện ổn định và có độ lặp lại cao.

Phần quy trình cụ thể cho thí nghiệm tinh sạch enzyme bromelain chúng tôi trình bày ở phần kết quả và thảo luận.

❖ Các bước tiếp theo

Sau khi kết nối các bộ phận của hệ thống và thiết lập quy trình xong, dùng syringe bơm mẫu vào valve AVR-7. Hệ thống sẽ thực hiện quá trình tinh

sạch, vẽ sắc ký đồ trên màn hình theo dõi, và tiến hành thu mẫu tự động bằng fraction collector.

Kết thúc quy trình ta ghi nhận được tất cả các thông số về các peak tách ra được trên màn hình như là: độ dẫn điện; phần trăm dung dịch B; thời điểm xuất hiện các peak; OD ở các bước sóng 280 nm, 260 nm.

Nhưng để thu được kết quả thống nhất chúng tôi gom các ống theo từng peak để xác định hàm lượng protein theo phương pháp Bradford và hoạt tính enzyme sau tinh sạch bằng phương pháp Anson cải tiến.

3.3.2.4. Thí nghiệm điện di enzyme bromelain sau tinh sạch



Hình 3.2 Thiết bị điện di đứng SDS-PAGE

Tiến hành thí nghiệm

- Chuẩn bị hộp điện di: khuôn kính để đổ gel, lược cài và hộp điện di phải được rửa sạch và lau khô bằng cồn. Sau đó ráp thành khuôn để chuẩn bị đổ gel
- Chuẩn bị gel phân tích polyacrylamide 10 %

Nước cất	4 ml
Acrylamide 30 %	3.3 ml
Tris-HCl, (pH 8,8)	2.5 ml
SDS 10 %	100 µl
APS 10 %	100 µl
- Dung dịch được trộn bằng máy khuấy từ, sau đó cho 4 µl TEMED vào dung dịch, khuấy đều và nhanh chóng dùng pipette 1000 ml cho vào khung kiếng đổ gel. Gel sẽ được bơm đến vạch cách lược là 0,5 cm. Chú ý không bơm quá nhanh sẽ tạo bọt trong gel. Cần thận bơm tiếp một lớp nước cất lên trên bề mặt gel để tạo cho bề mặt gel phẳng. Gel sẽ đông lại trong 20-30 phút.

– Chuẩn bị mẫu protein

Pha mẫu tỷ lệ 1:1. Cho vào ống eppendorf 100 μ l mẫu protein và 100 μ l dung dịch chuẩn bị mẫu như trên. Trong thí nghiệm này các mẫu protein/enzyme lấy từ dịch rửa thô acetone, peak 1 và peak 2 của quá trình tinh sạch của quy trình 1 và quy trình 3.

Lắc đều và đun cách thủy ở 95°C, 5 phút. Để nguội

– **Đổ gel tập trung**

Gel tập trung thường được pha ở nồng độ 4 % và gel có thành phần như sau

Nước cất	2.7 ml
Acrylamide 30 %	670 μ l
Tris-HCl (pH 6,8; 1 M)	2.5 ml
SDS 10 %	40 μ l
APS 10 %	4 μ l
TEMED	4 μ l

Khuấy đều dung dịch trên máy khuấy từ. Trước khi đổ gel tập trung, ta phải đổ bỏ phần nước phía trên gel phân tích bằng cách nghiêng và dùng giấy thấm.

Tương tự gel phân tích, sau khi cho 4 μ l TEMED vào, dung dịch phải được đưa nhanh vào khung đổ gel. Dùng giấy thấm để loại hết nước trên bề mặt gel phân tích. Cho gel tập trung vào, đưa lược vào lớp gel. Chú ý, lược được đưa vào cẩn thận để tránh tạo lớp bọt dưới phía chân lược. Gel tập trung sẽ đông tụ lại khoảng sau 20 phút. Đánh dấu lại các vị trí lỗ giếng.

– Đưa mẫu vào các giếng

Sau khi gel tập trung đông, lắp bộ khung đổ gel vào khung chạy điện di.

Đổ đầy dung dịch chạy điện di vào phía bên dưới và bên trên bộ điện di.

Cẩn thận lấy lược ra và cho mẫu vào các giếng.

Lượng mẫu là 10 μ l đưa vào các lỗ giếng. Chú ý không để mẫu tràn qua các giếng bên cạnh, ghi chép lại vị trí các mẫu đưa vào giếng để dễ thảo luận sau này.

– **Chạy điện di**

Sau khi hoàn tất việc đưa mẫu vào, đậy nắp hộp điện di lại và cho dòng điện đi qua. Dòng điện chạy điện di là 25 mA / 80 V

Thông thường, thời gian để chạy điện di là 3 giờ. Ta có thể quan sát quá trình dịch chuyển của protein nhờ vào dải băng màu xanh của Bromophenol Blue R-250.

– **Nhuộm gel**

Gel được lấy ra khỏi hộp gel cẩn thận và cho vào dung dịch nhuộm đã pha. Để làm nhanh quá trình nhuộm màu, hệ thống sẽ được đặt trên máy lắc. Thông thường thời gian nhuộm khoảng 1 giờ.

– **Tẩy màu**

Tẩy gel bằng dung dịch tẩy, ngâm gel trong dung dịch tẩy và đặt trên máy lắc 2 giờ. Kết thúc quá trình tẩy gel khi nhận thấy gel đã sạch lớp màu nền và các băng protein hiện rõ trên gel.

Sau đó phân tích kết quả, chụp hình gel.

PHẦN 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Khảo sát các tác nhân tủa

Trong quá trình khảo sát các tác nhân kết tủa protein/enzyme chủ yếu dựa vào các phương pháp xác định hàm lượng protein và xác định hoạt tính enzyme. Vì vậy việc xây dựng đường chuẩn chính xác cho các phương pháp này là tối quan trọng vì nó có ảnh hưởng rất lớn đến kết quả đo cuối cùng của sản phẩm. Sau đây là các kết quả xây dựng đường chuẩn của chúng tôi.

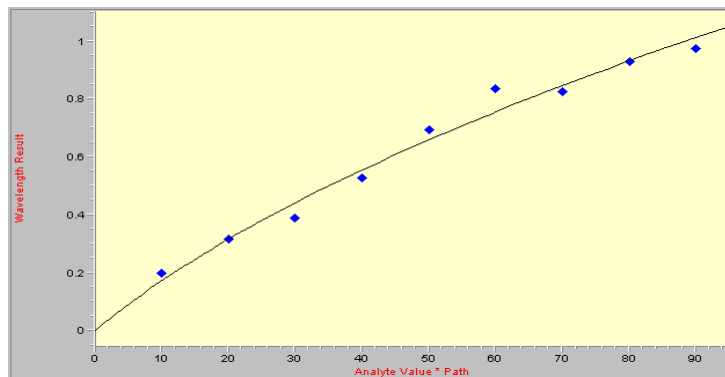
4.1.1. Kết quả xây dựng đường chuẩn albumin theo phương pháp Bradford

Trong phương pháp Bradford, albumin được chọn làm chất chuẩn để xác định hàm lượng protein tổng số của enzyme bromelain. Chính vì vậy chúng tôi đã tiến hành xây dựng đường chuẩn albumin.

Bảng 4.1 Kết quả xây dựng đường chuẩn dựa trên hàm lượng albumin

Nồng độ albumin ($\mu\text{g/ml}$)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Độ hấp thụ OD_{595}	0,199	0,136	0,390	0,526	0,693	0,837	0,824	0,930	0,974

Với kết quả này chúng tôi đã xây dựng được đồ thị đường chuẩn như trình bày ở hình 4.1. Đồ thị cho thấy hệ số tương quan $R^2 = 0,99472$ cao (xem phần phụ lục 1) đáp ứng được yêu cầu để định lượng protein ở các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 4.1 Đồ thị đường chuẩn albumin với hệ số tương quan $R^2 = 0,99472$

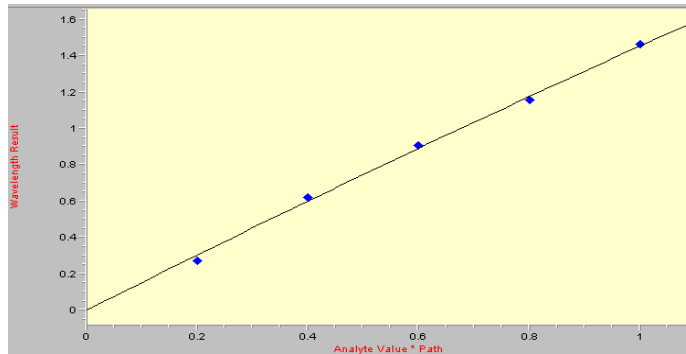
4.1.2. Kết quả xây dựng đường chuẩn tyrosine theo phương pháp Anson

Trong phương pháp Anson, tyrosine được chọn làm chất chuẩn để xác định hoạt tính của enzyme bromelain. Chính vì vậy chúng tôi đã tiến hành xây dựng đường chuẩn tyrosine.

Bảng 4.2. Số liệu kết quả xây dựng đường chuẩn tyrosine

Nồng độ tyrosine (μmol)	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Độ hấp thụ OD_{660}	0,275	0,621	0,905	1,154	1,46

Với kết quả này chúng tôi đã xây dựng được đồ thị đường chuẩn như trình bày ở hình 4.2. Đồ thị cho thấy hệ số tương quan $R^2 = 0,99957$ cao (xem phần phụ lục 1) đáp ứng được yêu cầu để xác định hoạt tính enzyme ở các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 4.2 Đồ thị đường chuẩn tyrosine với hệ số tương quan $R^2 = 0,99957$

4.1.3. Kết quả xác định hàm lượng protein và hoạt tính enzyme của dịch thô

97 g thân dừa được cắt lát nhỏ cho vào máy nghiền, xay nhuyễn, phá vỡ tổ chức mô → vắt, lọc bằng vải → ly tâm 4000 vòng/30 phút ở 4°C lấy dịch trong, bỏ phần cặn. Phần dịch trong sau đó bổ sung 20 mM cystein và 5 mM EDTA.

Lấy 1 ml dịch thô xác định protein tổng số theo phương pháp Bradford và hoạt tính enzyme theo phương pháp Anson cải tiến.

Bảng 4.3 Kết quả xác định hàm lượng protein và hoạt tính enzyme của dịch thô

Lượng protein/1 ml (mg/ml)	Hoạt tính enzyme/1 ml (UI/ml)	Hoạt tính đặc hiệu (UI/mg)
0,81	9,02	11,12

(Xem kết quả đo phần phụ lục 1)

Theo nghiên cứu về enzyme bromelain của quả dứa (Nguyễn Thị Thanh Mai, 1997) thì lượng protein/ml dịch dứa: 7,3 mg/ml. Nghiên cứu về enzyme bromelain từ phụ phẩm vỏ dứa (Đương Thị Hương Giang và ctv, 2002) thì lượng protein/ml dịch dứa: 0,39 mg/ml.

Như vậy, hàm lượng protein/ml của enzyme bromelain thu nhận từ thân dứa cao hơn gấp 2 lần so với thu nhận từ phụ phẩm vỏ dứa nhưng thấp hơn 9 lần thu nhận từ quả dứa. Về hoạt tính enzyme thì rất khó so sánh kết quả với các tác giả khác vì chưa thống nhất về phương pháp đo và tùy vào cơ chất tác động như casein hay gelatine.

4.1.4. Kết quả xác định hàm lượng protein và hoạt tính enzyme của dịch tủa

4.1.4.1. Tủa với tác nhân amonium sulfate

Lấy 50 ml dịch trong có bổ sung 20 mM cystein - 5 mM EDTA + 23,6 g amonium sulfate (70% bão hòa), để yên trong tủ mát 4°C khoảng 1 giờ → ly tâm 4000 vòng/30 phút ở 4°C, lấy tủa ướt → cân và hòa tan tủa trở lại trong đệm acetate 50 mM, pH 5.

Bảng 4.4 Kết quả xác định hàm lượng protein và hoạt tính enzyme của dịch tủa với tác nhân amonium sulfate

Lượng tủa ướt thu được (g)	Thể tích hòa tan tủa ướt (ml)	Lượng protein/1ml (mg/ml)	Hoạt tính enzyme/1ml (UI/ml)	Hoạt tính đặc hiệu (UI/mg)
5,08	6,5	4,108	63,8	15,53

(Xem kết quả đo phần phụ lục 1)

Qua bảng 4.4 ta thấy hàm lượng protein/ml, hoạt tính enzyme/ml của protein – enzyme sau kết tủa (4,108 mg/ml; 63,8 UI/ml) tăng lên rõ rệt so với trước khi kết tủa lần lượt là: 5 lần; 7 lần. Hoạt tính đặc hiệu của enzyme cũng tăng lên là 15,53 UI/mg.

Lượng protein trên 1 ml dịch tủa amonium sulfate rất cao nhưng hoạt tính đặc hiệu thấp điều này chứng tỏ trong dịch tủa còn lẫn nhiều muối.

4.1.4.2. Tủa với tác nhân acetone

Lấy 50 ml dịch trong có bổ sung 20 mM cystein - 5 mM EDTA + 100 ml acetone lạnh (tỉ lệ 1:2), để yên trong tủ mát 4°C khoảng 1 giờ → ly tâm 4000 vòng/30 phút ở 4°C, lấy tủa ướt → cân và hòa tan tủa trở lại trong đệm acetate 50 mM, pH 5.

Bảng 4.5 Kết quả xác định hàm lượng và hoạt tính protein của dịch tủa với tác nhân acetone

Lượng protein thu được (g)	Thể tích hòa tan tủa ướt (ml)	Lượng protein/1ml (mg/ml)	Hoạt tính enzyme/1ml (UI/ml)	Hoạt tính đặc hiệu (UI/mg)
3,27	9	1,24	44,88	36,19

(Xem kết quả đo phần phụ lục 1)

Qua bảng 4.5 ta thấy hàm lượng protein/ml, hoạt tính enzyme/ml của protein – enzyme sau kết tủa (1,24 mg/ml; 44,88 UI/ml) có tăng lên so với trước khi kết tủa lần lượt là: 1,5 lần; 3 lần. Hoạt tính đặc hiệu của enzyme tăng lên là 36,19 UI/mg: gấp 3 lần so với trước khi kết tủa.

Lượng protein trên 1 ml dịch tủa acetone thấp nhưng hoạt tính đặc hiệu tương đối cao điều này chứng tỏ trong dịch tủa ít lẫn các protein không quan tâm.

4.1.4.3. Hiệu suất thu nhận enzyme bromelain thân bằng tác nhân tủa amonium sulfate và acetone ở 4°C

Bảng 4.6 Hiệu suất thu nhận enzyme bromelain thân bằng tác nhân tủa amonium sulfate và acetone ở 4°C

	Lượng tủa ướt (mg)	Lượng protein/1ml (mg/ml)	Protein (mg)	Hoạt tính trên 1 ml dịch (UI/ml)	Tổng hoạt tính (UI)	Hoạt tính đặc hiệu (UI/mg)
Dịch thân dứa thô (50ml)		0,81	40,5	9,02	451 (100%)	11,12
Dịch tủa amonium sulfate	5080	4,108	26,7	63,8	414,7 (92%)	15,53
Dịch tủa acetone	3270	1,24	11,16	44,88	403,92 (89,56%)	36,19

Về cơ bản hai phương pháp tủa amonium sulfate và acetone trải qua các giai đoạn tương tự nhau. Đầu tiên xử lý nguyên liệu, phá vỡ tổ chức mô bằng cách dùng máy nghiền, rồi vắt lọc để thu dịch chiết thô có chứa bromelain, thêm vào chất bảo vệ hoạt tính và chất khử các ion kim loại nặng lần lượt là cystein và EDTA. Sau đó dùng 2 tác nhân amonium sulfate và acetone để gây kết tủa protein ở điều kiện 4°C.

Qua bảng 4.6 cho thấy:

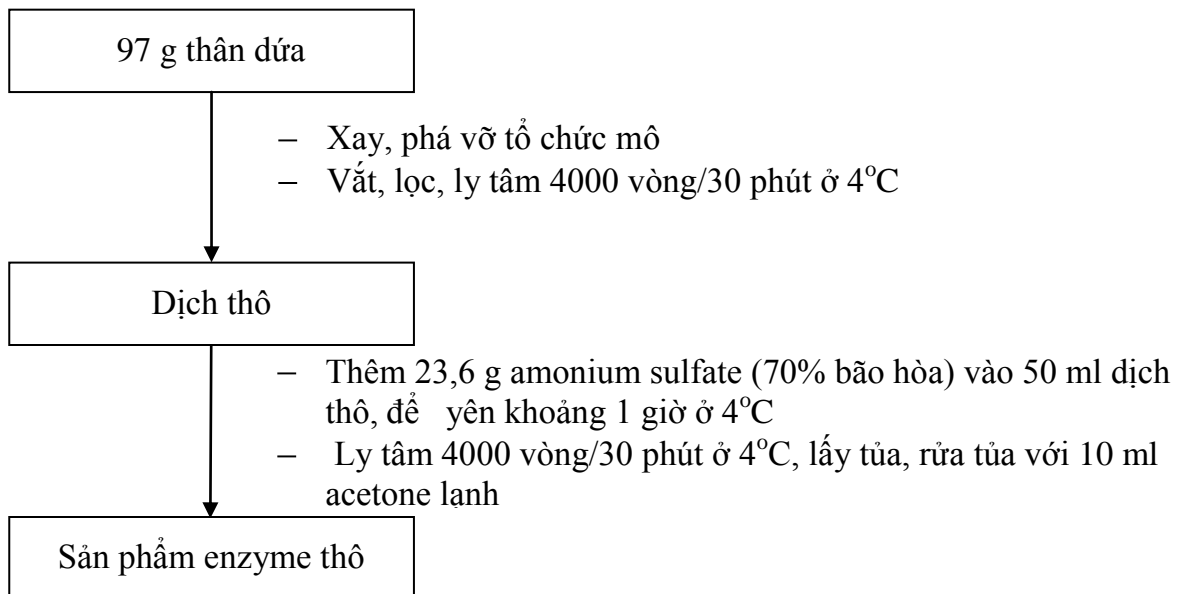
- Lượng tủa ướt thu được khi dùng tác nhân tủa là muối amonium sulfate (5,08 g) thì cao hơn khi dùng với acetone (3,27 g) được giải thích dựa trên tác nhân gây kết tủa. Với tác nhân kết tủa là dung môi hữu cơ là acetone, khi cho vào dung dịch có protein chúng làm giảm hằng số lưỡng điện đồng thời làm tăng lực hấp dẫn giữa các phân tử protein có điện tích trái dấu và do đó gây ra kết tủa protein. Mặt khác dung môi hữu cơ acetone còn gây kết tủa protein vì chúng hòa tan nhiều trong nước, tương tác với nước, làm giảm lượng nước hydrate hóa liên kết các phân tử protein làm các phân tử protein tụ lại với nhau và tủa xuống. Nhưng dung môi hữu cơ acetone còn có tác động ngược lại là có

thể hòa tan các protein. Như vậy acetone đồng thời gây kết tủa protein nhưng cũng làm tăng tính hòa tan của nó trong những điều kiện nhất định, dẫn đến sự làm giảm hàm lượng kết tủa. Trong khi đó với tác nhân kết tủa là amonium sulfate (một muối trung tính) ở nồng độ cao tác dụng gây kết tủa protein của chúng tăng lên. Vì vậy hàm lượng protein tổng số thu được khi dùng tác nhân tủa là muối amonium sulfate (26,7 mg) thì cao hơn khi dùng với acetone (11,16 mg).

– Hoạt tính tổng của protein thu được khi dùng tác nhân tủa là muối amonium sulfate (414,7 UI) thì cao hơn khi dùng với acetone (403,92 UI). Điều này có thể giải thích như sau: dung môi hữu cơ luôn có khuynh hướng gây biến tính protein vì các tác động dehydrate hóa protein của chúng rất mạnh, dễ dàng làm các phân tử protein bị đứt ra, biến đổi cấu hình dẫn đến sự biến tính. Do đó để hạn chế sự biến tính của protein chúng tôi đã tiến hành quá trình này ở nhiệt độ lạnh 4°C nhằm cải thiện sự mất hoạt tính của phương pháp này. Nhưng điều này lại cho thấy sự bất lợi của phương pháp tủa bằng acetone so với phương pháp tủa bằng amonium sulfate vì khi sản xuất ở qui mô công nghiệp, đòi hỏi phải có thiết bị làm lạnh từ 0-4°C, hoặc thậm chí -20°C. Việc dùng muối làm tác nhân gây kết tủa, nếu là muối kim loại nặng, cũng có nguy cơ gây biến tính protein. Nhưng với muối amonium sulfate là một muối trung tính, thường được sử dụng vì tính hòa tan tốt và ít gây biến tính protein ngay ở nhiệt độ thường.

– Khi so sánh hoạt tính đặc hiệu của enzyme trên 1 mg protein thu được khi dùng với tác nhân tủa là acetone (36,19 UI/mg) thì cao hơn gấp hai lần khi dùng với muối amonium sulfate (15,53 UI/mg) trong điều kiện lạnh 4°C. Ta đã biết hoạt tính đặc hiệu của enzyme trên 1 mg protein quyết định hiệu quả tác động của enzyme đối với cơ chất. Vì vậy khi tủa với tác nhân gây kết tủa protein là acetone thì sẽ hiệu quả hơn là với tác nhân là muối amonium sulfate đặc biệt trong trường hợp khi cần phải tinh sạch enzyme ở các bước tiếp theo.

Theo những tính toán đơn giản ban đầu (xem phần phụ lục 5) của chúng tôi về giá thành sản phẩm để thu nhận enzyme bromelain thô thì phương pháp dùng amonium sulfate có ưu điểm hơn so với phương pháp dùng acetone. Ngoài ra, điều kiện thu nhận lại đơn giản, không đòi hỏi phải thực hiện trong điều kiện lạnh mà amonium sulfate lại là hóa chất tương đối dễ kiếm, rẻ tiền. Từ các kết quả thu được chúng tôi đề nghị quy trình đơn giản sản xuất enzyme bromelain thô từ thân dứa:



Sơ đồ 4.1 Quy trình đơn giản sản xuất enzyme bromelain thô từ thân dứa

Quy trình này có thể được tính toán cho quy mô lớn hơn với lượng muối amonium sulfate dùng để kết tủa protein bằng 1/5 lượng mẫu thân dứa. Thí dụ: 2 kg thân dứa thì lượng muối amonium sulfate cần dùng là 0,4 kg.

Sản phẩm bromelain thu được theo sơ đồ 4.1 có thể được dùng ngay để thủy phân thịt cá hoặc tinh sạch tiếp để dùng trong công nghiệp Y – Dược.

Tuy nhiên việc sử dụng muối amonium sulfate để thu nhận bromelain trong sản xuất quy mô lớn lại gặp hạn chế do việc rất khó tách hoàn toàn muối amonium sulfate ra khỏi tủa protein. Do đó, việc tinh sạch enzyme bromelain trong trường hợp này cơ bản là loại muối. Có các phương pháp loại muối có thể dùng như: thẩm tích thì diễn ra chậm (khoảng 24 giờ) và dễ bị mất hoạt tính; phương pháp lọc gel thì diễn ra nhanh hơn nhưng sản phẩm thu nhận sau

quá trình này bị pha loãng gấp 3 – 4 lần. Ngoài ra dung dịch amonium sulfate còn gây rỉ sét kim loại và phá hủy bê tông, do đó xuất hiện vấn đề phải giải quyết phế thải.

Xuất phát từ nhu cầu muốn có enzyme bromelain tinh sạch cho các ứng dụng Y- Dược và do phòng thí nghiệm thuộc Trung Tâm Phân Tích – Đại Học Nông Lâm có điều kiện về thiết bị làm lạnh, hệ thống tinh sạch BioLogic DuoFlow với cột sắc ký trao đổi ion UNO-S nên chúng tôi chọn tác nhân rửa là acetone (vì không cần phải loại muối, cho hoạt tính enzyme đặc hiệu cao hơn), và tiến hành tinh sạch tiếp theo bằng sắc ký trao đổi ion.

4.2. Kết quả tinh sạch enzyme bromelain bằng hệ thống tinh sạch BioLogic DuoFlow.

Các phương pháp thường dùng để tinh sạch enzyme bromelain phù hợp với điều kiện kinh tế cho phép như: thẩm tích loại muối, sắc ký lọc gel, sắc ký trao đổi ion.

Trong đó, quá trình thẩm tích diễn ra khá chậm (khoảng 24 giờ) và hiệu quả không cao, sắc ký lọc gel thì nhanh hơn nhưng cũng phải mất hàng giờ và sản phẩm thu được sau quá trình này bị pha loãng gấp 3 – 4 lần rất khó khăn khi thu nhận sản phẩm. Đặc biệt phương pháp sắc ký trao đổi ion dựa vào điện tích, có thể sử dụng bất kỳ lúc nào trong suốt quy trình, thường dùng để tinh sạch sau cùng. Với cột trao đổi ion UNO-S chỉ mất khoảng 15 đến 30 phút để thực hiện xong quy trình.

4.2.1. Kết quả thiết lập qui trình các bước cho máy BioLogic DuoFlow thực hiện.

Trước khi đưa ra kết quả của quá trình sắc ký chúng tôi muốn bàn về một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tinh sạch, và bàn về kết quả thu được cho mục đích phát hiện và mục đích thu hồi.

Tốc độ dòng

Theo khuyến cáo của nhà sản xuất tốc độ dòng tối đa của cột là 4 ml/phút tuy nhiên theo kinh nghiệm của chúng tôi thì tốc độ dòng từ 1-2 ml/phút cho sẽ cho kết quả tốt nhất. Nếu tốc độ dòng quá nhanh thì quá trình phân tách các peak (phân đoạn) sẽ không tốt vì các protein bám sẽ rửa giải rất nhanh. Tuy nhiên, nếu chạy với tốc độ quá chậm thì thời gian của quy trình sẽ tăng lên nhiều lần.

Hàm lượng mẫu

Hàm lượng mẫu cho vào cột cũng là 1 yếu tố quan trọng và cũng tùy vào mục đích phát hiện hay hay mục đích thu hồi sản phẩm.

Xác định thể tích đường gradient tuyến tính và nồng độ muối cho việc rửa giải các peak

Sau đây là một số thông số đề nghị khi bắt đầu tiến hành thí nghiệm với cột UNO-S (thể tích 1,3 ml)

- Rửa protein không bám (unbound protein) với 4 thể tích cột của buffer A (buffer không muối)
- Sự rửa giải: sử dụng gradient với 10 lần thể tích cột ở nồng độ 50 % muối của buffer B. Sau đó là sự gia tăng đồ thị gradient bởi sự tăng gradient nồng độ muối đến 100 % của buffer B với 4 thể tích cột và sau đó giữ đoạn gradient này với nồng độ muối 100 % ở 4 thể tích cột trước khi cân bằng cột với 5 thể tích buffer A.

Trong quá trình tiến hành thí nghiệm chúng tôi đã mạnh dạn tiến hành nhiều sự thay đổi xung quanh những yếu tố đã bàn như trên. Nhưng trong phạm vi đề tài này chúng tôi chỉ nêu ra 3 cột mốc quan trọng để đi đến kết quả của quá trình tinh sạch.

Giải thích một số bước của các quy trình tinh sạch

- Bước 1: Thiết lập thu mẫu tự động 2 ml trên 1 ống nghiệm trong suốt quá trình tinh sạch bằng Fraction Collector.
- Bước 2: Cân bằng cột với 100 % buffer A
- Bước 3: Tự động chỉnh các thông số đo của đầu dò Quadtec-UV Vis về vị trí zero
- Bước 4: Bơm mẫu vào vị trí valve AVR7-3
- Bước 5: Rửa giải protein không bám với 100 % buffer A
- Bước 6+7: Thiết lập đường gradient tuyến tính, protein ‘quan tâm’ được rửa giải trong vùng này. Sự tăng giảm buffer A hay B tùy theo thiết kế thí nghiệm.
- Bước 8+9: Cân bằng lại cột

Trong thí nghiệm này:

- Buffer A: đệm acetate 50 mM, pH 5
- Buffer B: đệm acetate 50 mM, pH 5, và muối NaCl 0,5 M

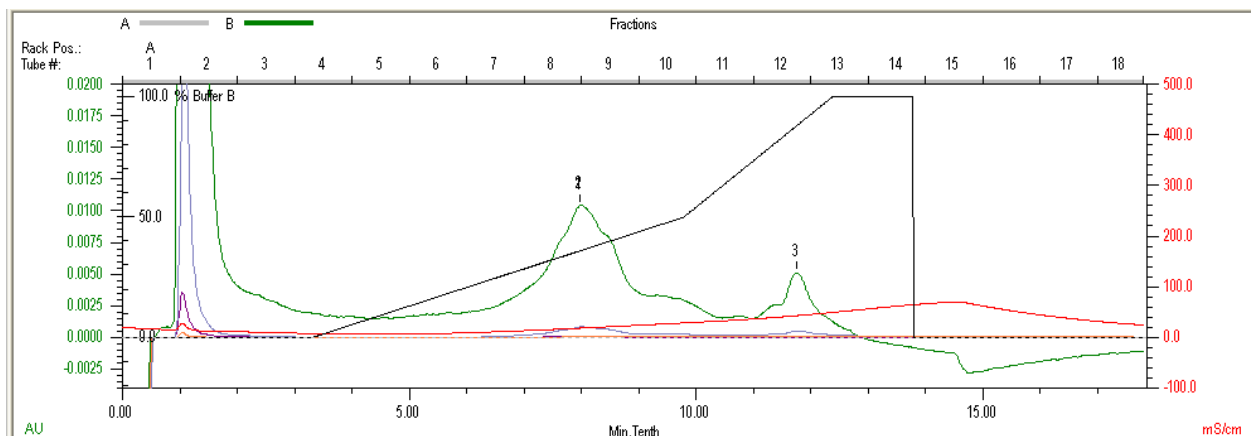
Ban đầu chúng tôi tiến hành thí nghiệm với quy trình sau:

Quy trình 1.

- Nồng độ muối 0,5 M NaCl của buffer B
- Thể tích bơm mẫu: 0,5 ml dịch rửa acetone ứng với 0,62 mg protein cho vào cột
- Tốc độ dòng : 2 ml/phút
- Thể tích gradient: 14V cột ứng với 18,2 ml

Bảng 4.7 Quy trình 1: Các bước cho máy BioLogic DuoFlow thực hiện

Volume	Description	Parameters			
1	0.00	Collection Fractions of size 2.00 ml during entire run			
2	0.00	Isocratic Flow	A: Buffer A1 B: Buffer B1	100% 0%	Volume: 1.00 ml Flow: 2.00 ml/min
3	1.00	Zero Baseline	QuadTec		
4	1.00	Load/Inject Sample	Sample Static Loop	Auto Inject Valve	Volume: 0.50 ml Flow: 2.00 ml/min
5	1.50	Isocratic Flow	A: Buffer A1 B: Buffer B1	100% 0%	Volume: 5.20 ml Flow: 2.00 ml/min
6	6.70	Linear Gradient	A: Buffer A1 B: Buffer B1	100% ----> 50% 0% ----> 50%	Volume: 13.00 ml Flow: 2.00 ml/min
7	19.70	Linear Gradient	A: Buffer A1 B: Buffer B1	50% ----> 0% 50% ----> 100%	Volume: 5.20 ml Flow: 2.00 ml/min
8	24.90	Isocratic Flow	A: Buffer A1 B: Buffer B1	0% 100%	Volume: 2.80 ml Flow: 2.00 ml/min
9	27.70	Isocratic Flow	A: Buffer A1 B: Buffer B1	100% 0%	Volume: 8.00 ml Flow: 2.00 ml/min
	35.70	End of Protocol			



Hình 4.3 Sắc ký đồ tinh sạch enzyme bromelain thân của quy trình 1

Qua sắc ký đồ:

- Bước đầu xác định được sản phẩm tinh sạch của enzyme bromelain thân thu được gồm 2 peak phân tách tốt. Nhưng khi đo độ hấp thụ ở bước sóng 280 của 2 peak này rất thấp, hàm lượng protein trên 1 ml thấp nên lượng protein thu được không đáng kể.
- Ở tốc độ dòng 2 ml/phút thì các peak được rửa giải ra từ ống thứ 8 đến ống 13.

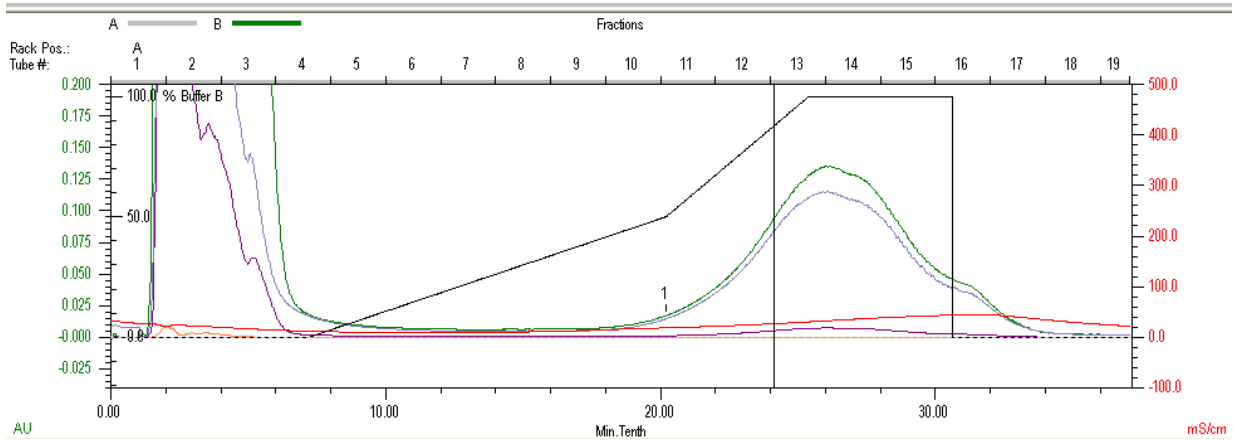
Vì vậy, quy trình này bước đầu xác định được 2 peak tinh sạch của enzyme bromelain thân nhưng chưa đủ lượng để thu hồi sản phẩm. Điều này là do lượng protein đưa vào cột còn thấp làm cho các peak thu được chỉ ở mức độ phát hiện không đủ lượng để làm các thí nghiệm tiếp theo.

Quy trình 2

- Nhận thấy lượng protein phát hiện quá thấp chúng tôi tăng lượng protein cho vào cột là 1,24 mg tương ứng với thể tích cho vào cột là 1 ml dịch rửa acetone.
- Giảm tốc độ dòng xuống còn 1 ml/phút
- Tăng thể tích gradient lên 18 thể tích cột ứng với 23,4 ml vì thể tích mẫu bơm vào tăng.

Bảng 4.8 Quy trình 2: Các bước cho máy BioLogic DuoFlow thực hiện

Volume	Description	Parameters		
1	0.00	Collection Fractions of size 2.00 ml during entire run		
2	0.00	Isocratic Flow	A: acetate .50mM, pH5 B: Acetate 50Mm,pH5 ,NaCl (100% 0% Volume: 1.00 ml Flow: 1.00 ml/min
3	1.00	Zero Baseline	QuadTec	
4	1.00	Load/Inject Sample	Sample Static Loop	Auto Inject Valve Volume: 1.00 ml Flow: 1.00 ml/min
5	2.00	Isocratic Flow	A: acetate .50mM, pH5 B: Acetate 50Mm,pH5 ,NaCl (100% 0% Volume: 5.20 ml Flow: 1.00 ml/min
6	7.20	Linear Gradient	A: acetate .50mM, pH5 B: Acetate 50Mm,pH5 ,NaCl (100% ----> 50% 0% ----> 50% Volume: 13.00 ml Flow: 1.00 ml/min
7	20.20	Linear Gradient	A: acetate .50mM, pH5 B: Acetate 50Mm,pH5 ,NaCl (50% ----> 0% 50% ----> 100% Volume: 5.20 ml Flow: 1.00 ml/min
8	25.40	Linear Gradient	A: acetate .50mM, pH5 B: Acetate 50Mm,pH5 ,NaCl (0% ----> 0% 100% ----> 100% Volume: 5.20 ml Flow: 1.00 ml/min
9	30.60	Isocratic Flow	A: acetate .50mM, pH5 B: Acetate 50Mm,pH5 ,NaCl (100% 0% Volume: 6.50 ml Flow: 1.00 ml/min
	37.10	End of Protocol		



Hình 4.4 Sắc ký đồ tinh sạch enzyme bromelain thân của quy trình 2.

Qua sắc ký đồ thu được cho thấy

- Quá trình tinh sạch cũng thu được hai peak nhưng chưa rõ ràng. Điều này có thể là do lượng mẫu đưa vào cột tăng thêm gấp đôi nhưng thể tích gradient chỉ tăng lên 4 thể tích thì chưa đủ để 2 peak phân tách hoàn toàn.
- Ở tốc độ dòng 1ml/phút thì các peak được rửa giải ra từ ống thứ 11 đến ống 15. Điều này cho thấy 2 peak thu được trễ hơn so với ở tốc độ dòng 2 ml/phút.
- Các peak có độ hấp thụ OD 280 tăng lên rõ rệt dựa vào sắc ký đồ do lượng mẫu đưa vào cột tăng lên.

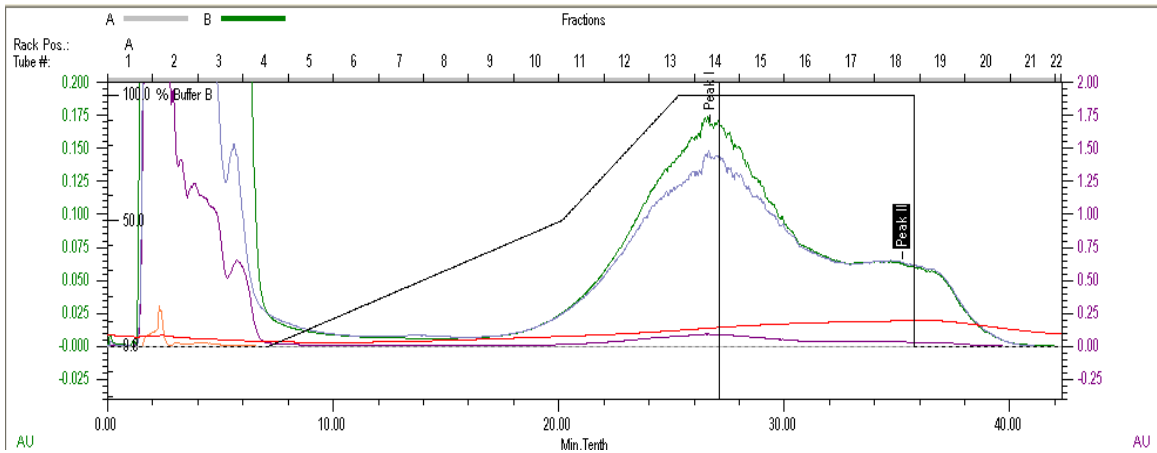
Dựa vào đồ thị trên, chúng tôi tiếp tục tiến hành thay đổi để tách 2 peak ra rõ hơn bằng cách gia tăng thể tích rửa giải gradient lên 22 thể tích cột tương ứng với 28,6 ml.

Quy trình 3

- Nồng độ muối 0,5 M NaCl của buffer B
- Thể tích bơm mẫu: 1ml dịch rửa acetone ứng với 1,24 mg protein cho vào cột
- Tốc độ dòng : 1 ml/phút
- Thể tích gradient: 22 thể tích cột ứng với 28,6 ml

Bảng 4.9 Quy trình 3: Các bước cho máy BioLogic DuoFlow thực hiện.

Volume	Description	Parameters			
1	0.00	Collection Fractions of size 2.00 ml during entire run			
2	0.00	Isocratic Flow	A: acetate ,50mM, pH5	100%	Volume: 1.00 ml
			B: Acetate 50Mm,pH5 ,NaCl (0%	Flow: 1.00 ml/min
3	1.00	Zero Baseline	QuadTec		
4	1.00	Load/Inject Sample	Sample		Volume: 1.00 ml
			Static Loop	Auto Inject Valve	Flow: 1.00 ml/min
5	2.00	Isocratic Flow	A: acetate ,50mM, pH5	100%	Volume: 5.20 ml
				B: Acetate 50Mm,pH5 ,NaCl (0%
6	7.20	Linear Gradient	A: acetate ,50mM, pH5	100% ----> 50%	Volume: 13.00 ml
				B: Acetate 50Mm,pH5 ,NaCl (0% ----> 50%
7	20.20	Linear Gradient	A: acetate ,50mM, pH5	50% ----> 0%	Volume: 5.20 ml
				B: Acetate 50Mm,pH5 ,NaCl (50% ----> 100%
8	25.40	Linear Gradient	A: acetate ,50mM, pH5	0% ----> 0%	Volume: 10.40 ml
				B: Acetate 50Mm,pH5 ,NaCl (100% ----> 100%
9	35.80	Isocratic Flow	A: acetate ,50mM, pH5	100%	Volume: 6.50 ml
				B: Acetate 50Mm,pH5 ,NaCl (0%
	42.30	End of Protocol			

**Hình 4.5 Sắc ký đồ tinh sạch enzyme bromelain thân của quy trình 3**

Dựa vào sắc ký đồ:

- Quá trình tinh sạch cũng thu được hai peak rõ ràng hơn quy trình 2
- Ở tốc độ dòng 1 ml/phút thì các peak được rửa giải ra từ ống thứ 11 đến ống 18.
- Cũng dựa vào sắc ký đồ chúng tôi tiến hành kéo dài thêm thể tích rửa giải gradient lên thành 24 thể tích cột (tương ứng với 31,2 ml) nhưng thấy rằng sự phân tách cũng giống như hình quy trình 3 nhưng khi tiến hành gom các ống của peak 2 thì bị mất hoạt tính có lẽ là do các ống cuối cùng không phải là enzyme quan tâm nên nó ảnh hưởng rất lớn đến hoạt tính trung bình của peak 2.

Vì vậy chúng tôi đã chọn quy trình 3 với thể tích gradient là 22V ứng với 28,6 ml, tốc độ dòng 1 ml/phút để tiến hành nhiều lần chạy lặp lại và cho kết quả ổn định như sắc ký đồ trên. Dựa vào sắc ký đồ của quy trình 3 chúng tôi chỉ thu 12 ml enzyme tinh sạch gồm các ống của peak 1 và 2. Cụ thể là:

Peak I gồm ống 13; 14; 15 với thể tích 6 ml

Peak II gồm ống 16; 17; 18 với thể tích 6 ml

Sau đó gom các ống thuộc cùng 1 peak đem đi xác định protein tổng số và hoạt tính enzyme sau tinh sạch.

Các nghiên cứu tham khảo

Kết quả nghiên cứu của Alfonso (1994) cũng chỉ ra hai phân đoạn chính của enzyme bromelain thân được tinh sạch bởi sắc ký lọc gel trên cột TSK HW-50 và sắc ký trao đổi ion trên cột TSK-SP5PW (Merck).

Tiếp sau đó Andrew (1994) cũng đã tinh sạch được từ thân dứa hai phân đoạn chính của bromelain và hai phân đoạn phụ là ananain và comosain phát hiện với nồng độ rất thấp trên cột trao đổi ion Pharmacia HR 5/5 Mono S. Sau đó tiếp tục chạy sắc ký trên cột thứ hai là S-Sepharose thì phát hiện hai phân đoạn phụ rõ ràng hơn.

Vì vậy thí nghiệm của chúng tôi cho kết quả phù hợp với các nghiên cứu trước.

4.2.2. Kết quả của quá trình tinh sạch

a. Hàm lượng protein và hoạt tính bromelain trước tinh sạch

Bảng 4.10 Hàm lượng protein và hoạt tính enzyme của dịch tủa acetone trước tinh sạch

Lượng protein/1ml (mg/ml)	Hoạt tính enzyme/1ml (UI/ml)	Hoạt tính đặc hiệu (UI/mg)
1,24	44,88	36.19

(Xem kết quả đo phân phụ lục 1)

Các kết quả ở bảng 4.10 trích từ kết quả của bảng 4.4 do thể tích protein/enzyme đưa vào cột UNO-S là 1 ml.

b. Hàm lượng protein và hoạt tính bromelain sau tinh sạch

Bảng 4.11 Hàm lượng protein và hoạt tính bromelain của hai peak sau tinh sạch

	Lượng protein thu được (mg)	Hoạt tính thu được (UI)	Hoạt tính riêng thu được (UI/mg)	Hiệu suất tinh sạch
Peak I	0,3	20,06	61,84	1,71
Peak II	0,232	12,84		

(Xem kết quả đo phần phụ lục 1)

Nhận xét:

Sau khi tinh sạch hàm lượng protein và hoạt tính thu được (lần lượt là 0,53 mg, 32,9 UI) đều giảm so với trước tinh sạch (1,24 mg, 44,88 UI) nhưng hoạt tính enzyme đặc hiệu tăng (61,84 UI/mg so với 36,19 UI/mg). Hiệu quả tinh sạch của cột ở giai đoạn này là hoạt tính đặc hiệu tăng lên 1,71 lần. Đến đây enzyme sau tinh sạch có hoạt tính đặc hiệu cao nhất chứng tỏ quy trình tinh sạch này đã đạt yêu cầu.

c. Hiệu suất tinh sạch qua các giai đoạn

Bảng 4.12 Hiệu suất tinh sạch qua các giai đoạn

	Lượng protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (UI)	Hoạt tính đặc hiệu (UI/mg)
Dịch thô (50ml)	40,5 (100 %)	451 (100 %)	11.12 (100 %)
Dịch tủa (9ml)	11,16 (27,6 %)	403,92 (89,56 %)	36.19 (323 %)
Enzyme tinh sạch	4,77 (11,7 %)	296,1 (65,65 %)	61,84 (556 %)

Qua bảng trên

- Lượng enzyme bromelain thu hồi được là 4,77 mg chiếm 11,7 % so với hàm lượng protein tổng của dịch thô ban đầu.
- Hoạt tính enzyme bromelain thu được là 296,1 UI chiếm 65,65 % so với tổng hoạt tính của dịch thô ban đầu.
- Hoạt tính đặc hiệu của enzyme bromelain thu được là 61,84 UI/mg tăng lên 5,56 lần so với hoạt tính đặc hiệu của dịch thô ban đầu.

Tóm lược kết quả của bảng 4.12

Từ 97 gam thân dừa nhận được được 50 ml dịch thô, sau khi rửa bằng acetone thu được 9 ml dịch rửa, sau khi qua cột sắc ký nhận được 108ml dịch enzyme tinh khiết với nồng độ là 0,53 mg/ml (chiếm 11,7% protein tổng số), hiệu suất thu hồi hoạt tính 65,65 % và hoạt tính đặc hiệu của enzyme bromelain thân tăng lên 5,56 lần so với dịch thô ban đầu.

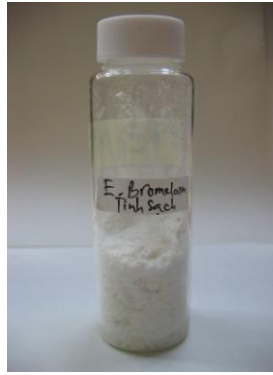
Qua từng bước của quá trình tinh sạch thì hoạt tính đặc hiệu của enzyme được tăng lên cho thấy của quy trình tinh sạch do chúng tôi xây dựng có hiệu quả.

Tuy nhiên, cũng qua từng bước của quy trình ta thấy lượng protein giảm đáng kể chỉ còn lại 11,7% nên ảnh hưởng lớn đến năng suất thu hồi sản phẩm. Do đó quy trình cần được cải thiện hơn nữa để giảm sự mất mát protein và đồng thời tăng tổng hoạt tính của enzyme để hoạt tính đặc hiệu sau cùng tăng được cải thiện.

4.3. Đông khô sản phẩm

- Trong khi phương pháp sản xuất enzyme bromelain thô dạng bột (bằng cách rửa dịch protein thô với muối amonium sulfate, sau đó rửa rửa hút ẩm hay sấy khô) thì lẫn amonium Sulfat nhưng dạng này dễ vận chuyển, tồn trữ còn enzyme thu được từ cột sắc ký thì khá tinh sạch, hoạt tính cao nhưng sản phẩm ở dạng lỏng khó cho bảo quản, vận chuyển. Xuất phát từ các ưu, nhược điểm trên và mong muốn có được sản phẩm bromelain dạng bột tinh sạch có hoạt tính cao, dễ vận chuyển, bảo quản đồng thời tận dụng được nguồn nguyên liệu từ phụ phẩm thân dừa chúng tôi đã mang sản phẩm sau tinh sạch bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion đông khô.

- Qua 60 giờ đông khô lượng enzyme tinh sạch là 108 ml bằng máy Lyopro 6000 thì thu được 4,6 g enzyme dạng bột (chiếm 4,7% so với trọng lượng thân dừa ban đầu làm thí nghiệm)



Hình 4.6 Sản phẩm enzyme bromelain thân đông khô

Qua khảo sát sau 4 tuần đầu hàm lượng và hoạt tính ban đầu của sản phẩm đông khô là không thay đổi nếu bảo quản ở nhiệt độ -20°C . Cụ thể như sau:

4.3.1. Kết quả đo hàm lượng protein enzyme sau đông khô 2 tuần; 4 tuần.

Bảng 4.13. Hàm lượng protein enzyme sau đông khô 2 tuần; 4 tuần.

	Lượng protein trên 1ml enzyme (mg/ml)
Enzyme đông khô sau 2 tuần	0,527
Enzyme đông khô sau 4 tuần	0,531

(Xem kết quả đo phần phụ lục 1)

4.3.2. Kết quả hoạt tính enzyme sau đông khô 2 tuần; 4 tuần

Bảng 4.14 Hoạt tính enzyme sau đông khô 2 tuần; 4 tuần

	Hoạt tính enzyme trên 1ml (UI/ml)
Enzyme đông khô sau 2 tuần	32,164
Enzyme đông khô sau 4 tuần	32,322

(Xem kết quả đo phần phụ lục 1)

Hoạt tính đặc hiệu của enzyme sau khi đông khô 2 tuần là 61,03 UI/mg.

Hoạt tính đặc hiệu của enzyme sau khi đông khô 4 tuần là 60,87 UI/mg.

Nhận xét

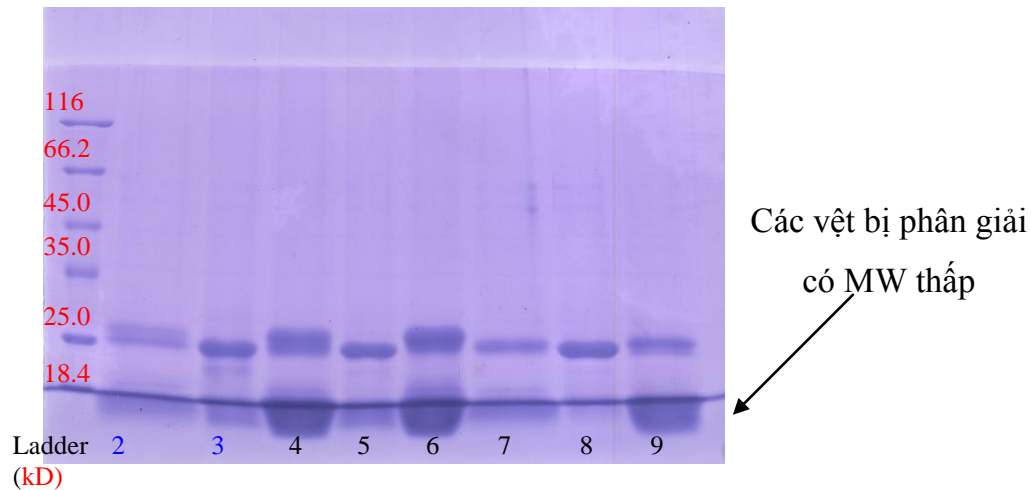
Như vậy qua khảo sát ban đầu hàm lượng và hoạt tính enzyme tinh sạch sau 4 tuần đông khô là không thay đổi.

Do enzyme rất dễ bị mất hoạt tính trong thời gian tồn trữ và để bảo bảo vệ hoạt tính của enzyme sau này nên chúng tôi cần phải tiến hành kiểm tra thường xuyên hàm lượng và hoạt tính của chúng cứ 2 tuần một lần trong thời gian dài.

Do giới hạn về thời gian của đề tài chúng tôi chỉ khảo sát hàm lượng và hoạt tính enzyme tinh sạch sau 4 tuần đông khô.

4.4. Kết quả điện di xác định trọng lượng phân tử và độ tinh sạch

Muốn biết sản phẩm sau khi thực hiện bằng phương pháp sắc ký có tinh sạch hay không thì phải đưa lên điện di SDS-PAGE để xác định trọng lượng phân tử và độ tinh sạch của chúng.



Hình 4.7 Kết quả điện di SDS-PAGE

Giếng 1 : Thang protein chuẩn

Giếng 2 : Enzyme bromelain từ dịch Cayenne thân tủa acetone

Giếng 3 : Enzyme bromelain từ Cayenne thân tinh sạch peakI (quy trình 1)

Giếng 4 : Enzyme bromelain từ Cayenne thân tinh sạch peakII (quy trình 1)

Giếng 5 : Enzyme bromelain từ Cayenne thân tinh sạch peakI (quy trình 3)

Giếng 6 : Enzyme bromelain từ Cayenne thân tinh sạch peakII (quy trình 3)

Giếng 7 : Enzyme bromelain từ dịch Queen thân tủa acetone

Giếng 8 : Enzyme bromelain từ Queen thân tinh sạch peak I

Giếng 9: Enzyme bromelain từ Queen thân tinh sạch peak II

Bảng 4.15 Trọng lượng phân tử các protein chuẩn của hãng Fermentas

Protein	Nguồn	Trọng lượng phân tử, kD
β -galactosidase	E.coli	116.0
Bovine serum albumin	Bovine plasma	66.2
Ovalbumin	Chicken egg white	45.0
Lactate dehydrogenase	Porcine muscle	35.0
Restriction endonuclease Bsp981	E.coli	25.0
β -lactoglobulin	Bovine milk	18.4

Trước khi đưa ra nhận xét chúng ta lược khảo qua một số tài liệu nói về thành phần các phân đoạn của enzyme bromelain thân và cũng cần nhắc lại enzyme bromelain thân là tên gọi của một nhóm cystein protease được ly trích từ thân.

Thành phần của bromelain thân khá phức tạp, có đến 6 loại cystein protease khác nhau được tìm thấy trong bromelain thân (Collins, 1960; Rowan và Buttle, 1994). Trong khi đó, theo Nguyễn Đức Lượng (2004) thì hiện tại người ta ghi nhận được trong thân dứa có tám thành phần cơ bản có hoạt tính thủy phân protein, hai phân đoạn chính được gọi là F4 và F5 đã được tinh sạch qua sắc ký trên Duolite CS101 ở pH 6,05 với hoạt tính xúc tác phân giải BAEE, casein và glucagon.

Theo Murachi và cộng sự năm 1964 đã nghiên cứu về tính chất vật lý của enzyme bromelain trích từ thân cây dứa và cho rằng trọng lượng phân tử của chúng là: 33.200-33.500 Da. Nhưng theo Alfonso A.R. và cộng sự 1994 qua nghiên cứu thực nghiệm đã chỉ ra bromelain thân có trọng lượng phân tử 25.400 Da.

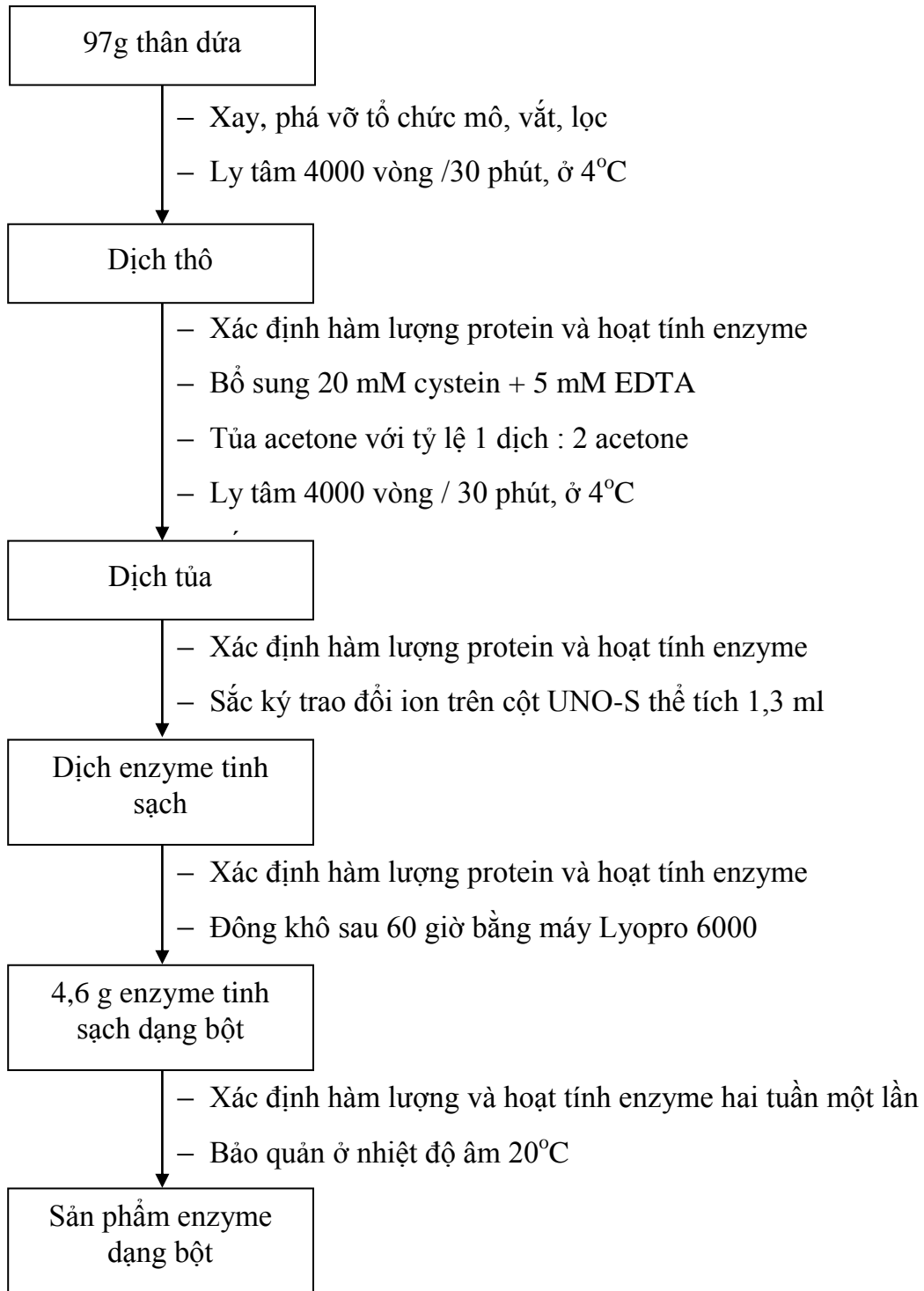
Trong đề tài này qua sắc ký trao đổi ion âm trên cột UNO S chúng tôi cũng thu được hai phân đoạn chính có trọng lượng phân tử khoảng 25 kD và có hoạt tính phân giải casein mà chúng tôi đã tiến hành xác định trong suốt quá trình thực hiện đề tài. Cũng do giới hạn của đề tài nên chúng tôi không đi sâu vào nghiên cứu cấu trúc, phân loại các phân đoạn của enzyme bromelain từ thân.

Nhận xét

Dựa vào điện di đồ và các protein chuẩn có trọng lượng phân tử đã biết ta dễ dàng nhận thấy dải băng protein duy nhất có trọng lượng phân tử của bromelain thân khoảng 25 kD. Các vệt có trọng lượng phân tử thấp có thể là do quá trình tự phân giải của enzyme bromelain khi chúng không được bổ sung chất bảo vệ hoạt tính phenylmercuric acetate (ngăn chặn sự tự phân giải trong điện di). Phenylmercuric acetate là một chất cực độc, do đó chúng tôi không sử dụng chất này khi bổ sung vào enzyme vì rất khó loại bỏ chúng.

Dựa vào điện di đồ rất khó xác định cụ thể sự khác nhau giữa các band của mẫu tủa acetone và mẫu tinh sạch qua cột trao đổi ion vì phương pháp điện di SDS-PAGE còn nhiều giới hạn khi áp dụng với mẫu protein. Để có thể xác định rõ hơn sự khác biệt giữa mẫu thô, mẫu tinh sạch; phát hiện một số phân đoạn bromelain khác thì cần phải nghiên cứu sâu hơn trên hệ thống điện di hai chiều.

Qua các kết quả vừa trình bày như trên, chúng tôi đề nghị quy trình tinh sạch enzyme bromelain từ thân bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion theo sơ đồ như sau:



Sơ đồ 4.2 Quy trình tinh sạch enzyme bromelain thân bằng sắc ký trao đổi ion.

Chúng tôi cũng đã tính giá tham khảo của 1 gam enzyme bromelain thân tinh sạch như sơ đồ 4.2 và so sánh với các sản phẩm enzyme của các hãng khác (xem phần phụ lục 3).

PHẦN 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

Từ những kết quả thu được qua các thí nghiệm, chúng tôi đã xây dựng được 2 quy trình sản xuất enzyme bromelain thân:

- Quy trình đơn giản sản xuất enzyme bromelain thô từ thân dứa bằng tác nhân tủa amonium sulfate (sơ đồ 4.1): từ 97 gam thân dứa thu được 5,08 gam sản phẩm enzyme dạng thô với hàm lượng protein là 26,7 mg và tổng hoạt tính enzyme là 414,7 UI và hoạt tính đặc hiệu là 15,53 UI/mg.
- Quy trình tinh sạch enzyme bromelain thân bằng tác nhân tủa acetone và sắc ký trao đổi ion trên cột trao đổi ion dương UNO-S (sơ đồ 4.2):

- Từ 97 gam thân dứa thu được 4,6 gam enzyme bromelain thân tinh khiết dạng bột với hàm lượng protein là 4,77 mg và tổng hoạt tính enzyme là 296,1 UI và hoạt tính đặc hiệu là 61,84 UI không thay đổi sau 4 tuần đầu đông khô.
- Hiệu suất tinh sạch của cột UNO đối với enzyme bromelain thân trong thí nghiệm của chúng tôi là 1,71; hoạt tính đặc hiệu của enzyme bromelain thân thu được là 61,84 UI/mg tăng lên 5,56 lần so với hoạt tính đặc hiệu ban đầu trong dịch thô là 11,12 UI/mg.

Như vậy, tùy vào mục đích sản xuất, thiết bị sẵn có mà chọn tác nhân tủa cho phù hợp:

- Nếu chỉ tinh sạch ở mức độ ban đầu: dịch thô được kết tủa protein sau đó rửa tủa, hút ẩm hoặc sấy khô cho sản phẩm dạng thô thì chọn tác nhân tủa là amonium sulfate
- Nếu tinh sạch ở các mức độ tiếp theo: dịch thô được kết tủa protein, dịch tủa cho qua cột sắc ký, đông khô sản phẩm thì nên chọn tác nhân tủa là acetone (tinh sạch bằng hệ thống sắc ký áp suất cao BioLogic DuoFlow, đông khô bằng máy Lyopro 6000).

5.2. Đề nghị

- Tiếp tục tiến hành các thí nghiệm để nâng cao hiệu quả tinh sạch của enzyme bromelain trên cột UNO-S và các loại cột khác.
- Từ quy trình tinh sạch enzyme enzyme bromelain bằng phương pháp trao đổi ion trên qui mô nhỏ làm cơ sở cho việc mở rộng ở qui mô lớn hơn. Muốn vậy phải kiểm tra những chỉ tiêu an toàn trong ngành dược về độ tinh sạch của sản phẩm như: hàm lượng Pb-carbonize, arsenic, cyanure.
- Khảo sát các điều kiện bảo quản, các chất bảo vệ hoạt tính trong quá trình từ tủa protein, tinh sạch, đông khô sản phẩm đến tồn trữ.
 - Trong thí nghiệm của chúng tôi với mục đích tạo enzyme tinh khiết dùng trong y dược thì dùng chất bảo vệ hoạt tính là cystein .
 - Nhưng khi đưa lên quy mô sản xuất lớn hơn thì nên chọn những chất dễ kiếm, rẻ tiền, và an toàn như là các đường: trehalose, lactose, maltose, sucrose, fructose, glucose.
- Khảo sát khả năng thủy phân của enzyme sau tinh sạch trên đối tượng đề nghị là bánh dầu đậu nành.
- Kiểm định lại sản phẩm xem có đúng là enzyme bromelain thân không bởi kỹ thuật khối phổ, xem đặc tính enzyme có giống các enzyme đã nghiên cứu trước đây hay có biến đổi nào không.

PHẦN 6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng việt

1. Phạm Thị Trân Châu, Phan Tiến Hoà và Nguyễn Thị Bảo, 1987. *Thành phần và một số tính chất của chế phẩm bromelain chồi ngọn Dứa tây (Ananas comosus L.- Group Queen)*. Tạp chí sinh học, 9(4), tr.3-9.
2. Dương Thị Hương Giang, 2004. *Giáo trình thực tập công nghệ enzyme*. Trường Đại Học Cần Thơ.
3. Dương Thị Hương Giang, Lê Thanh Hùng, Võ Văn Song Toàn, Sonia Beeckmans, Edilbert Van Driessche và Trần Phước Đường, 2002. *Đánh giá các phương pháp ly trích enzyme bromelain từ nước khóm thô*. Tuyển tập các công trình nghiên cứu khoa học, Trường Đại Học Cần Thơ.
4. Phạm Thị Ánh Hồng, 2003. *Kỹ thuật sinh hóa*. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia TP.HCM.
5. Nguyễn Văn Kế, 2001. *Cây ăn quả nhiệt đới, tập 1*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Tp. Hồ Chí Minh
6. Nguyễn Đức Lượng, 2004. *Công nghệ enzyme*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP.HCM.
7. Lê Thị Thanh Mai, 1997. *Nghiên cứu về bromelain và con đường ứng dụng của chúng, luận án phó tiến sĩ sinh học*. Trường đại học khoa học tự nhiên, Đại học quốc gia TP.HCM.
8. Trần Văn Phú, 2001. *Tính toán và thiết kế hệ thống sấy*. Nhà xuất bản Giáo Dục.
9. Nguyễn Tiến Thắng, 2004. *Giáo trình Công nghệ enzyme*. Tủ sách trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.
10. Nguyễn Tiến Thắng, 2003. *Một số kỹ thuật phòng thí nghiệm sinh học*. Tủ sách Viện Sinh Học Nhiệt Đới.
11. Trần Thế Tục và Vũ Mạnh Hải, 2000. *Kỹ thuật trồng dứa*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.

Tài liệu tiếng nước ngoài

12. Alfonso A.R., Roberto A.E. 1994. *Circular dichroism of stem bromelain: a third spectral class with the family of cysteine proteinases*. Biochem. J. (1994) 300, 107-110.
13. Anthony J. and Cichoke D.C, 1998. *bromelain*. Keats Publishing, Inc. New Canaan, Connecticut.
14. Bradford, MM. *A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry 72: 248-254, 1976.
15. Chandler D.S and Mynott T.L, 1998. *bromelain protects piglets from diarrhea caused by oral challenge with K88 positive enterotoxigenic Escherichia Coli*. Gut. 43 (2): 196-202.
16. Clive Dennison, *A Guide to Protein Isolation*. Kluwer Academic Publisher, New York, 2002.
17. Collins J.L. 1960. *The pineapple*. New York: Interscience
18. Hames, P.D., 1998. *Gel electrophoresis of proteins*. A practical approach. 3th ed. Oxford
19. Liang H. H., Huang H. H., Kwok K. C, 1999. *Properties of tea-polyphenol-complexed bromelain*. Food Research International 32, pp. 545-551.
20. Morton, J. F., Pineapple in: Major Medicinal Plants: “Botany, Culture and Uses”
21. Murachi, T., 1970. *Method enzymol.* 19, 273-284.
22. Nielsen P. M., Petersen D., Dambmann C, 2001. *Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis*. Journal of food science, Vol. 66, No. 2, pp. 642-646
23. Rajni, H.K. *The workshop 2005 “ Enzyme Technology and Biosensors”*. Hanoi, 03/2005.
24. Salem F. M. A., Somaya M. A. A., Seliem E. I, 1995. *Manufacturing of fish sauce by proteolytic enzymes*. Department of food technology in national research centre, Dokki, Cairo, Egypt.
25. Stein Ivar Aspmo, Svein Jarie Horn, Vincent G. H. Eijsink, 2004. *Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (Gadus morhua L.) viscera*. Process Biochemistry.

Tài liệu internet

26. http://www.vi.wikipedia.org/wiki/Họ_Dứa

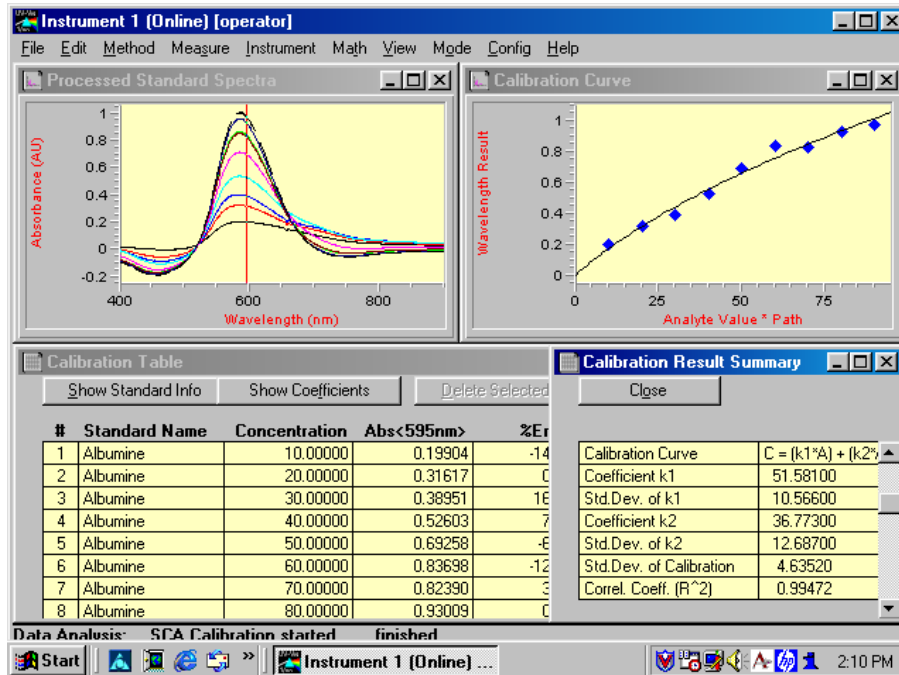
27. <http://www.apsnet.org/online/feature/pineapple/>

28. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/3422.html>

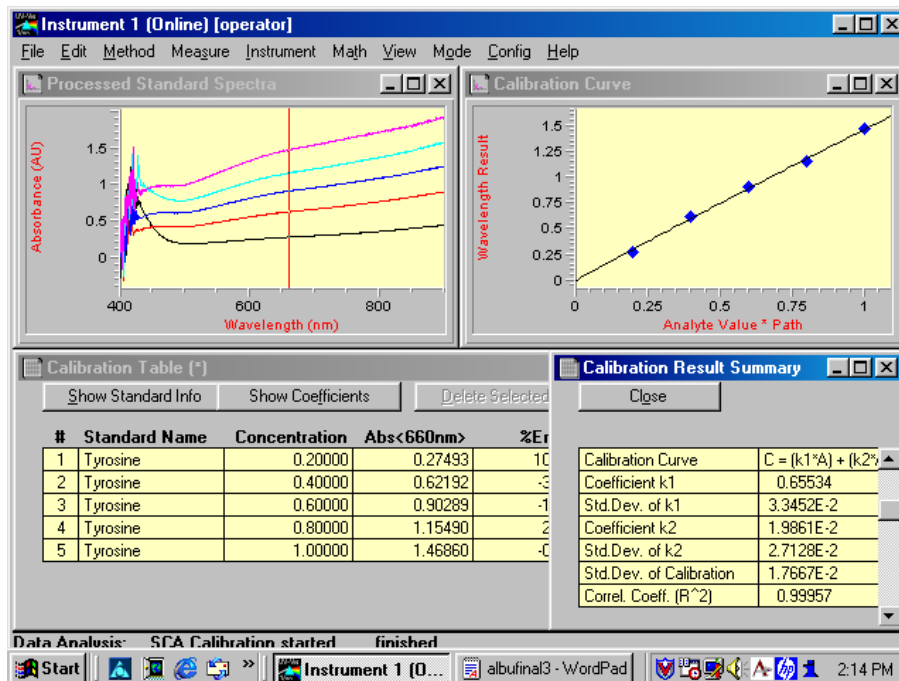
29. <http://www.bio-rad.com/life-science-research/chromatography>

PHỤ LỤC 1

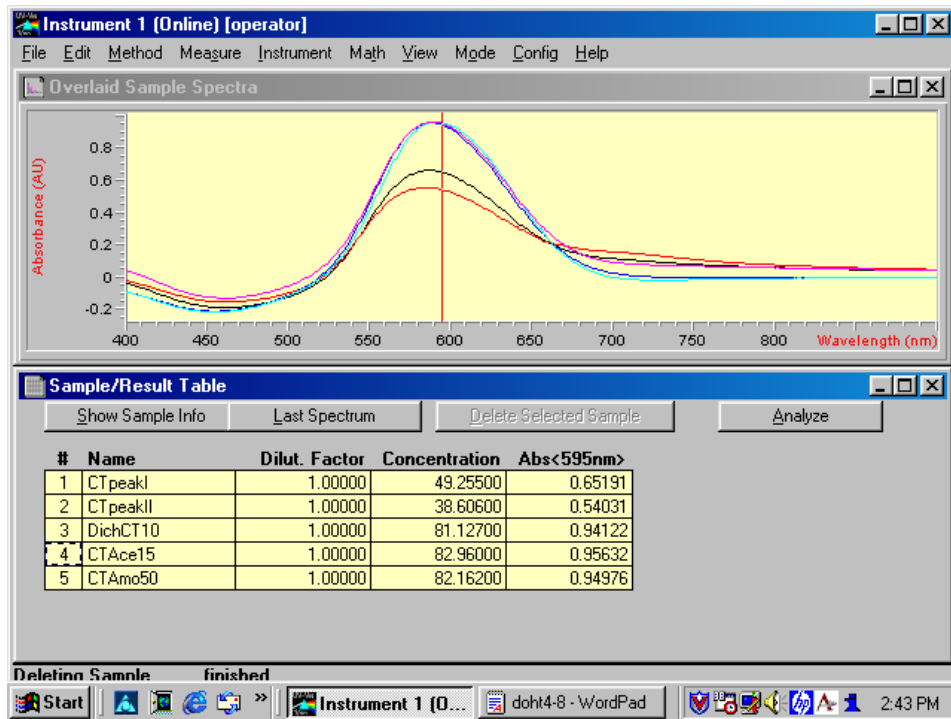
Các hình, bảng kết quả xác định hàm lượng protein và hoạt tính enzyme qua các giai đoạn tinh sạch.



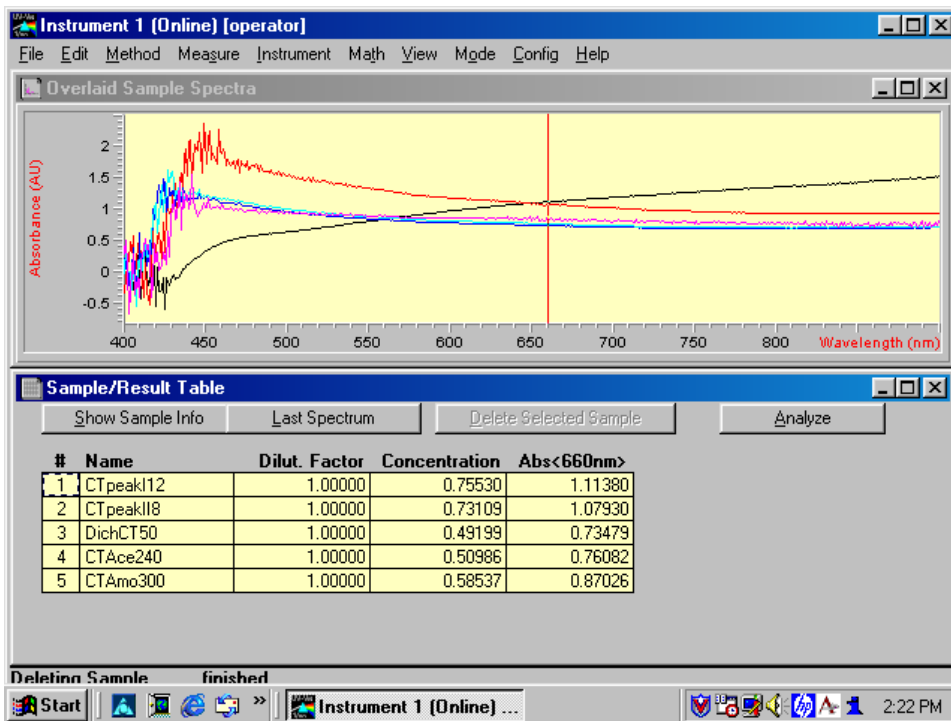
Hình: đường chuẩn albumin



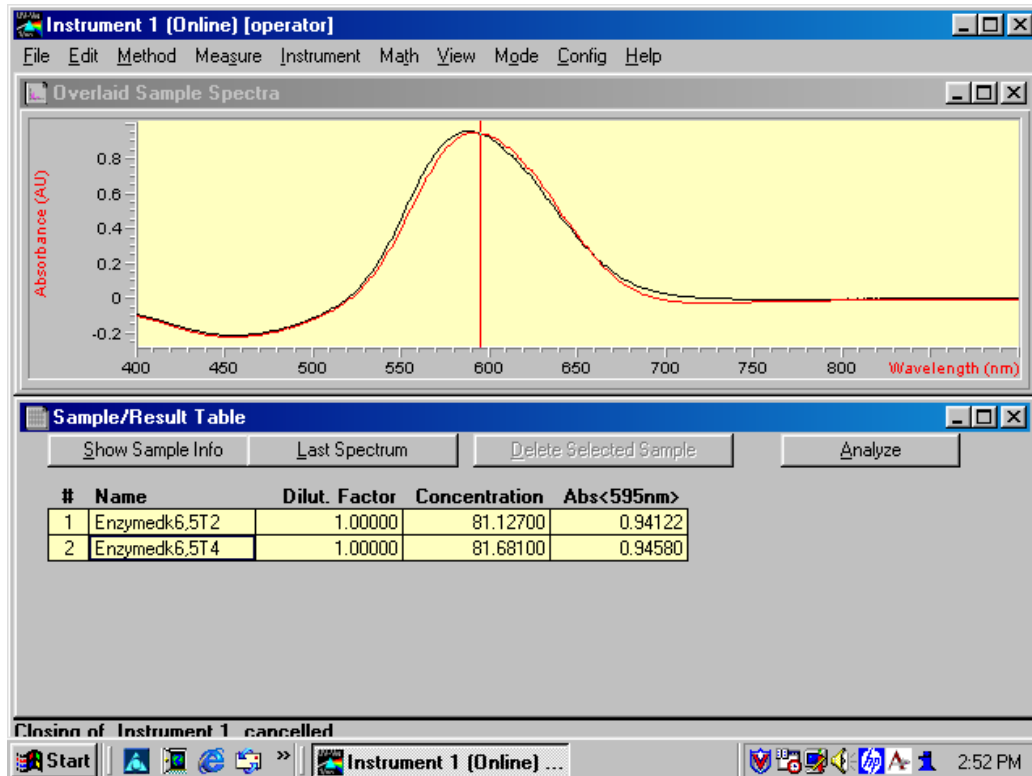
Hình: đường chuẩn tyrosine



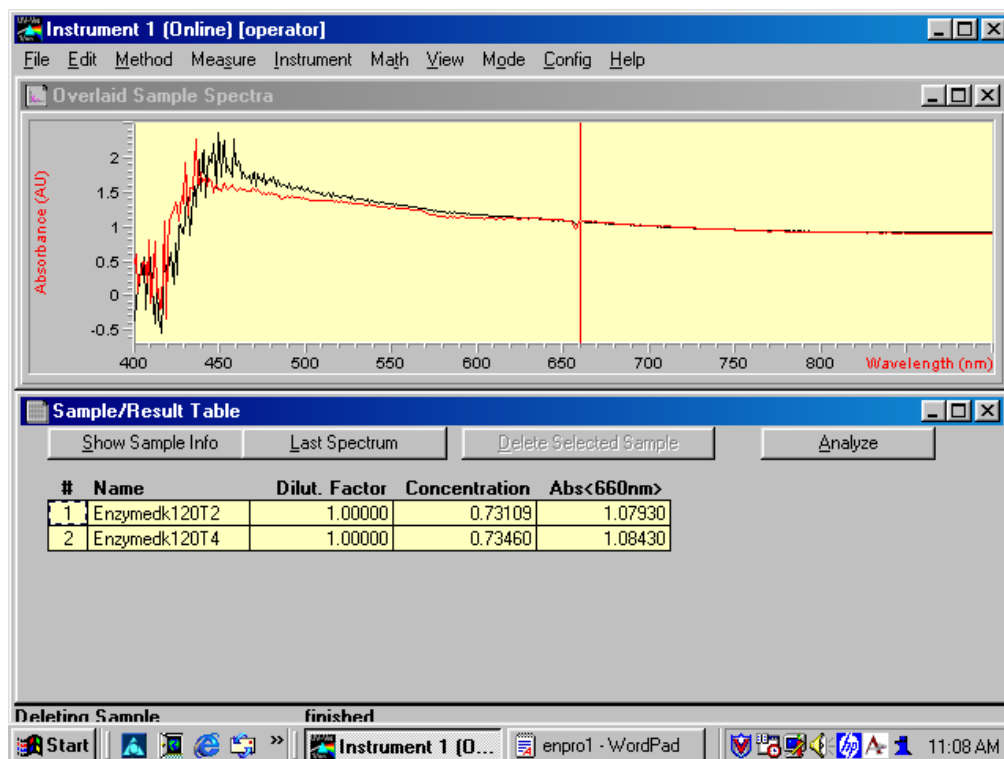
Hình: kết quả đo protein tổng số



Hình: kết quả đo hoạt tính enzyme



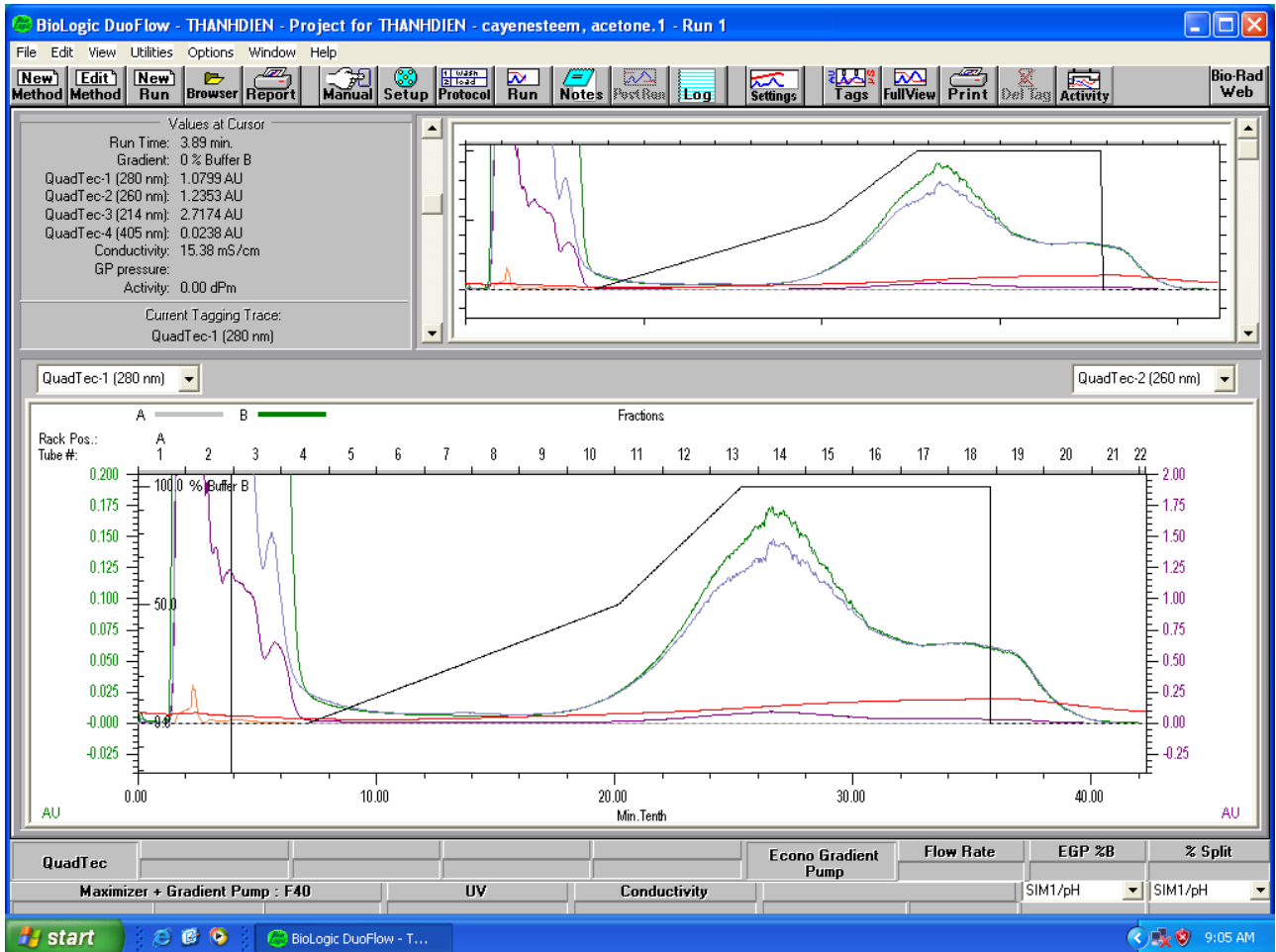
Hình: đo protein tổng số của enzyme sau khi đông khô



Hình: đo hoạt tính enzyme sau đông khô

PHỤ LỤC 2

Hình sắc ký đồ trao đổi ion trên hệ thống BioLogic DuoFlow



Hình: sắc ký đồ enzyme bromelain thân trên cột UNO-S (quy trình 3)

PHỤ LỤC 3

Giới thiệu hệ thống máy sắc ký Biologic Duo-Flow

Hệ thống sắc ký cột lỏng tinh sạch protein BioLogic DuoFlow của hãng Bio-rad bao gồm:

1. Đầu dò QuadTec UV/Vis
2. Valve SV5-4
3. Mixers
4. Valve AVR9-8 stream select
5. Hệ thống trộn buffer BioLogic maximizer
6. Đầu dò pH

7. Hệ thống đầu bơm gradient kép F40 Duo Flow Workstation
8. Hệ thống thu mẫu phân đoạn BioFrac Collection
9. Valve bơm mẫu AVR 7-3
10. Cột UNO S1
11. BioLogic Rack
12. Phần mềm xử lý
13. Bộ phận nối USB Bitbus
14. Bộ điều khiển Dell

Trong phạm vi giới hạn của đề tài chúng tôi chỉ đề cập đến các thông số chính của các bộ phận sử dụng:

Phần mềm xử lý

Hệ thống điều khiển chạy trên phần mềm BioLogic DuoFlow phiên bản 4.0 trong giao diện Window XP.

Valve bơm mẫu AVR 7-3

Đây là một valve áp suất cao, nó có thể nâng áp suất lên tới 3500 psi (233 bar). Chúng tôi dùng xy lanh để bơm mẫu vào valve này.

Cột UNO S1

Đây là loại cột trao đổi cation được thiết kế sẵn cho sự phân tách ở tốc độ dòng cao với áp suất ngược thấp (low back pressure). Cột này được nhồi với chất nền polymer là continuous bed matrix để cải thiện sự phân giải, tốc độ và khả năng bám. Thể tích của cột là 1,3 ml.

Hệ thống đầu bơm gradient kép F40 Duo Flow Workstation

- Tốc độ dòng: 0.01-80 ml/phút, bước điều chỉnh 0.01 ml
- Áp lực tối đa: 3500 psi

Ở đây chúng tôi sử dụng tốc độ dòng: 1 - 4 ml/phút; áp lực tối đa: 20-700 psi tương thích với các thông số của cột UNO-S.

Đầu dò QuadTec UV/Vis (Model Biologic Quadtec UV/Vis Detector)

Chúng tôi điều chỉnh để đầu dò có thể đọc mẫu vừa ra khỏi cột đồng thời ở 4 bước sóng : 214 nm, 260 nm, 280 nm, 405 nm.

Hệ thống thu mẫu phân đoạn BioFrac Collection

Tự động thu mẫu khi kết nối với DuoFlow được điều khiển bằng phần mềm.

PHỤ LỤC 4

Một số công thức pha hóa chất cho điện di SDS-PAGE

- 1 lit dung dịch chạy điện di có chứa
 - 6 g Tris
 - 28.8 g Glycerol
 - 1 g SDS
- 20ml dung dịch chuẩn bị mẫu có chứa
 - 0.6 M Tris-HCl, pH 6.8 5 ml
 - SDS 10 % 4 ml
 - Glycerol 98 % 2 ml
 - β -mercapthoethanol 1 ml
 - H₂O 8 ml
 - Bromophenol blue 0.5 %
- 100 ml dung dịch nhuộm gel
 - 0.1 g coomassie R-250
 - 50 ml methanol
 - 40 ml nước cất
 - 10 ml acid acetic 100 %
- 1 lit dung dịch rửa gel
 - 100 ml methanol
 - 70 ml acid acetic 100 %.
 - 830 ml nước

PHỤ LỤC 5

Một số tính toán giá thành sản phẩm

Bảng giá hóa chất

Amonium sulfate	520.000 đ/kg
-----------------	--------------

Acetone	150.000 đ/l
EDTA	376.000 đ/100g
Cystein	710.000 đ/100g
Amonium acetate	320.000 đ/500g
Acid acetic	250.000 đ/l
NaCl	245.000 đ/kg
CBB G250	920.000 đ/25g
Ethanol	285.000 đ/l
Acid phosphoric	780.000 đ/l
Albumin	1.085.000 đ/25g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	265.000 đ/500g
KH ₂ PO ₄	280.000 đ/250g
Casein	1.095.000 đ/kg
NaOH	245.000 đ/kg
HCl	220.000 đ/l
Tyrosine	344.000 đ/25g
Folin	340.000 đ/100ml
Bromelain	360.000 đ/25g

Giá tham khảo của enzyme bromelain của 2 quy trình enzyme thô và tinh sạch (chưa tính khấu hao thiết bị và công lao động)

Theo tính toán đơn giản ban đầu của chúng tôi giá tham khảo của 1 gam enzyme bromelain thô khi dùng với amonium sulfate là 5.200 đồng/1gam với hoạt tính đặc hiệu 15,53 UI/mg trong khi đó với acetone là 8.500 đồng/1gam với hoạt tính đặc hiệu 36,19 UI/mg.

Giá tham khảo của 1 gam enzyme bromelain thân tinh sạch như sơ đồ 4.2 vào khoảng 49.700 đồng với hoạt tính đặc hiệu 61,84 UI/mg. Trong khi đó 25 gam enzyme bromelain của hãng Merck có giá 360.000 đồng với hoạt tính đặc hiệu là 2 UI/mg, như vậy tính ra 1 gam enzyme của hãng này có giá 14.000 đồng.

Các tính toán cụ thể như sau:

❖ **Tính giá cho 1 phản ứng xác định hàm lượng protein tổng số**

-Hóa chất cho 250 phản ứng xác định hàm lượng protein tổng số

50 mg coomassie brilliant blue G250:	1.840 đ
23,5 g ethanol 96°:	6.700 đ
42,5 g H ₃ PO ₄ 85:	33.150 đ
10 mg albumin:	434 đ
-Điện, nước:	8.000 đ
-Tổng cộng:	50.000 đ

Như vậy 1 phản ứng xác định hàm lượng protein tổng số có giá 200 đ.

❖ **Tính giá cho 1 phản ứng xác định hoạt tính enzyme**

-Hóa chất cho 20 phản ứng xác hoạt tính enzyme

2,967 g Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O:	1.572 đ
0,9072 g KH ₂ PO ₄ :	1.016 đ
1 g casein:	1.095 đ
10 g TCA :	1.610 đ
10g NaOH:	2.450đ
4,25 ml HCl đậm đặc:	935 đ
0,118 g tyrosine:	1.624 đ
12ml Folin:	40.800 đ
-Điện, nước:	8.000 đ
-Tổng cộng:	59.000 đ

Như vậy 1 phản ứng xác hoạt tính enzyme có giá 2.950 đồng

❖ **Quy trình tủa enzyme thô bằng tác nhân tủa amonium sulfate (thu**

được 5,08g)

-Hóa chất

23,6 g amonium sulfate:	12.272 đ
10ml acetone:	1500 đ
0,1 g EDTA:	376 đ
0,175 g cystein:	1.242 đ

-Xác định hàm lượng và hoạt tính:	3.150 đ
-Điện, nước :	8000 đ
-Tổng cộng:	26.540 đ

Như vậy 1 g enzyme bromelain thô được tính là: **5.200 đồng.**

❖ **Quy trình rửa enzyme thô bằng tác nhân rửa acetone (thu được 3,27g)**

-Hóa chất

100 ml acetone:	15.000 đ
0,1 g EDTA:	376 đ
0,175 g cystein:	1.242 đ
Xác định hàm lượng và hoạt tính:	3150 đ
Hao phí điện:	8000 đ
Tổng cộng:	27.768

Như vậy 1 g enzyme bromelain thô được tính là: **8.500 đồng**

❖ **Quy trình tinh sạch và đông khô enzyme (thu được 4,6g)**

Đệm amonium acetate 0.05 M, pH 5

100 ml đệm amonium acetate được tính:

35,2 ml amonium acetate:	86,4 đ
14,8 ml acid acetic:	3.700 đ
2,925 g NaCl:	716 đ

Giá tiền 100ml đệm: 4502,4 đ

1 quy trình chạy tốn 37,5 ml đệm → 9 quy trình chạy tốn 337,5 ml đệm

Như vậy toàn bộ chạy 9 lần chạy tốn: **14.466 đ**

Xác định hàm lượng và hoạt tính: 5*2.700= 13500 đ

Hóa chất

100 ml acetone:	15.000 đ
0,1 g EDTA:	376 đ
0,175 g cystein:	1.242 đ

Hao phí điện: 4000 đ + 180.000 đ(60 giờ đông khô): 184.000 đ

Tổng cộng: 228.584 đ

Như vậy 1g enzyme tinh sạch có giá : 49.700 đồng.