

Tính chất động học và đặc điểm thủy phân của lipase tinh sạch từ gan tụy cá tra (*PANGASIUS*)

- Vương Bảo Thy
- Trần Bích Lam

Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM

- Lưu Duẩn

Trường Đại học Công nghệ Sài Gòn

(Bài nhận ngày 30 tháng 09 năm 2013, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 27 tháng 10 năm 2013)

TÓM TẮT:

Enzym lipase từ gan tụy cá tra đã được nghiên cứu tinh sạch bằng phương pháp kết tủa phân đoạn với muối amoni sulfate, sắc ký trao đổi ion DEAE Cellulose, sắc ký lọc gel Sephadex G-75. Thông số động học của enzym lipase tinh sạch từ gan tụy cá tra (*Pangasius*) được xác định cho kết quả $K_m = 1.381 \text{ mM}$ và $V_{max} = 0.063 \text{ mM/min}$ với cơ chất triolein. Lipase tinh sạch có hoạt tính ổn

định ở khoảng pH 7- 9, nhiệt độ 35- 50°C. Ở nhiệt độ 50°C enzyme mất 44,7% hoạt lực sau thời gian 120 phút. Lipase tinh sạch thủy phân cơ chất đặc hiệu vị trí α - 1,3 của triglyceride. Ở nồng độ muối mật NaTC 0.015M hoạt tính của enzym lipase tăng gấp 3.08 lần so với mẫu không bổ sung muối mật NaTC.

Từ khóa: lipase tinh sạch, gan tụy cá tra.

MỞ ĐẦU

Hiện nay, trong ngành công nghiệp chế biến cá tra tại Việt Nam, phôi cá chiếm khoảng 30%, phần còn lại là phế phụ phẩm, trong đó, nội tạng chiếm 5-6% trọng lượng cơ thể cá (Vương Bảo Thy, 2011), là nguồn nguyên liệu tiềm năng để thu nhận lipase. Lipase là enzyme có nhiều ứng dụng trong y dược học và các ngành công nghiệp (Poonsuk Prasertsan, 2008). Một số lipase từ nội tạng cá đã được nghiên cứu như lipase cá hồi (Mukundan M.K. và cộng sự, 2006), cá ngừ (Poonsuk Prasertsan, 2008), cá đối (Alberta N.A.Aryee, 2007)... Những công bố trước về enzym lipase từ gan tụy cá tra: đã được nghiên

cứu tinh sạch bằng phương pháp kết tủa phân đoạn với muối amoni sulfate, tiếp theo qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE Cellulose, sau đó phân đoạn chứa enzym lipase được tiếp tục qua cột sắc ký lọc gel Sephadex G-75, phân đoạn lipase thu nhận được kiểm tra độ tinh sạch và xác định trọng lượng phân tử 57000 Da bằng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE. Hoạt tính phân đoạn chứa lipase 509.7 U/ml. Hoạt tính riêng của lipase tinh sạch cao gấp 37.95 lần so với hoạt tính lipase trong dịch trích ly thô. Hiệu suất thu hồi 40.1%; nhiệt độ và pH tối ưu của lipase tinh sạch là 50°C và pH 8. Hoạt tính lipase cao hơn khi có

mặt ion Ca^{2+} , ngược lại lipase bị kìm hãm khi có mặt các ion kim loại Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} (Vương Bảo Thy, 2011)

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Gan tụy cá Tra do Công ty chế biến thủy sản ở Vĩnh Long cung cấp. Sau khi giết mổ, gan tụy được bảo quản ở nhiệt độ -20°C .

Phương pháp nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu

Tinh sạch enzym lipase: gan tụy cá tra được cắt nhỏ, nghiền nhuyễn, phối trộn với dung dịch đệm Tris-HCl 0.05N với tỷ lệ 1:2 (w/v), trích ly 60 phút, lọc thô, ly tâm thu dịch trích ly. Dịch enzym thô được kết tủa bằng tác nhân $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ở 60% nồng độ bão hòa. Ly tâm thu tủa. Tiếp theo, enzym kết tủa được cho vào túi thẩm tích cellophane 12000 Da trong becher 1000 ml đệm Tris-HCl pH 8 (0.05N) trong 12 giờ, nhiệt độ 5°C . Dịch enzym sau thẩm tích được cho qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE- cellulose, thể tích cột 20mm x 15 cm, rửa giải bằng dung dịch muối NaCl nồng độ 0-0.3M, thu các ống thể tích 3ml/ống, vận tốc 25ml/h, nhiệt độ 5°C . Phân đoạn chứa lipase tiếp tục cho qua sắc ký lọc gel Sephadex G-75, thể tích cột 12mm x 60 cm, vận tốc 25ml/h, thu các ống thể tích 3ml/ống, nhiệt độ 5°C . Dung dịch rửa là đệm Tris-HCl pH 8 (50mM). Dựa vào sự khác biệt phân tử lượng thu được phân đoạn chứa enzym lipase tinh sạch. (Vương Bảo Thy, 2011)

Xác định thông số động học K_m và V_{max} của enzym lipase tinh sạch: khảo sát yếu tố nồng độ cơ chất triolein với các mức: 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5; 4 mM. pH phản ứng pH8, nhiệt độ 50°C . Sản phẩm thủy phân được đánh giá bằng lượng acid béo tự do sinh ra. Vẽ đường biểu diễn sự biến thiên của $1/v$ theo $1/[S]$. Xác định K_m và V_{max} theo phương pháp Lineweaver-Burk.

Khảo sát độ bền nhiệt theo thời gian của enzym lipase tinh sạch: khảo sát yếu tố nhiệt độ với các mức 35°C , 45°C , 50°C , 55°C , 60°C , 65°C , 70°C . Xác định hoạt tính tương đối của enzym lipase sau các khoảng thời gian 15, 30, 45, 60, 90, 120 phút. pH phản ứng pH8, cơ chất triolein 20% có bổ sung chất nhũ hóa gum arabic.

Khảo sát độ bền pH theo thời gian của enzym lipase tinh sạch: khảo sát yếu tố pH với các mức pH 6 (đệm citrate-phosphate), pH 7, pH 7.5, pH 8, pH 8.5, pH 9 (đệm Tris-HCl); pH 9.5, pH 10 (đệm carbonate-bicarbonate). Xác định hoạt tính tương đối của enzym lipase sau các khoảng thời gian 15, 30, 45, 60, 90, 120 phút. Nhiệt độ phản ứng 50°C , cơ chất triolein 20% có bổ sung chất nhũ hóa gum arabic.

Khảo sát đặc điểm thủy phân cơ chất của enzym lipase tinh sạch: thử nghiệm với các loại cơ chất: tributyrin; triolein; 1-monoolein; 2-monoolein; 1,3-olein; 1,2-olein. Nồng độ cơ chất 20% có bổ sung chất nhũ hóa gum arabic. Xác định hoạt tính tương đối của lipase so với mẫu đối chứng là cơ chất triolein.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ muối mật NaTC đến hoạt tính enzym lipase tinh sạch: thay đổi nồng độ muối mật với các mức 0 (mẫu đối chứng), 0.005M, 0.01M, 0.015M, 0.02M, 0.025M. Xác định hoạt tính tương đối của enzym lipase so với mẫu đối chứng.

Các phương pháp phân tích

Hoạt tính enzyme lipase được xác định theo phương pháp chuẩn độ Mukunda (2006). Một đơn vị hoạt tính lipase (U) được biểu thị là lượng enzym cần thiết để tạo ra 1 μmol axit béo trong 1 giờ ở 37°C , pH=8. Cơ chất phản ứng là triolein, nồng độ 20%, có sử dụng chất nhũ hóa là gum arabic.

Hàm lượng protein hòa tan được xác định theo phương pháp Lowry (1951)

Công thức tính toán

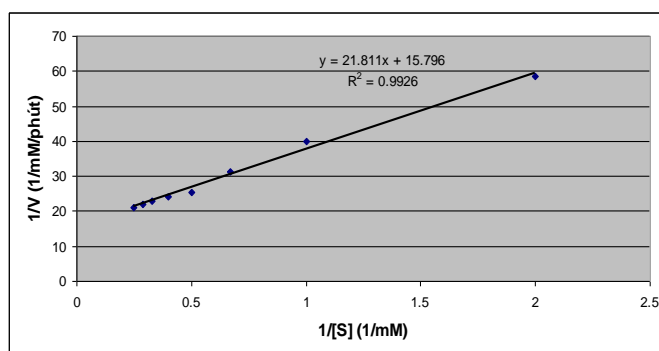
Hoạt tính tương đối là tỷ lệ phần trăm giữa hoạt tính enzyme còn lại và hoạt tính enzyme ban đầu. Hoạt tính riêng là số đơn vị hoạt tính enzyme được tính trên 1mg protein của chế phẩm. Hiệu suất thu hồi là tỷ lệ giữa tổng hoạt tính enzyme thu được sau quá trình tinh sạch và tổng hoạt tính enzyme trong mẫu trước khi đem tinh sạch. Độ tinh sạch được tính theo tỷ lệ giữa hoạt tính riêng của enzyme thu được sau quá

trình tinh sạch và hoạt tính riêng của mẫu enzyme trước khi đem tinh sạch.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Xác định thông số động học K_m và V_{max} của enzyme lipase tinh sạch

Thông số động học K_m và V_{max} được xác định bằng thực nghiệm theo phương pháp Lineweaver- Burk, kết quả thể hiện ở hình 3.1



Hình 3.1. Đồ thị Lineweaver- Burk của lipase tinh sạch trên cơ chất triolein

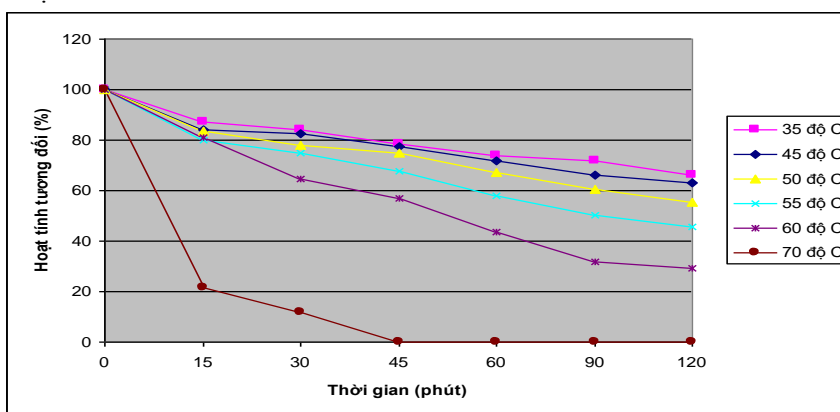
Giá trị K_m và V_{max} của lipase tinh sạch khi thủy phân cơ chất triolein được xác định với $K_m = 1.381$ mg/L và $V_{max} = 0.063$ mg/L.min.

0.056 mM/L thấy rằng lipase từ gan tụy cá tra có hoạt tính tương đương.

So sánh với kết quả nghiên cứu “Tinh sạch và xác định tính chất của lipase *Trichoderma viride*” của Akram Kashmiri M. và cộng sự (2006) khi cho lipase thủy phân cơ chất triolein xác định giá trị $K_m = 1.14$ mM/L và $V_{max} =$

Khảo sát độ bền nhiệt độ theo thời gian của enzyme lipase tinh sạch

Thí nghiệm tiến hành khảo sát độ bền nhiệt của enzyme lipase tinh sạch theo thời gian nhằm định hướng ứng dụng, kết quả thể hiện ở hình 3.2



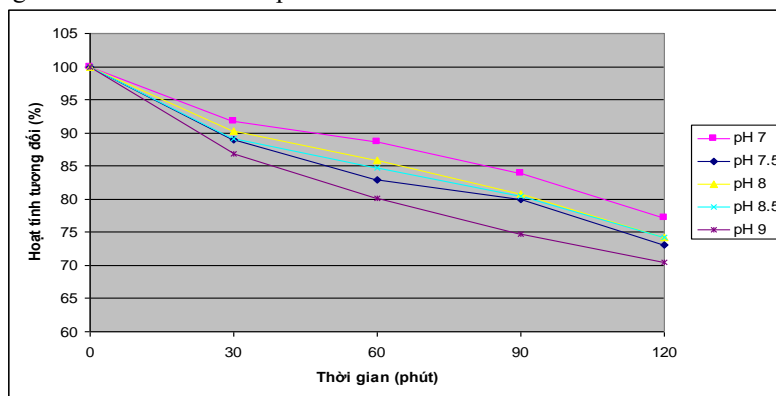
Hình 3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính lipase tinh sạch theo thời gian

Theo kết quả hình 3.2 cho thấy ở nhiệt độ thấp 35-50°C, lipase bền nhiệt hơn ở nhiệt độ cao 55-70°C, tại nhiệt độ tối ưu 50°C sau thời gian 120 phút hoạt tính lipase giảm 44.7%. Khi nhiệt độ cao hơn 55°C tốc độ giảm hoạt tính lipase nhanh hơn, ở nhiệt độ 60°C sau 120 phút hoạt tính lipase giảm 70.61%, ở nhiệt độ 70°C sau 15 phút hoạt tính lipase giảm 78.68% và sau 45 phút mất

hoạt tính lipase do hiện tượng biến tính bất thuận nghịch protein enzym.

Khảo sát độ bền pH theo thời gian của enzym lipase tinh sạch

Thí nghiệm khảo sát độ bền của enzym lipase tinh sạch trong các môi trường có pH khác nhau theo thời gian, kết quả thể hiện ở đồ thị hình 3.3



Hình 3.3. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính lipase tinh sạch theo thời gian

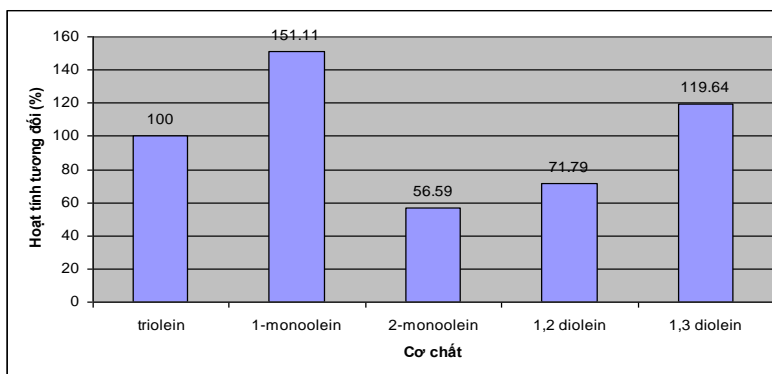
Theo kết quả hình 3.3 cho thấy trong khoảng pH 7-9 lipase khá bền pH theo thời gian, sau 120 phút hoạt tính tương đối lipase từ 70% trở lên. Ở pH 7 sau 120 phút hoạt tính tương đối lipase còn 77.18%. Ở pH 9 sau 120 phút hoạt tính tương đối lipase còn 70.53%

Ảnh hưởng của loại cơ chất đến hoạt tính enzym lipase tinh sạch

Từ kết quả hình 3.4 cho thấy khi cơ chất là 1-monoolein thì hoạt tính lipase tăng 51.11%, khi cơ chất là 1,3 diolein thì hoạt tính lipase tăng 11.96% so với mẫu đối chứng sử dụng cơ chất là triolein. Ngược lại khi cơ chất là 1,2 diolein thì hoạt tính lipase giảm 28.21%, khi cơ chất là 2-

monoolein thì hoạt tính lipase giảm 43.41% so với mẫu đối chứng. Điều này cho thấy lipase gan tụy cá tra có tính thủy phân đặc hiệu liên kết ester ở vị trí 1,3 của triglyceride.

Mukundan M.K. và cộng sự (2006) khi nghiên cứu ‘Tinh sạch và xác định đặc tính lipase từ gan tụy cá mè *Sardinella Longgiceps*’ cũng cho thấy lipase gan tụy cá mè thủy phân liên kết ester ở vị trí 1,3 của triglyceride. Trong khi đó, theo nghiên cứu ‘Tinh sạch và xác định tính chất lipase từ ruột cá Tilapia’ của Akiko Taniguchi và cộng sự (2001) thì lipase này thủy phân liên kết ester vị trí 1,2 của triglyceride.

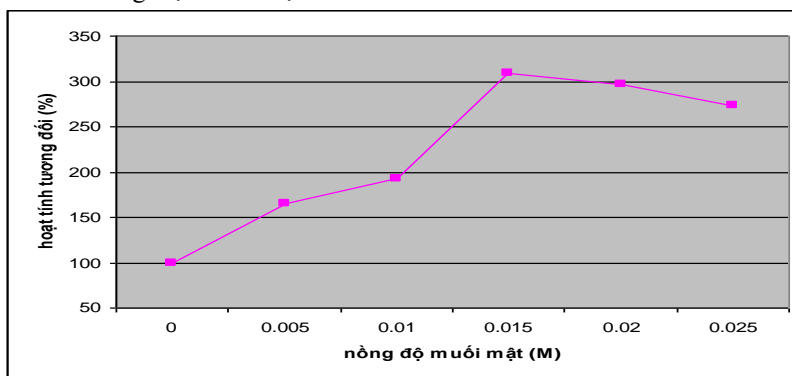


Hình 3.4. Ảnh hưởng của cơ chất đến hoạt tính lipase tinh sạch

Ảnh hưởng của nồng độ muối mật NaTC đến hoạt tính enzym lipase tinh sạch

Thí nghiệm khảo sát hoạt tính tương đối lipase gan tụy cá tra ở các nồng độ muối mật NaTC

khác nhau so với mẫu đối chứng không bổ sung muối mật, kết quả thể hiện ở đồ thị sau:



Hình 3.5. Ảnh hưởng của muối mật (NaTC) đến hoạt tính lipase tinh sạch

Từ kết quả hình 3.5 cho thấy khi có muối mật NaTC nồng độ 0.005-0.01M thì hoạt tính lipase tăng lên 1.64 đến 1.92 lần so với mẫu không bổ sung NaTC. Tại nồng độ muối mật NaTC 0.015M thì hoạt tính lipase cao nhất, gấp 3.08 lần so với mẫu đối chứng nhưng khi tiếp tục tăng nồng độ muối mật lên 0.02-0.025M thì hoạt tính lipase giảm.

Kết quả này trùng hợp với nghiên cứu “Tinh sạch và xác định tính chất lipase từ gan tụy cá tráp *Pagrus major*” của N. Iijima và cộng sự (1998), cho thấy lipase gan tụy tăng hoạt tính khi

có sự hiện diện của muối mật NaTC ở nồng độ 15 mM.

KẾT LUẬN

Thông số động học của enzym lipase tinh sạch từ gan tụy cá tra (*Pangasius*) được xác định cho kết quả $K_m = 1.381$ mM và $V_{max} = 0.063$ mM/min với cơ chất triolein. Lipase tinh sạch có hoạt tính ổn định ở khoảng pH 7 - 9, nhiệt độ 35 - 50°C trong khoảng thời gian 120 phút. Lipase tinh sạch thủy phân cơ chất đặc hiệu vị trí α - 1,3 của triglyceride. Ở nồng độ muối mật NaTC 0.015M hoạt tính của enzym lipase tăng gấp 3.08 lần so với mẫu không bổ sung muối mật NaTC.

Biochemical properties and positional specificity of Lipase from hepatopancreas of Tra catfish (*Pangasius*)

- **Vuong Bao Thy**
- **Tran Bich Lam**

University of Technology, VNU-HCM

- **Luu Duan**

SaiGon Technology University

ABSTRACT

Lipase from the hepatopancreas of Tra catfish (*Pangasius*) was precipitated by ammonium sulfate fractionation, purified by ion-exchange chromatography on DEAE cellulose and gel filtration on Sephadex G-75. On substrate triolein, purified lipase has $K_m = 1.381$ mM and $V_{max} = 0.063$ mM/min. The lipase was stable at a pH range of 7.0-

9.0 and in temperatures of 35-50°C. At 50°C the enzyme loosed 44,7% activity after 120 min. The enzyme was specific for the α -positions (1, 3) of triglyceride. In bile salt solution of 0.015M NaTC, lipase activity of the enzyme increased in 3.08 folds in comparison of sample without NaTC.

Keywords: lipase, tra catfish, hepatopancreas.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Akram Kashmiri M., Ahmad Adnan* and Beenish Waseem Butt (2006) Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma Viride*. African Journal of Biotechnology Vol. 5 (10), p. 878-882
- [2]. Akiko Yamada Taniguchi (2004). Purification and properties of lipase from *Tilapia* intestine: Digestive enzyme of Tilapia-X. Fisheries Science, p.688-694
- [3]. Alberta N.A.Aryee, Benjamin K.Simpson and Reynaldo Villalonga (2007) Lipase fraction from the viscera of grey mullet (*Mugil cephalus*) Isolation, partial purification and some biochemical characteristics. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol 40 (3), p. 394-400.
- [4]. Beisson F., Tiss A., Rivière C., Verger R., (2000) Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, p. 133-153.
- [5]. Bryjak M. and Sztajer H. (1989) Capillar membranes for purification of *Pseudomonas fluorescens* lipase, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Vol 4 (6), p.257-259.
- [6]. Iijima, N., S. Tanaka and Y.Ota, (1998) Purification and characterization of bile saltactivated lipase from the hepatopancreas

- of red sea beam (*Pagrus major*). *Fish Physiol. Biochem.*, 18:59-69.
- [7]. Gjellesvik, D.R., Lambordo, D., Walther, B.T. (1989) Partial purification and characterisation of a triglyceride lipase from cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*. 79: 177-184.
- [8]. Mukundan M. K., Gopakumar K., Nair M. R. (2006) Purification of a lipase from the hepatopancreas of oil sardine (*Sardinella longiceps linnaeus*) and its characteristics and properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36, p. 191 – 203.
- [9]. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L & Randall R J., (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, p. 193:265.
- [10]. Poonsuk Prasertsan (2008) Comparison and Selection of protease and lipase sources from visceral organs of three tuna species. *Songklanakarin J.Sci. Technol.*
- [11]. Vương Bảo Thy, Trần Bích Lam, Lưu Duẩn (2011) Preparation, purification and properties of Lipase from hepatopancreas of Tra (*pangasius*) catfish. *Tạp chí phát triển KH&CN*, tập 14, K3
- [12]. Vương Bảo Thy, Trần Bích Lam, Lưu Duẩn (2011) Properties of digestive enzymes from visceral organs of Tra (*pangasius*) catfish. *Tạp chí phát triển KH&CN*, tập 14, K4.