

LY TRÍCH ENZYME TỪ TỤY HEO

Nguyễn Minh Chơn, Huỳnh Văn Trung và Danh Cẩm Ngọc

Trường Đại Học Cần Thơ

TÓM TẮT

Hàng ngày, các lò giết mổ heo đã cho ra một lượng tụy heo như là phụ phẩm. Việc tìm ra phương pháp thuận lợi để ly trích enzyme từ tụy heo có thể ứng dụng được trong nghiên cứu và thực tiễn là mục tiêu của nghiên cứu này. Tụy heo được làm sạch, nghiền mịn với dung dịch đệm phosphate pH 7. Hỗn hợp được đem ly tâm để thu dung dịch chứa enzyme bên trên và loại phần lắng dưới đáy ống nghiệm. Sau khi ly tâm, ba phương pháp trích enzyme đã được thực hiện. Trong phương pháp thứ nhất, dịch trích enzyme được đông khô trực tiếp. Với phương pháp thứ hai, muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% bão hòa được dùng để thu nhận protein, sau đó thẩm tích, rồi đông khô. Ở phương pháp thứ ba, sản phẩm sẽ được kết tủa bằng cồn 96 % rồi đem đông khô. Kết quả cho thấy phương pháp trích enzyme thứ hai cho hiệu quả tốt nhất. Sản phẩm enzyme từ tụy heo có hoạt tính của protease, lipase và amylase. Enzyme protease từ tụy heo thể hiện hoạt tính hiệu quả nhất ở pH 7 và 50°C , lipase thể hiện hoạt tính mạnh ở pH 7 và 50°C , trong khi amylase thể hiện hoạt tính mạnh ở pH 7 và 40°C . Sản phẩm enzyme sau khi cho qua cột sắc ký trao đổi ion (DEAE Sepharose fast low) đã có hoạt độ tăng lên 1,4 lần đối với protease cũng như amylase và 1,5 lần đối với lipase. Kết quả phân tích điện di SDS-PAGE đã khẳng định sự hiện diện của các enzyme kể trên. Sau 90 ngày được bảo quản ở -20°C , hoạt tính của các enzyme trên vẫn thể hiện tốt. Kết quả nghiên cứu cho thấy tụy heo là nguồn nguyên liệu lý tưởng để ly trích enzyme protease, lipase và amylase.

Từ khóa: *Amylase, lipase, protease, tụy heo, SDS-PAGE*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đồng Bằng Sông Cửu Long không chỉ là khu vực có sản lượng lúa gạo nhiều nhất nước mà còn là nơi có nghề chăn nuôi phát triển, đặc biệt là nghề chăn nuôi heo do có nguồn thức ăn dồi dào. Mỗi ngày, các lò giết mổ heo thải ra một lượng lớn phụ phế phẩm trong đó

có tụy tạng. Tuyến tụy được cấu tạo từ 98% tế bào ngoại tiết sản xuất và bài tiết các dịch tụy chứa các men tiêu hóa hay các enzyme. Đó là các enzyme kiềm tính như amylase, protease và lipase tiêu hóa các loại thức ăn là carbohydrate, protein và lipid (Nguyễn Đức Lượng *et al.*, 2004). Vì vậy, tụy heo là nguồn nguyên liệu lý tưởng cho việc ly trích enzyme. Enzyme α -amylase từ tụy heo đã được Cadwell và đồng tác giả đề cập vào năm 1952. Các nghiên cứu về enzyme từ tuyến tụy vẫn còn ít ở Việt Nam. Tụy heo có chứa nhiều loại enzyme quan trọng, nhưng nếu chỉ sử dụng chúng để làm thức ăn thì giá trị thương phẩm sẽ không cao, cần tận dụng nó để tạo ra sản phẩm có giá trị cao hơn. Với nhu cầu sử dụng enzyme ngày càng cao, việc nghiên cứu sản xuất enzyme với số lượng lớn và giá thành thấp là nhu cầu cấp thiết hiện nay.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu:

Tụy heo được thu từ các lò giết mổ heo tập trung trong địa bàn Thành Phố Cần Thơ. Sau khi heo được giết mổ, tụy heo được thu về, rửa sạch và dùng để trích enzyme hoặc trữ ở -20°C trong thời gian chờ xử lý mẫu. Thời tạm trữ trong và giờ để enzyme không bị biến tính. Các hóa chất của công ty Merck và Sigma đạt độ tinh sạch cần thiết được dùng cho các thí nghiệm phân tích protein và enzyme.

Phương pháp

Tụy heo được làm sạch, cắt nhỏ rồi nghiền với dung dịch đệm phosphate lạnh có pH 7. Trong suốt quá trình nghiền, không để nhiệt độ vượt quá 5°C . Sau đó, tiến hành ly tâm để loại phần kết tủa bên dưới và lấy phần dung dịch lỏng có chứa enzyme bên trên. Enzyme trong dung dịch được thu nhận theo ba phương pháp khác nhau. Phương pháp thứ nhất là đông khô trực tiếp dịch lỏng có chứa enzyme. Trong phương pháp thứ hai, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% bão hòa được dùng để kết tủa protein. Mẫu thu được sẽ đem đi thẩm tích loại muối qua màng Seamless Cellulose Tubing 36/32 rồi đông khô sản phẩm. Trong phương pháp thứ ba, cồn 96% được dùng để kết tủa protein rồi đem đông khô sản phẩm.

- Hoạt độ protease được xác định theo phương pháp Anson cải tiến với cơ chất là casein.

- Hoạt độ của enzyme amylase được xác định bằng phương pháp thủy phân tinh bột. Phản ứng thủy phân được thực hiện như sau: Cho 1,15ml dung dịch đệm có pH 7 vào ống nghiệm, rồi thêm vào 200 μ l hồ tinh bột có nồng độ 1%, sau đó cho vào 1ml dung dịch chứa enzyme. Sau thời gian phản ứng 1 phút thì thêm vào 1ml HCl 0,25M để dừng phản ứng. Cho tiếp vào hỗn hợp trên 20 μ l dung dịch iodine 10mM, lắc đều trên máy lắc rồi để yên 10 phút. Tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 570nm. Hoạt độ của enzyme được tính theo % tinh bột bị thủy phân trong 1 phút bằng cách so sánh với đường chuẩn của tinh bột đã thiết lập trước đó.

- Xác định hoạt độ của enzyme lipase bằng phương pháp thủy phân dầu (Salleh, 2001).

- Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Lowry (Lowry et al., 1951).

- Sắc ký trao đổi ion: Mẫu enzyme (2ml) được dùng để phân tích bằng sắc ký cột với điều kiện như sau: Cho gel DEAE Sepharose fast low vào cột sắc ký có kích thước 1,8 x 25cm, rồi cân bằng bằng đệm phosphat pH 6. Tốc độ dòng chảy qua cột là 30ml/h. Mỗi phân đoạn thu 5 ml dung dịch.

- Phân tích điện di SDS-PAGE theo Hames (1998). Phân tích điện di dùng để xác định trọng lượng phân tử của protein dựa trên thang chuẩn protein của Novagen (15 - 150 kDa).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát hiệu quả của các phương pháp thu nhận enzyme từ tụy heo

Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi sản phẩm của phương pháp đông khô trực tiếp dịch lỏng có chứa enzyme (phương pháp thứ nhất) đạt cao nhất là 3,57%. Kế đến là phương pháp kết tủa protein bằng cồn 96% rồi đem đông khô sản phẩm (phương pháp thứ ba) đạt 2,61%. Hiệu suất thu hồi của phương pháp kết tủa protein bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% rồi đem đi thẩm tích và đông khô sản phẩm (phương pháp thứ hai) chỉ đạt 2,51%. Xét về hàm lượng protein hòa tan trong cùng một khối lượng mẫu thì sản phẩm từ phương pháp thứ ba đạt cao nhất và thấp nhất là sản phẩm từ phương pháp thứ nhất (Bảng 1). Muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% bão hòa và cồn 96% là hai tác nhân kết tủa protein nên đã loại bớt các thành phần phi protein. Cồn 96% có khả năng loại bỏ vỏ hydrate của phân tử protein tốt hơn muối nên lượng protein thu được nhiều hơn. Sản phẩm từ phương pháp thứ nhất do không có giai

đoạn kết tủa protein nên còn chứa nhiều tạp chất, vì vậy dù hiệu suất thu hồi cao nhưng hàm lượng protein trong mẫu lại thấp.

Bảng 1. Hoạt độ của các enzyme protease, lipase và amylase trong các sản phẩm enzyme

Phương pháp thu nhận enzyme	Hàm lượng protein hòa tan (mg/ml)	Hoạt độ protease (U/mg)	Hoạt độ lipase (U/mg)	Hoạt độ amylase (% tinh bột bị thủy phân)
Phương pháp thứ nhất	0,25 b	0,43 b	3,64 b	56,70 c
Phương pháp thứ hai	0,26 b	0,55 a	4,87 a	67,73 a
Phương pháp thứ ba	0,37 a	0,38 b	3,07 b	58,17 b
Ý nghĩa	**	**	**	**
LSD	0,02	0,05	0,83	0,42

***: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Các chữ theo sau các số trên cùng 1 cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 1% trong phép thử LSD*

Hoạt độ protease, lipase và amylase của sản phẩm từ 3 phương pháp ly trích đều khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ 1%. Sản phẩm từ phương pháp thứ hai cho hoạt độ của 3 loại enzyme này cao hơn so với hai phương pháp còn lại. Trong phương pháp thứ hai có sử dụng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% bão hòa làm tác nhân kết tủa protein và làm sạch mẫu bằng phương pháp thẩm tích để loại bỏ các thành phần phi protein. Phương pháp kết tủa protein bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dựa trên cơ sở sự khác nhau về khả năng kết tủa của các protein ở một nồng độ muối xác định được dùng phổ biến để loại bỏ bước đầu protein tạp của các dịch trích enzyme (Markus và Aaron, 2007). Mẫu thu được từ phương pháp thứ hai đã cho hoạt độ của enzyme tốt nên được chọn để khảo sát cho các thí nghiệm tiếp theo.

Khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt tính của enzyme trích từ tụy heo.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt và pH lên hoạt độ của protease từ tụy heo cho thấy enzyme này cho hiệu quả phân giải protein tốt nhất ở pH 7 và nhiệt độ trong khoảng từ 40⁰C đến 60⁰C. Xét về mặt tương tác giữa hai yếu tố nhiệt độ và pH thì protease từ tụy heo cho hoạt độ cao nhất ở pH 7 và nhiệt độ là 50⁰C - 60⁰C (Bảng 2). Như vậy, điều kiện xúc tác hiệu quả của protease từ tụy heo có thể được chọn là pH 7 ở 50⁰C. Kết quả ở Bảng 3 thể hiện hoạt tính của enzyme lipase từ tụy heo hoạt động mạnh nhất ở pH 7 và nhiệt độ là 50⁰C. Tiến hành phân tích tương tác sự ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên hoạt tính lipase tụy heo cũng cho kết quả tương tự.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt độ của enzyme protease từ tụy heo

<div>pH Nhiệt độ</div>	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	Trung bình
30 °C	0,25 m	0,54 e	0,42 gh	0,40 ghij	0,39 hij	0,40 b
40 °C	0,59 bcd	0,54 e	0,50 f	0,47 f	0,36 jk	0,49 a
50 °C	0,54 e	0,62 ab	0,58 cd	0,56 de	0,40 ghi	0,54 a
60 °C	0,56 de	0,63 a	0,61 abc	0,43 g	0,34 kl	0,51 a
70 °C	0,41 gh	0,47 f	0,37 ijk	0,18 no	0,16 o	0,32 c
80 °C	0,20 n	0,30 l	0,17 no	0,05 p	0,0 5 p	0,15 d
Trung bình	0,42 b	0,52 a	0,44 b	0,35 c	0,28 d	
F (pH)	**					
F (t°)	**					
F(pH x t°)	**					
CV (%)	3,77					

** : khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Các chữ theo sau các số trên cùng 1 cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 1% trong phép thử Duncan

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt độ của enzyme lipase từ tụy heo

<div>pH Nhiệt độ</div>	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	Trung bình
30 °C	2,56 n	2,04 o	7,25 i	8,23 h	8,75 g	6,47 j	1,34 pqrs	5,24 c
40 °C	1,78 op	2,50 n	10,32 e	11,88 c	12,73 b	4,51 m	1,52 pqr	6,46 b
50 °C	1,58 pq	4,19 m	11,16 d	12,66 d	13,38 a	5,36 k	1,26 qrst	7,09 a
60 °C	0,86 tuv	1,32 qrs	2,62 n	9,66 f	11,82 c	0,47 wx	0,21 xy	3,85 d
70 °C	0,47 vwx	0,80 uvw	1,58 pq	5,30 k	5,62 k	0,99 stu	0,05 y	2,12 e
80 °C	0,28 xy	0,54 vwx	1,12 rstu	4,51 m	4,91 l	1,06 stu	0,02 y	1,78 f
Trung bình	1,23 f	1,90 e	5,68 c	8,71 b	9,53 a	3,14 d	0,74 g	
F (pH)	**							
F (t°)	**							
F(pH x t°)	**							
CV (%)	3,68							

** : khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Các chữ theo sau các số trên cùng 1 cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 1% trong phép thử Duncan

Enzyme amylase từ tụy heo hoạt động mạnh trong điều kiện nhiệt độ từ 40°C - 60°C ở khoảng pH từ 6 - 8 (Bảng 4). Enzyme amylase có điểm đẳng điện pI nằm trong vùng từ 4,2 - 5,7 (Bernfeld, 1951), kết quả cho thấy ở các khoảng pH thấp và gần với điểm đẳng điện như 3, 4 và 5 cho hoạt tính của amylase yếu dần thể hiện thông qua lượng tinh bột bị thủy phân rất ít. Khi nhiệt độ cao hơn 70°C, hoạt tính của enzyme amylase tụy heo giảm rõ rệt, ở

80⁰C hoạt tính của enzyme này rất yếu, có thể nhiệt độ cao đã làm biến tính enzyme. Từ kết quả này cho thấy điều kiện tối ưu cho enzyme amylase từ tụy heo hoạt động là 40⁰C và pH 7. Theo Cozzone và đồng tác giả (1970) thì pH tối ưu cho α -amylase từ tụy heo là 6,9 và từ *Bacillus subtilis* là 5,0 - 6,0.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt độ của enzyme amylase từ tụy heo

<div>pH Nhiệt độ</div>	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	Trung bình
30 °C	1,66 z	5,47 z	34,40 p	46,30 j	67,50 g	36,33 o	12,13 u	7,03 xyz	26,35 c
40 °C	12,10 u	29,00 q	39,37 m	75,70 cd	84,97 a	58,00 i	43,67 k	6,43 yz	43,65 a
50 °C	0,70 z	3,07 z	24,00 s	75,57 d	79,93 b	65,37 h	37,90 mn	4,37 z	43,36 a
60 °C	8,50 wx	8,63 w	29,13 q	73,40 e	77,17 c	71,10 f	41,33 l	37,20 no	43,31 a
70 °C	2,20 z	3,27 z	5,7 z	27,47 r	41,37 l	29,17 q	5,50 t	9,07 vw	16,72 d
80 °C	0,17 z	1,10 z	3,73 z	10,40 v	22,63 s	7,73 wxy	5,9 z	0,57 z	6,53 e
Trung bình	4,22 h	8,42 g	22,72 e	51,47 b	62,26 a	44,62 c	26,07 d	10,78 f	
F (pH)	**								
F (t ⁰)	**								
F(pH x t ⁰)	**								
CV (%)	2,31								

** : khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Các chữ theo sau các số trên cùng 1 cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 1% trong phép thử Duncan

Bước đầu tinh sạch enzyme protease, lipase và amylase từ tụy heo

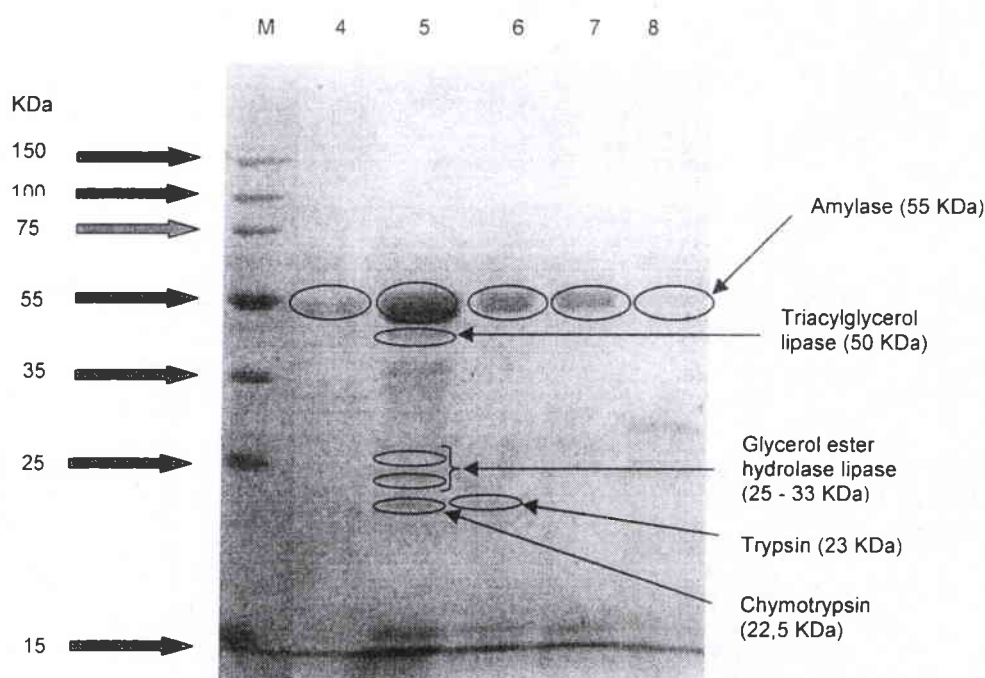
Enzyme protease, lipase và amylase từ tụy heo bước đầu được tinh sạch qua cột sắc ký trao đổi ion với các điều kiện được mô tả ở phần phương pháp. Kết quả xác định hoạt độ của 3 loại enzyme trên ở từng phân đoạn thu được cho thấy protease có hai phân đoạn thể hiện hoạt độ cao nhất, lipase chỉ có 1 phân đoạn và amylase có tới 6 phân đoạn thể hiện hoạt độ cao nhất. Sản phẩm thu được sau khi qua cột có hoạt độ tăng lên 1,4 lần đối với protease và amylase trong khi tăng lên 1,5 lần đối với lipase (Bảng 5). Kết quả cho thấy, bước đầu tinh sạch protease, lipase và amylase từ tụy heo đã có hiệu quả nhưng để thu được enzyme có hoạt độ riêng cao thì cần được tinh sạch nhiều hơn.

Bảng 5. Hoạt độ của enzyme protease, lipase, amylase trước và sau khi lọc qua cột sắc ký

	Hoạt độ protease (U/mg)	Hoạt độ lipase (U/mg)	Hoạt độ amylase (% tính bột bị thủy phân)
Hoạt độ enzyme trước khi lọc	0,527	7,54	67,6
Hoạt độ enzyme sau khi lọc	0,718	11,56	94,9
Tỷ lệ tăng hoạt độ enzyme (lần)	1,4	1,5	1,4

Phân tích điện di SDS-PAGE

Kết quả phân tích điện di SDS- PAGE ở hình 1 cho thấy các phân đoạn từ F4 - F8 đều có xuất hiện vạch ở vị trí có trọng lượng phân tử khoảng 55 kDa, tương đương với trọng lượng phân tử enzyme amylase. Ngoài enzyme amylase, ở phân đoạn F5 còn có vạch ở vị trí của enzyme triacylglycerol lipase có trọng lượng phân tử khoảng 50 kDa (Steiner và Williams, 2002), một vạch ở vị trí của enzyme lipase có trọng lượng phân tử khoảng từ 25 - 33 kDa (Segiura et al., 2004). Ở phân đoạn này còn có vạch ở vị trí tương đương với trọng lượng phân tử của chymotrypsin (khoảng 22,5 kDa) và ở phân đoạn F6 có vạch tương đương với trọng lượng phân tử của trypsin (khoảng 23 kDa).



M: Marker chuẩn. Các số 4, 5, 6, 7 và 8 là các phân đoạn trong sắc ký cột

Hình 1. Kết quả phân tích điện di SDS-PAGE

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian bảo quản lên hoạt tính enzyme

Kết quả khảo sát trong Bảng 7 cho thấy hoạt độ của 3 loại enzyme từ tụy heo đều giảm theo thời gian tồn trữ ở -20°C . Sau 90 ngày bảo quản, hoạt độ của protease là 0,44 U/mg và hoạt độ của lipase là 7,92 U/mg, hoạt độ này giảm 20% so với hoạt độ ban đầu. Trong khi hoạt độ của amylase sau 90 ngày bảo quản thể hiện qua phần trăm tinh bột bị thủy phân là

50,2% giảm 26% so với ban đầu. Tuy hoạt độ của cả ba loại enzyme từ tụy heo có giảm trong thời gian bảo quản ở nhiệt độ -20°C nhưng đây là nhiệt độ dễ có được ở các tủ lạnh rẻ tiền so với các tủ lạnh sâu ở -80°C .

Bảng 7. Ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến hoạt tính enzyme

Ngày sau bảo quản ở -20°C	Protease (U/mg)	Lipase (U/mg)	Amylase (% tính bột bị thủy phân)
0	0,55 a	9,91 a	67,73 a
30	0,51 b	9,23 b	54,06 b
60	0,49 c	8,56 b	51,73 c
90	0,44 d	7,92 d	50,20 d
Ý nghĩa	**	**	**
LSD	0,01	0,45	1,11

***: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Các chữ theo sau các số trên cùng 1 cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 1% trong phép thử LSD*

KẾT LUẬN

Tụy heo là nguồn nguyên liệu có chứa cả ba loại enzyme protease, lipase và amylase. Cả ba loại enzyme được thu nhận hiệu quả nhất theo phương pháp trích enzyme bằng cách làm sạch tụy heo, nghiền mịn với dung dịch đệm phosphate pH 7, sau thời gian trích ly tiến hành ly tâm loại kết tủa và thu phần dịch lỏng có chứa enzyme, sử dụng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% bão hòa để kết tủa protein rồi thẩm tách tích và đông khô. Sản phẩm thu được từ phương pháp trên sau khi cho qua cột sắc ký trao đổi ion (DEAE Sepharose fast low) có hoạt độ tăng lên 1,4 lần đối với protease, amylase và 1,5 lần đối với lipase. Enzyme protease, lipase và amylase thu được từ tụy heo đều hoạt động mạnh nhất ở pH 7 trong khi nhiệt độ tối thích của 3 enzyme này là khác nhau. Enzyme protease thể hiện hoạt độ phân giải protein hiệu quả nhất ở 50°C trong khi lipase cho hoạt độ mạnh nhất ở 50°C và amylase là 40°C . Sản phẩm thu được sau tồn trữ 90 ngày ở -20°C cho hoạt độ giảm từ 20 - 25% so với ban đầu. Kết quả thí nghiệm này đã khẳng định tụy heo là nguồn nguyên liệu lý tưởng để ly trích các enzyme protease, lipase và amylase.

Lời cảm ơn: xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của Bộ Giáo Dục và Đào Tạo cho đề tài nghiên cứu có mã số B2010-16-165. Xin chân thành cảm tạ Trường Đại Học Cần Thơ đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bernfeld P (1951) Enzymes of Starch Degradation and Synthesis. In: “Advances in Enzymology” (ed Nord FF), Interscience Publication inc, New York, pp. 379 – 424.
- Caldwell, M., Adams, M., Kung, J., and Toralballa, G.: (1952) Crystalline Pancreatic Amylase. II. Improved Method for its Preparation from Hog Pancreas Glands and Additional Studies of its Properties, *J Am Chem Soc* 74, 4033.
- Cozzzone ,P, Pesaco, L.Beauboil, B and Marchis Mouren, G. (1970) *Biochim Biophys. Acta* 207, 490
- Hames B.D. and Rickwood D. (1998) *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach* 3rd Edition, The Practical Approach Series, Oxford University Press.
- Lowry O. H., Rosenberg W. J., Farr A. L., Randall R. J (1951) Quantitation of Protein using Folin – Ciocalteu reagent. *J. Biochem*, (193), pp. 265 – 275
- Markus R. Wenk and Aaron Z. Fernandis (2007) A manual for Biochemistry Protocols, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. *Manual in Biomedical Research*, (3), pp. 2-37
- Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết, Lê Thị Thủy Tiên và Huỳnh Ngọc Oanh (2004) *Công nghệ enzyme*. Nxb Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Salleh A. B., Esa N. M. Basri M., Razak C. N. A., Yunus W. M. Z.W. and Ahmad M (2001) Immobilization of Lipases on Hydrogels. *Methods in Biotechnology*, 15 (1), pp. 41 – 48.
- Segura R. L., Palomo J. M., Mateo C., Cortes A., Terreni M., Fernández-Lafuente R., Guisan J. M (2004) Different Properties of the Lipases Contained in Porcine Pancreatic Lipase Extracts as Enantioselective Biocatalysts. *Biotechnology Progress*, 20 (3), pp. 825 – 829.
- Steiner J. M. and Williams D. A (2002) Purification of classical pancreatic lipase from dog pancreas. *Biochimie*, 84, pp. 1243 – 1251.

ENZYME EXTRACTION FROM PORCINE PANCREAS

Nguyen Minh Chon, Huynh Van Trung and Danh Cam Ngoc

Can Tho University

SUMMARY

Every day, large quantities of porcine pancreas were produced from the abattoirs as a by-product. The purpose of this study is to identify a suitable method for extraction of enzymes from porcine pancreas. The extracted enzymes can be used for research and practical applications. Porcine pancreases were washed and ground gently in phosphate buffer at pH 7. The mixture was centrifuged and the supernatant, which contained the enzymes, was collected. The precipitate was discarded. After centrifugation, three methods of enzyme extraction were examined. In the first method, the supernatant was freeze-dried. In the second method, proteins were precipitated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of 60% saturation, then dialyzed and freeze-dried. In the third method, proteins were precipitated by 96% ethanol then freeze-dried. The results showed that the second method was the best one. The enzymes from porcine pancreas showed the activities of protease, lipase and amylase. The three enzymes, protease, lipase, and amylase, displayed highest activity at pH 7 and 50⁰C, pH 7 and 50⁰C, and pH 7 and 40⁰C, respectively. After freeze-drying the product was passed through an ion exchange chromatography column (DEAE Sepharose fast flow). The collected enzymes showed improved activity. The activity of protease and amylase increased 1.4 times and the activity of lipase increased 1.5 times. The result of SDS-PAGE electrophoresis showed the presence of these enzymes in the extracted sample. After storage at -20⁰C for 90 days, these enzymes still retain their activity. The result of this study showed that porcine pancreas was a good source for extraction of protease, lipase and amylase.

Key words: *Amylase, lipase, porcine pancreas, protease, SDS-PAGE*

**Author for correspondence:* E-mail: nmchon@ctu.edu.vn