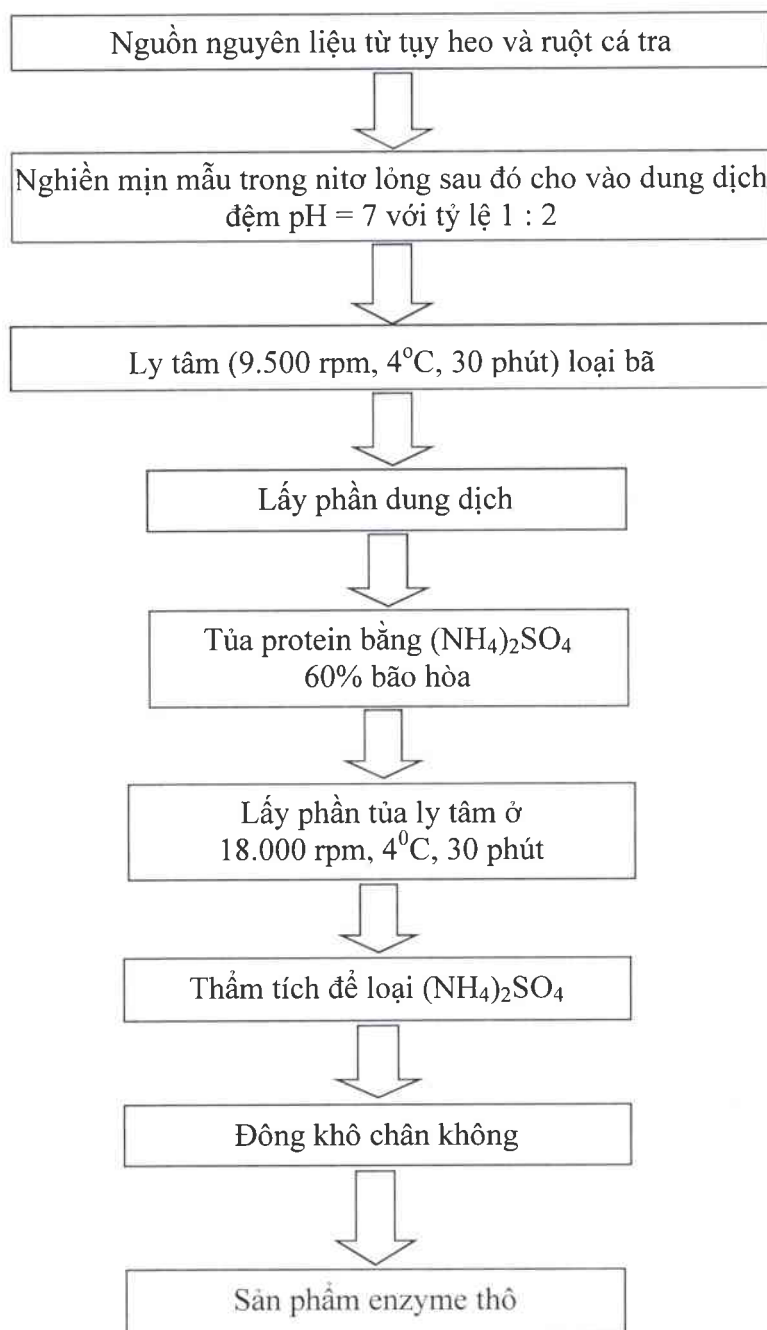


TÓM TẮT CÁC QUY TRÌNH KỸ THUẬT LY TRÍCH, TINH CHẾ VÀ BẢO QUẢN ENZYME

1. Phương pháp trích enzyme có kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Phương pháp trích enzyme bằng dung dịch đệm có kết tủa bằng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% bão hòa cho hiệu quả tốt trong việc ly trích enzyme với hàm lượng protein hòa tan thu được nhiều và hoạt độ amylase và protease tốt. Phương pháp này có thể được tóm tắt bằng hình 1.



Hình 1. Quy trình trích enzyme

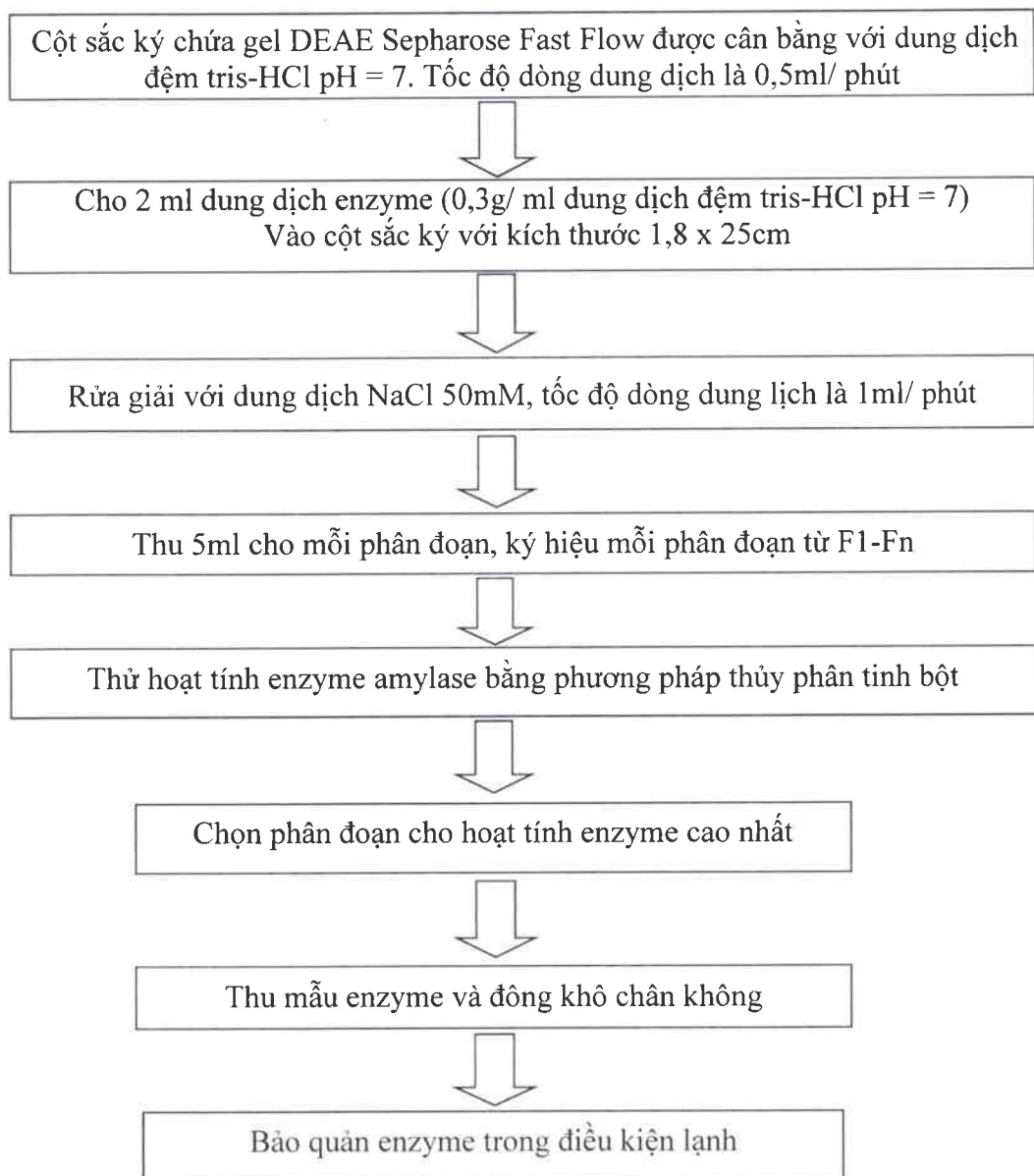
Mẫu tụy heo và gan cá tra được rửa sạch và loại tạp chất rồi đem nghiền mịn trong nitor lỏng. Enzyme được trích bằng dung dịch đệm phosphate pH = 7 với tỷ lệ 1 phần mẫu : 2 phần dung dịch đệm (w/v). Hỗn hợp được ly tâm lần thứ nhất ở 9500 rpm với nhiệt độ 4°C trong 30 phút để thu phần dung dịch và loại bỏ phần bã bên dưới ống nghiệm. Phần protein trong dung dịch được kết tủa bằng bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% bão hòa. Phần kết tủa được đem đi ly tâm ở 18.000 rpm với 4°C trong 30 phút để thu protein. Để loại bỏ muối lẫn trong protein, hỗn hợp được thẩm tích bằng túi thẩm tích Seamless Cellulose Tubing 36/32 (Viskase Companies, Inc). Cần dùng một thể tích lớn dung dịch đệm và thỉnh thoảng phải thay dung dịch đệm mới để loại hết muối ra khỏi mẫu (15 phút x 4 lần, 30 phút x 2 lần, 60 phút x 1 lần, và để qua đêm). Dung dịch đệm phía ngoài túi được khuấy liên tục bằng một máy khuấy từ, cả hệ thống được đặt trong điều kiện lạnh 4°C để đảm bảo enzyme không bị biến tính. Sau khi thẩm tích, mẫu được đông khô chân không ở nhiệt độ -70°C với áp suất gần bằng 0 atm. Quá trình này cho mẫu enzyme chưa qua tinh chế có tính xúc tác được.

2. Phương pháp tinh chế amylase bằng cột sắc ký

Phương pháp tinh chế amylase bằng cột sắc ký được trình bày trong hình 2. Cột sắc ký chứa gel DEAE Sepharose Fast Flow được cân bằng với dung dịch đệm tris-HCl (pH = 7). Tốc độ dòng dung dịch đệm qua cột là 0,5ml/ phút. Cho 2 ml dung dịch enzyme với nồng độ 0,3g/ ml trong dung dịch đệm tris-HCl (pH = 7) vào cột sắc ký với kích thước 1,8 x 25 cm. Rửa giải với dung dịch NaCl 50mM, tốc độ dòng dung dịch qua cột là 1 ml/ phút. Thu 5 ml cho mỗi phân đoạn, ký hiệu mỗi phân đoạn từ F1-Fn. Thử hoạt tính enzyme amylase bằng phương pháp thủy phân tinh bột. Chọn phân đoạn cho hoạt tính enzyme cao nhất. Thu mẫu enzyme và đông khô chân không. Bảo quản enzyme trong điều kiện lạnh theo quy trình ở hình 8.

3. Phương pháp tinh chế protease bằng cột sắc ký

Phương pháp tinh chế protease bằng cột sắc ký được trình bày trong hình 2. Cột sắc ký chứa gel DEAE Sepharose Fast Flow sẽ được cân bằng với dung dịch đệm tris-HCl (pH = 7). Tốc độ dòng dung dịch đệm qua cột là 0,5ml/ phút. Cho 2 ml dung dịch enzyme với nồng độ 0,3g/ ml trong dung dịch đệm tris-HCl (pH = 7) vào cột sắc ký với kích thước 1,8 x 25 cm. Rửa giải với dung dịch NaCl 100mM, tốc độ dòng dung dịch qua cột là 1ml/ phút. Thu 5 ml cho mỗi phân đoạn, ký hiệu mỗi phân đoạn từ F1-Fn. Thử hoạt tính enzyme protease bằng phương pháp Anson cải tiến. Chọn phân đoạn cho hoạt tính enzyme cao nhất. Thu mẫu enzyme và đông khô chân không. Bảo quản enzyme trong điều kiện lạnh theo quy trình ở hình 8.



Hình 2. Quy trình tinh chế amylase bằng sắc ký cột

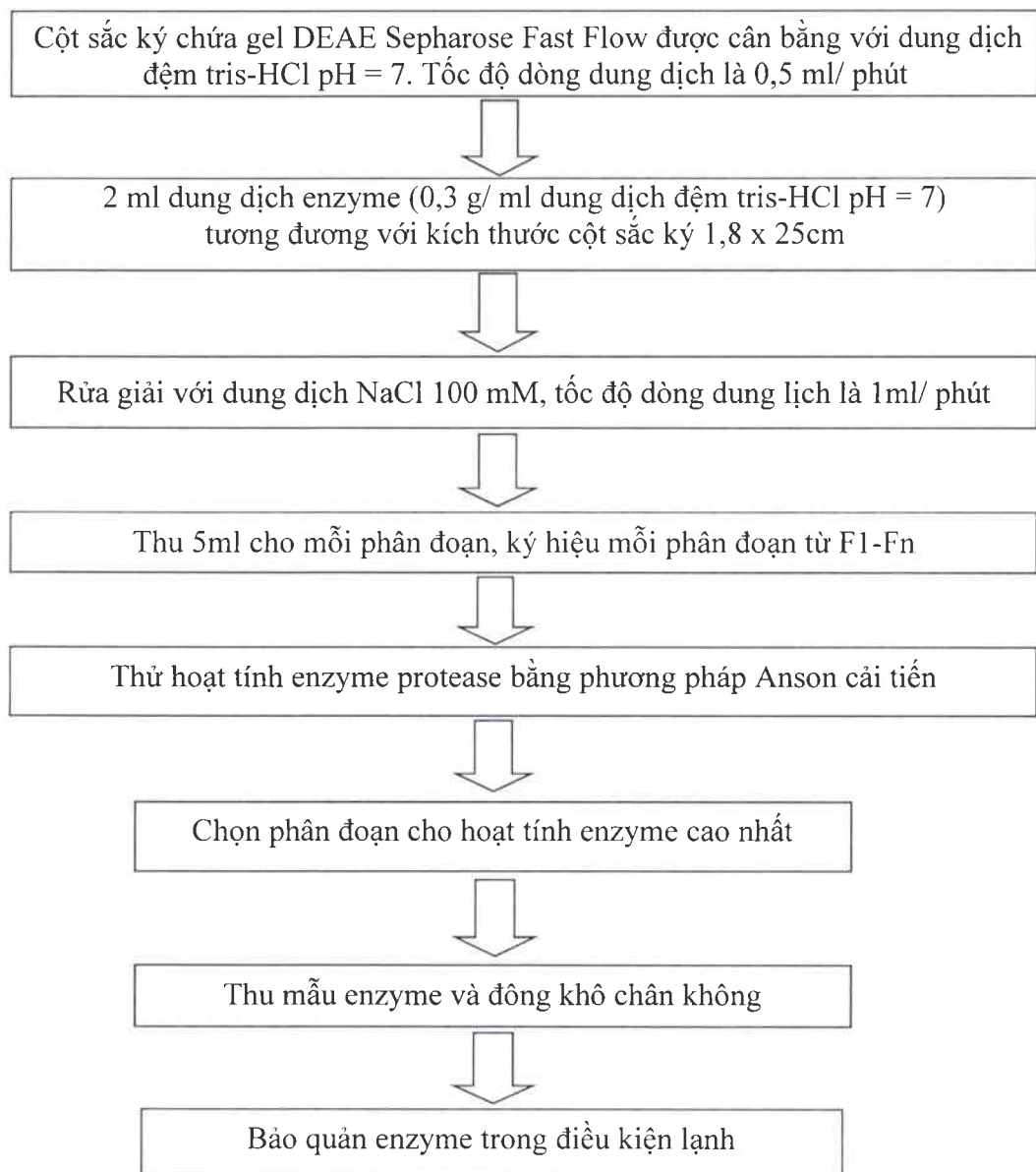
4. Quy trình sinh trắc nghiệm amylase

***. Xác định đường chuẩn sự tương quan giữa độ hấp thu và nồng độ tinh bột**

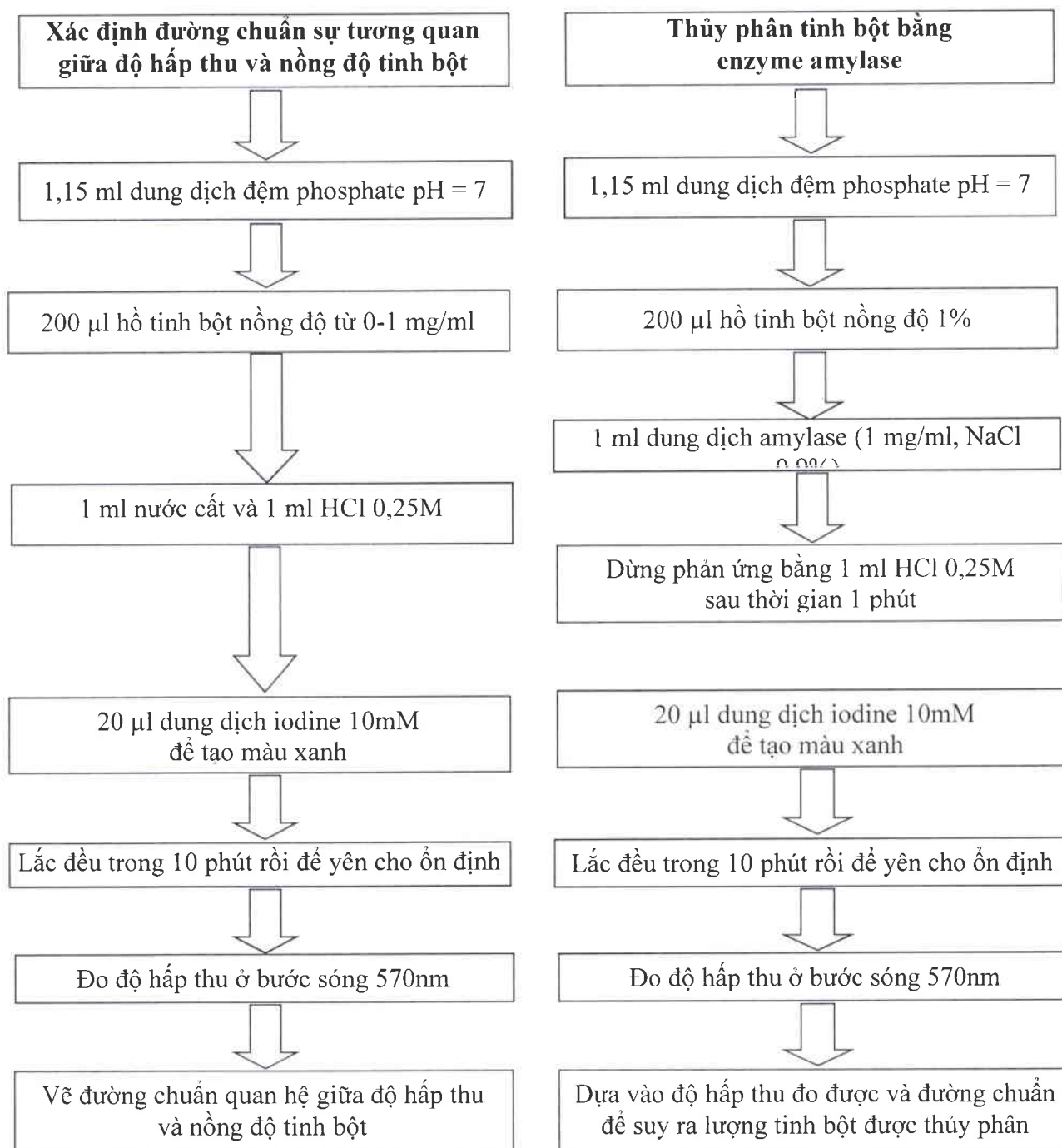
Cho vào ống nghiệm 1,15 ml dung dịch đệm phosphate pH = 7, thêm 200 μ l hồ tinh bột với nồng độ tương ứng từ 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 và 1 mg/ml (Hình 4). Tiếp tục thêm 1ml nước cất và 1 ml HCl 0,25 M để có lượng thể tích tương đương khi thực hiện phản ứng thủy phân. Sau đó cho thêm vào 20 μ l dung dịch iodine 10 mM để tạo màu xanh, lắc đều rồi để yên 10 phút cho ổn định rồi đo độ hấp thu bằng máy quang phổ ở bước sóng 570 nm. Vẽ đường chuẩn mối quan hệ giữa độ hấp thu và nồng độ tinh bột.

*. Phản ứng thủy phân tinh bột bằng enzyme amylase

Sinh trắc nghiệm có thể được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm khoảng 30°C. Phản ứng thủy phân được thực hiện bằng cách lần lượt cho vào ống nghiệm 1,15 ml dung dịch đệm pH = 7, thêm vào 200 µl hồ tinh bột nồng độ 1%. Tiến hành thủy phân tinh bột bằng 1 ml dung dịch enzyme amylase (1 mg/ml pha trong NaCl 0,9 %) ở nhiệt độ phòng (khoảng 30°C). Sau thời gian 1 phút thì dừng phản ứng bằng cách thêm 1 ml HCl 0,25 M. Cho vào dung dịch phản ứng trên 20µl dung dịch iodine 10 mM để tạo phức màu, lắc kỹ trên máy lắc rồi để yên 10 phút cho ổn định. Tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 570 nm và dựa vào đường chuẩn để tính lượng tinh bột đã được thủy phân. Hoạt tính của enzyme được tính bằng tốc độ thủy phân tinh bột trong thời gian một phút.



Hình 3. Quy trình tinh chế protease bằng sắc ký cột

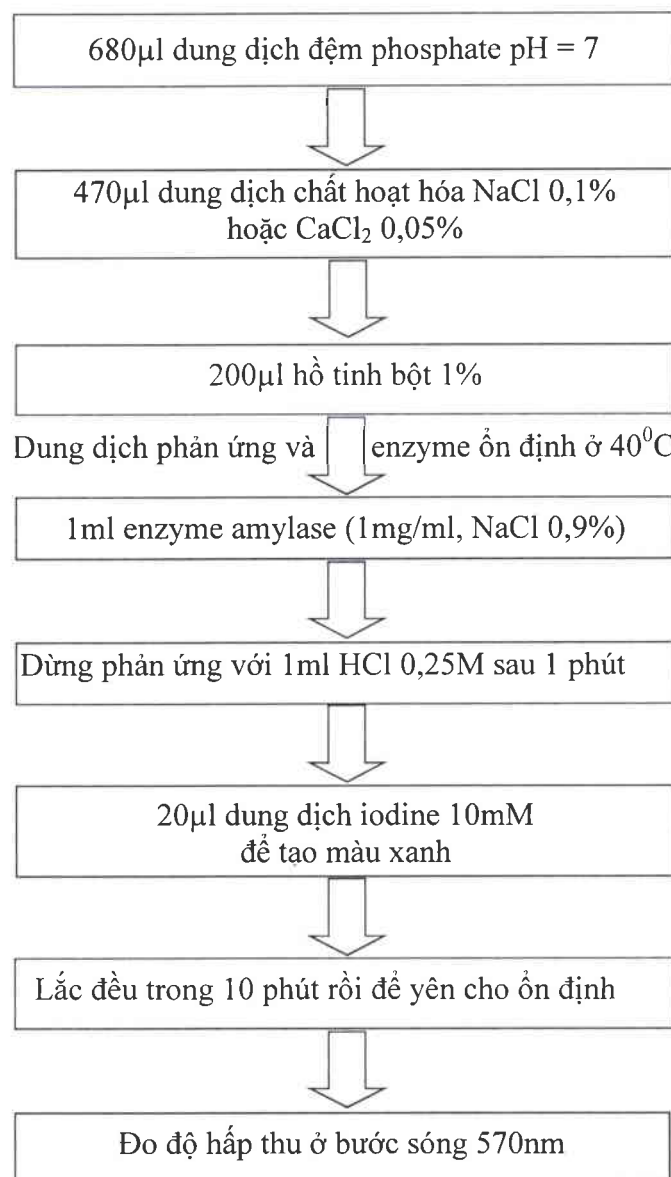


Hình 4. Quy trình sinh trắc nghiệm enzyme amylase ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (khoảng 30°C)

5. Quy trình thủy phân tinh bột của amylase

Quy trình thủy phân tinh bột của amylase được trình bày trong hình 5. Cho vào ống nghiệm 680 µl dung dịch đệm phosphate pH = 7 rồi thêm vào 470 µl dung dịch chất hoạt hóa là NaCl 0,1% hoặc CaCl₂ 0,05%. 200 µl hồ tinh bột 1% được thêm vào làm cơ chất cho phản ứng. Dung dịch phản ứng và enzyme đều được giữ

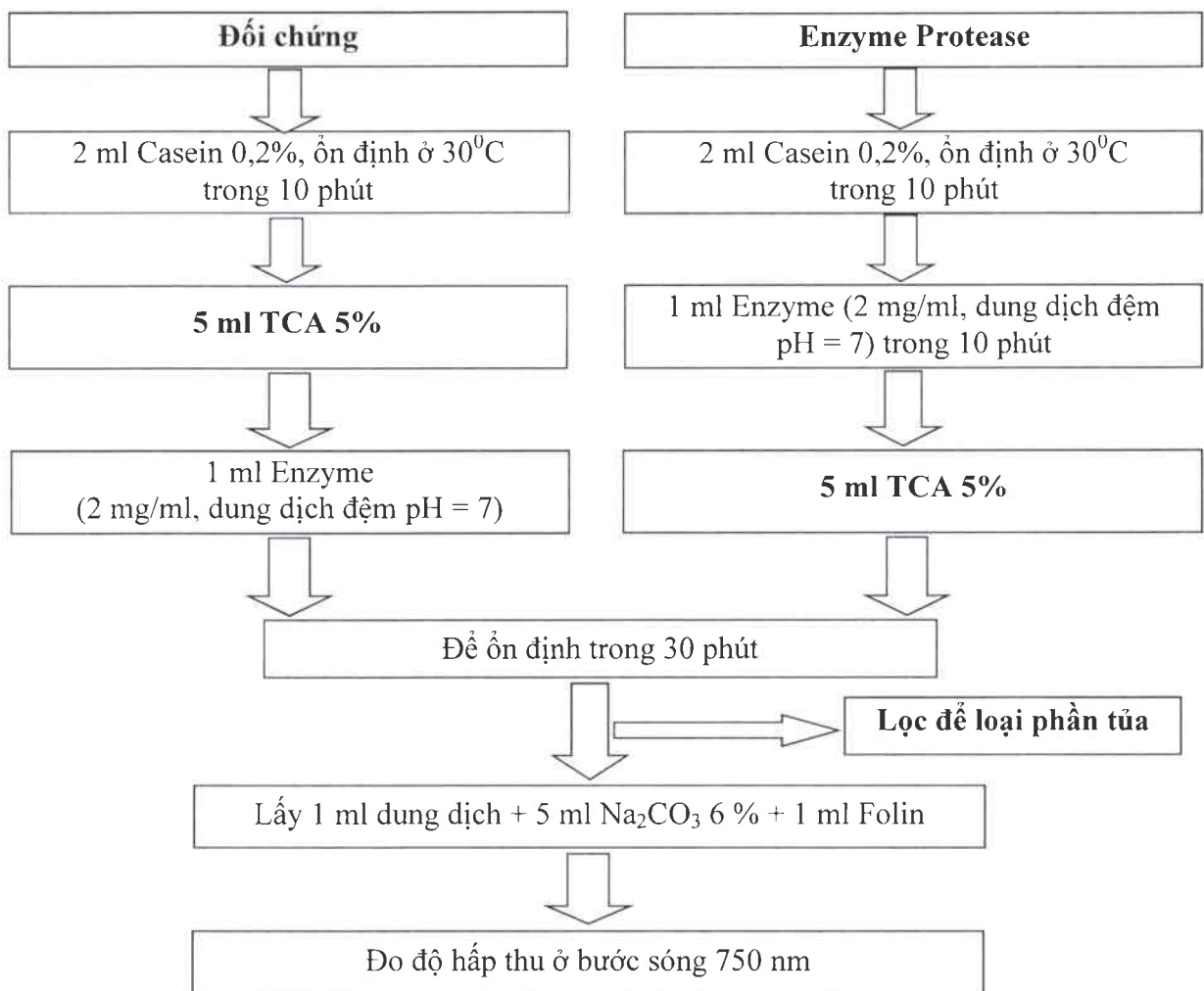
ổn định ở 40°C . Để tiến hành phản ứng, 1 ml enzyme amylase (1 mg/ml, NaCl 0,9%) được cho vào dung dịch phản ứng. Phản ứng được dừng lại bằng cách cho thêm 1 ml HCl 0,25 M sau 1 phút. Để tạo màu xanh cho phản ứng, 20 μl dung dịch iodine 10 mM được thêm vào. Dung dịch được lắc đều trong 10 phút rồi để yên cho ổn định. Đo độ hấp thu ở bước sóng 570 nm rồi so với đường chuẩn để tính được tốc độ thủy phân tinh bột của enzyme trong thời gian 1 phút.



Hình 5. Quy trình thủy phân tinh bột của enzyme amylase có điều chỉnh nhiệt độ và thêm chất hoạt hóa (ở 40°C)

6. Quy trình sinh trắc nghiệm của enzyme protease

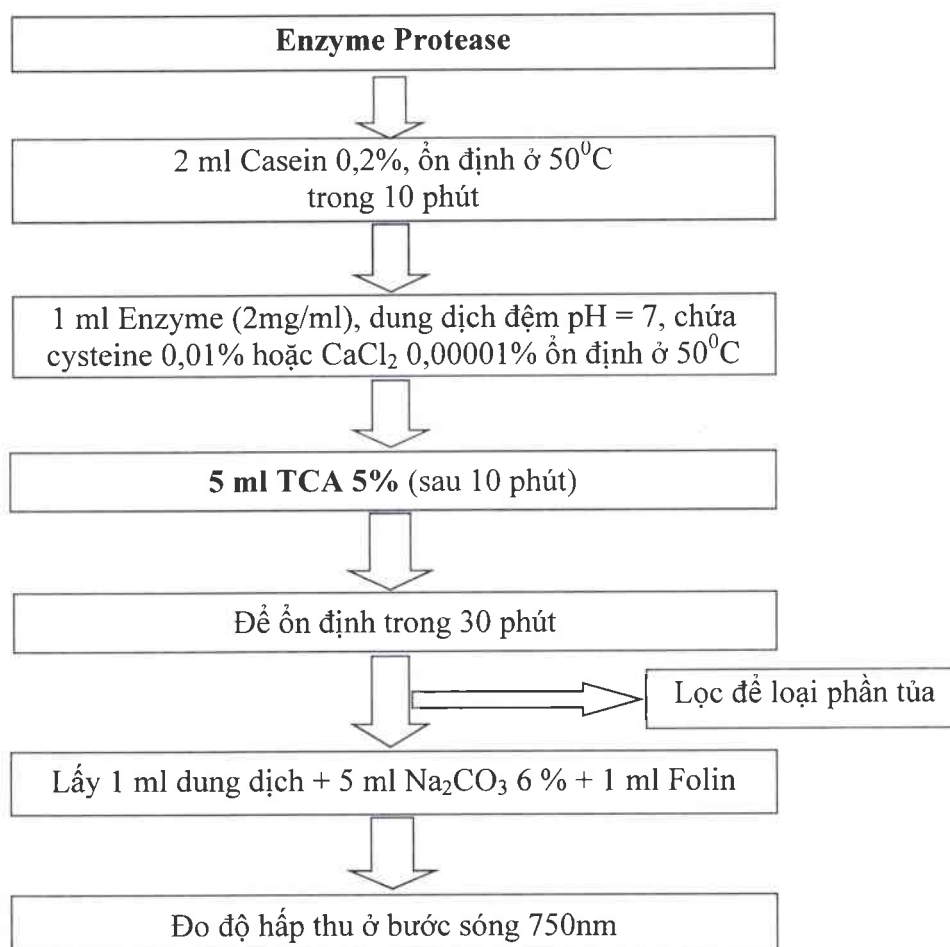
Sinh trắc nghiệm enzyme protease được tiến hành theo quy trình (Hình 6). Cho vào ống nghiệm 2 ml dung dịch casein 0,2%, để ổn định ở 30°C trong 10 phút. Cho vào ống nghiệm 1 ml dung dịch enzyme (2 mg/ml với dung dịch đệm phosphate pH = 7). Sau 10 phút, dừng phản ứng bằng 5ml trichloroacetic acid (TCA) 5%, lắc đều rồi để ổn định trong 30 phút. Ở phần đối chứng thì cho TCA vào trước và cho enzyme vào sau vì không muốn cho enzyme xúc tác phản ứng. Lọc để loại phần kết tủa và lấy 1ml dịch lọc cho vào 1 ống nghiệm khác, thêm 5 ml dung dịch Na_2CO_3 6%, lắc đều rồi thêm 1ml thuốc thử Folin đã pha loãng 4 lần. Lắc đều dung dịch thu được và để ổn định trong 30 phút ở nhiệt độ phòng rồi đem đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 750 nm. Dựa vào đường chuẩn trên đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của độ hấp thụ theo hàm lượng tyrosine để tính lượng tyrosine tương ứng với lượng sản phẩm thủy phân dưới sự xúc tác của enzyme protease.



Hình 6. Quy trình sinh trắc nghiệm enzyme protease

7. Quy trình thủy phân protein với sự xúc tác của protease

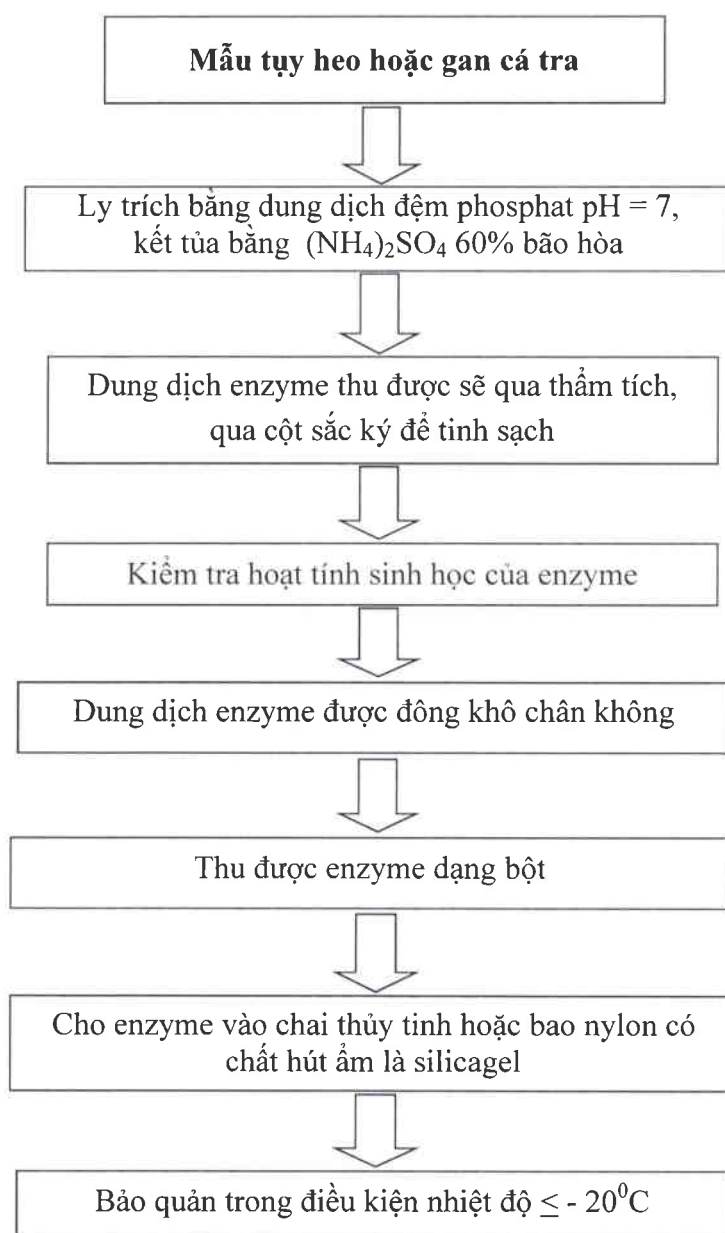
Việc thủy phân protein với sự xúc tác của protease ở nhiệt độ 50°C và thêm chất hoạt hóa được trình bày trong hình 7. Cho 2 ml dung dịch casein 0,2% vào ống nghiệm rồi để ổn định ở 50°C trong 10 phút. Thêm 1 ml dung dịch enzyme (2 mg/ml) vào ống nghiệm, dung dịch đệm pH = 7, chứa cysteine 0,01% hoặc CaCl_2 0,00001% ổn định ở 50°C . Sau 10 phút, dừng phản ứng bằng cách thêm vào 5 ml TCA 5%, lắc đều rồi để ổn định trong 30 phút. Lọc để loại phần kết tủa và lấy 1 ml dịch lọc cho vào 1 ống nghiệm khác, thêm 5ml dung dịch Na_2CO_3 6 %, lắc đều rồi thêm 1ml thuốc thử Folin đã pha loãng 4 lần. Lắc đều dung dịch thu được và để ổn định trong 30 phút ở nhiệt độ phòng rồi đem đo độ hấp thu ánh sáng ở bước sóng 750 nm.



Hình 7. Quy trình thủy phân protein với sự xúc tác của protease có điều chỉnh nhiệt độ và thêm chất hoạt hóa (ở 50°C)

8. Quy trình trích và bảo quản enzyme amylase và protease

Tóm tắt quy trình trích và bảo quản enzyme amylase và protease được trình bày trong hình 8. Sau công đoạn ly trích, tinh sạch và thử hoạt tính sinh học của các enzyme, mẫu thu được sẽ cho vào các chai thủy tinh hoặc bao nylon sạch có chất hút ẩm là silicagel. Enzyme được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Việc kiểm tra hoạt tính của enzyme có thể được thực hiện liên tục trong thời gian bảo quản chúng.



Hình 8. Quy trình trích và bảo quản enzyme amylase và protease từ tụy heo và gan cá tra