

SO SÁNH HIỆU QUẢ THU NHẬN ENZYME SUPEROXIDE DISMUTASE TỪ SỰ PHÁ VỠ TẾ BÀO SACCHAROMYCES CEREVISIAE BẰNG PHƯƠNG PHÁP CƠ HỌC VÀ HÓA HỌC

Đống Thị Anh Đào - Nguyễn Đức Lượng
Trường Đại học Kỹ thuật

Lê Văn Nhung
Viện Công nghệ Sinh học & Thực phẩm Trường Đại học Bách khoa Hà nội

Yumi Yoshikawa - Kanji Matsumoto
Faculty of Engineering – Yokohama National University
(Bài nhận ngày 18/10/1999)

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Enzyme Superoxide Dismutase EC 1.15.1.1.(được gọi tắt là SOD) là enzyme oxy hóa khử (Oxydoreductase), thuộc loại metalloprotein. SOD được khẳng định là một enzym bởi Joe Mccord and Irwin Fridovich (1969). SOD luôn tồn tại trong tế bào sinh vật, là nhân tố quan trọng thực hiện nhiệm vụ xúc tác cho phản ứng oxy hóa khử loại trừ O_2^- được sinh ra trong quá trình hô hấp chuyển các chất hữu cơ thành năng lượng ATP. O_2^- là nguyên nhân khởi đầu cho sự phân cắt mạch protein, lipid, polisaccharide, acid nucleic thành những gốc tự do gây lão hóa tế bào. Cơ chế xúc tác cho phản ứng loại trừ O_2^- xảy ra như sau:

SOD



Tùy theo ion kim loại được mang ở coenzyme mà SOD được phân thành ba loại như sau:

- * Cu,Zn-SOD (Coper, zinc-superoxide dismutase)
- * Mn-SOD (Mangan-superoxide dismutase)
- * Fe-SOD (Ferri-superoxide dismutase).

Những thành tựu về nghiên cứu SOD được xem là những thắng lợi to lớn của ngành công nghệ enzyme và lãnh vực Y học của thế kỷ 20. Chúng tôi đã thử nghiệm thu nhận SOD từ nguồn tế bào *Saccharomyces cerevisiae* bằng các phương pháp phá vỡ tế bào khác nhau: phương pháp cơ học, phương pháp hóa

học và phương pháp kết hợp hóa học và cơ học. Với mỗi phương pháp đều tìm thấy được điều kiện phá vỡ tế bào thích hợp mang lại hiệu quả thu nhận SOD cao và được so sánh để có thể thấy được phương pháp có nhiều lợi điểm.

II NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

II.1 Nguyên liệu - thiết bị:

a) Nguồn Nguyên liệu để thu nhận enzyme SOD trong các thí nghiệm của chúng tôi là nấm men bánh mì *Saccharomyces cerevisiae* có độ ẩm 70%, được ép thành bánh, và được bảo quản lạnh ở -12°C để sử dụng trong khoảng 6 ngày sau khi được cung cấp.

b) Hóa Chất:

_ Hóa chất tinh khiết được sử dụng để phân tích định lượng hoạt tính SOD: xanthine, xanthine oxidase, cytochrome C, và hóa chất tinh khiết được sử dụng phân tích hàm lượng protein được phóng thích: Coomassi Blue G250, BSA, H_3PO_4 , CuSO_4 .

_ Hóa chất tinh khiết dùng để phá vỡ tế bào bằng phương pháp hóa học: acetate ethyl, các dung dịch đệm xử lý nguyên liệu pH=3-13, dung dịch muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nồng độ 0,5-1M.

c) Thiết bị thí nghiệm: nghiền tế bào bằng phương pháp cơ học được thực hiện bởi:

_ Máy nghiền bi liên tục KDL, tốc độ quay tối đa là $\omega_{\max} = 5400\text{rpm}$, hệ số đổ đầy bi được chọn là 0.65, bi thủy tinh được dùng có đường kính 0.5mm.

_ Máy đồng hóa cao áp liên tục Manton Gauline, có áp suất đồng hóa tối đa là 1000bar.

_ Máy ly tâm lạnh cao tốc, vận tốc max của roto: 10000rpm

_ Quang phổ kế Shimazu UVvis 1200.

II.2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

II.2.1 Các phương pháp phá vỡ tế bào:

Công đoạn phá vỡ tế bào vi sinh vật là công đoạn cần thiết để trích chiết enzyme nội bào, các phương pháp phá vỡ tế bào vi sinh vật có thể được áp dụng, được trình bày ở hình 1. Phương pháp không cơ học phát triển sau nhưng đã đem lại nhiều ưu điểm hơn so với các phương pháp cơ học.

Tế bào nấm men bánh mì *Saccharomyces cerevisiae* được phá vỡ bởi các phương pháp cơ học như nghiền bi, nghiền cao áp, phương pháp hóa học như thẩm thấu vách tế bào bởi dung môi acetate ethyl và thủy phân vách tế bào bằng pH kiềm để thu nhận SOD. Bên cạnh đó, phương pháp phá vỡ tế bào bằng phương pháp nghiền có kết hợp xử lý pH trước khi nghiền cũng được thực hiện nhằm nâng cao hiệu quả sự phóng xuất SOD của phương pháp nghiền. Hiệu quả của các quá trình theo từng điều kiện khác nhau được khảo sát theo sự biến thiên hoạt tính riêng của Cu,Zn-SOD, Mn-SOD: đơn vị hoạt tính SOD/mg protein tổng (U/mg protein).

II.2.2 Phương pháp phân tích

- 1) Hoạt tính SOD được định lượng bằng phương pháp Cytochrome C.
- 2) Protein được định lượng theo phương pháp Lowry.

III KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

III.1 Nghiền tế bào bằng máy nghiền bi:

Năng lượng cung cấp cho dòng dịch huyền phù tế bào nấm men ở dạng động năng, một phần động năng chuyển thành cơ năng gây nên lực phá vỡ tế bào và một phần chuyển thành nhiệt năng, nâng cao nhiệt độ dịch nghiền, có thể gây biến tính protein, do đó cần phải tốn năng lượng làm lạnh để giải nhiệt cho dịch nghiền.

Với hệ số độ chứa đầy của bi và đường kính bi đã được chọn thích hợp, thì hiệu quả phóng thích enzyme SOD bởi máy nghiền bi có quan hệ mật thiết với tốc độ vòng ω và thời gian nghiền. Hàm lượng các chất nội bào phóng thích càng tăng cao theo sự tăng theo thời gian nghiền t và tốc độ vòng ω của rôto, nhưng hoạt tính SOD chỉ tăng đến một giá trị giới hạn bởi sự tồn tại ở một lượng nhất định trong tế bào và do một phần SOD bị thất hoạt bởi điều kiện nghiền như thời gian nghiền quá dài hoặc tốc độ nghiền tăng cao. Do đó, hoạt tính riêng SOD cũng tăng đến một giá trị giới hạn, sau đó giảm dần. Sự biến thiên hoạt tính riêng SOD theo tốc độ vòng ω và thời gian nghiền t được biểu thị trên đồ thị 1, có thể thấy rằng khi thời gian nghiền $t > 2\text{min}$ và tốc độ vòng $\omega > 3200\text{rpm}$ thì giá trị hoạt tính riêng Cu,Zn-SOD ở các tốc độ nghiền đều có khuynh hướng giảm. Giá trị hoạt tính riêng Mn-SOD cũng gần như không tăng ở điều kiện này. Vậy, điều kiện nghiền thích hợp có thể thu nhận được Cu,Zn-SOD đạt hoạt tính cao nhất là $\omega = 3200\text{rpm}$ và $t = 2\text{min}$.

III.2 Nghiền tế bào bằng máy nghiền cao áp:

Đồ thị 2 biểu thị sự biến thiên giá trị hoạt tính riêng SOD theo áp suất đồng hóa (P) và số lần hoàn lưu (n). Hoạt tính riêng Cu,Zn-SOD càng tăng cao

theo sự tăng của P và n với điều kiện $P \leq 600\text{bar}$ và $n \leq 10$, và trở nên giảm dần ở những chế độ nghiền vượt khỏi điều kiện này. Trong khi hoạt tính riêng Mn-SOD vẫn tăng cao dần theo sự tăng của P và của n . Sự hoàn lưu dịch nghiền là cần thiết đối với phương pháp nghiền cao áp, nếu số lần hoàn lưu quá nhỏ thì số tế bào sót không vỡ sẽ cao, hoặc nếu số lần hoàn lưu nhỏ nhưng áp dụng với áp suất đồng hóa rất cao để giảm chu kỳ hoàn lưu thì cũng không đạt hiệu quả trích chiết SOD hay sản phẩm nội bào nói chung. Nếu áp dụng áp suất nghiền hay số lần hoàn lưu dịch men càng cao (khoảng vài chục lần) thì tiêu tốn năng lượng rất lớn và dòng dịch men nghiền bị nâng nhiệt độ lên rất cao, gây thất hoạt enzyme. Do đó áp suất nghiền $P = 600\text{bar}$ và số lần hoàn lưu $n = 10$ là điều kiện thích hợp phá vỡ tế bào, phóng thích Cu,Zn-SOD hiệu quả.

III.3 Phương pháp kết hợp của nghiền bi với xử lý pH trước khi nghiền

Tế bào nấm men được phân tán trong các dung dịch đệm có pH=8 -13 trong những khoảng thời gian khác nhau, từ 0,5-4,0h. Sự ảnh hưởng đồng thời của pH >8 và thời gian xử lý kiềm đến hiệu quả thu nhận Cu,Zn-SOD so với trường hợp không xử lý pH được biểu diễn theo sự biến thiên tỉ số hoạt tính R của Cu,Zn-SOD trên đồ thị 3. Khi thời gian xử lý ngắn, khoảng 0,5h thì hiệu quả thu nhận enzyme chỉ tăng cao nhất khoảng 10% ở pH11. Khi thời gian xử lý trong khoảng 1-3h thì hiệu quả thu nhận enzyme tăng cao nhất, đạt khoảng 25% ở các giá trị pH khác nhau. Có thể thấy rằng nếu xử lý nấm men trong 1h thì đạt hiệu quả cao nhất ở pH=11-12, ở trường hợp 2h xử lý thì đạt hiệu quả ở pH10-11. Nếu xử lý trong thời gian 3-4h thì chỉ có thể dùng môi trường pH thấp khoảng 9-10. Do đó xử lý bằng dung dịch pH=11-12 trong khoảng thời gian 1h là thích hợp đạt hiệu quả thu nhận enzyme cao.

Vì vách tế bào có chứa các thành phần có thể bị thủy phân trong kiềm như: glucan, mannoprotein, lipid, do đó vách, màng tế bào bị thủy phân hư hỏng cục bộ khi tiếp xúc môi trường pH kiềm, khiến cho tế bào bị vỡ nhanh chóng dễ dàng hơn trong quá trình nghiền. Khi giá trị pH càng cao thì tỉ số hoạt tính $R_{\text{Cu,Zn-SOD}}$ càng giảm thấp dưới 1, Kết quả này chứng tỏ rằng SOD được chiết xuất ra môi trường sau khi tế bào vỡ, đã bị giảm hoạt tính trong môi trường pH kiềm cao, hiệu quả thu nhận Cu,Zn-SOD trở nên giảm thấp khi xử lý nguyên liệu ở pH cao.

III.4 Phá tế bào bằng sự thẩm thấu dung môi acetat ethyl

Phương pháp tự phân tuy không tốn năng lượng nhưng có nhược điểm là quá trình vỡ tế bào diễn tiến chậm và thu nhận sản phẩm sinh học nội bào không triệt để. Để khắc phục các nhược điểm này, dung môi hữu cơ như toluen, acetate ethyl được dùng làm tác nhân thẩm thấu qua vách tế bào và hòa tan lipid có trong các thành phần vách và màng tế bào, gây hư hỏng mạng lưới cấu trúc, tạo nên các vi lỗ trên vách và màng tế bào là con đường thâm nhập của dung

dịch sunfat amon, dẫn đến sự hòa tan và phóng xuất các chất nội bào. Hàm lượng acetat ethyl (ac) thẩm thấu đã có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính riêng Cu,Zn-SOD, (đồ thị 4), hoạt tính riêng đạt cao nhất ở điều kiện sử dụng acetat ethyl 4-7% trong khoảng thời gian trích 15-20h; với thời gian trích ly này, Cu,Zn-SOD được thu nhận một cách hiệu quả nhất, và theo thời gian trích ly $t > 20h$ thì chỉ các loại protein khác được phóng thích ở hàm lượng tăng cao gây giảm hoạt tính riêng Cu,Zn-SOD.

Nồng độ sunfat amon (sa) cần thiết để tạo nên áp suất thẩm thấu, đồng thời hòa tan và trích ly sản phẩm nội bào ra khỏi tế bào nhanh chóng. Giá trị hoạt tính riêng Cu,Zn-SOD gần như nhau khi trích ly bằng sunfat amon 0,5M và 1M trong điều kiện acetat ethyl 4% và 10%. Do vách, màng tế bào bị hư hỏng ở mức độ thấp khi thẩm thấu bằng acetat ethyl 4%, nên khả năng xâm nhập cũng như trích ly protein của dung dịch sunfat amon đều kém mặc dù có nồng độ khá cao là 1M; và khi sử dụng acetat ethyl 10% thì vách, màng tế bào bị hư hỏng nhiều, tạo thuận lợi cho sự trích chiết protein, do đó nồng độ sunfat amon cao không ảnh hưởng lớn đến hoạt tính riêng Cu,Zn-SOD.

III.4 Thủy phân vách tế bào bằng dung dịch kiềm

Quá trình phá vỡ vách và màng tế bào bằng phương pháp thủy phân bởi dung dịch kiềm cũng có đặc điểm giống như quá trình phá vỡ vách và màng tế bào bằng phương pháp thẩm thấu qua vách tế bào bằng dùng môi hữu cơ là không tiêu tốn năng lượng đáng kể, và phải tốn thời gian khá dài để phá vỡ tế bào trích chiết được enzyme. Phương pháp phá vỡ vách và màng tế bào bởi sự thủy phân bằng dung dịch kiềm chính là sự thủy phân glucan, mannoprotein và lipit có trong các thành phần vách và màng tế bào, sự thủy phân gây hỏng mạng lưới cấu trúc vách và màng tế bào, đưa đến vỡ tế bào và các chất nội bào tự phóng xuất ra môi trường ngoài. Đồ thị 5 cho thấy giá trị hoạt tính riêng max của Cu,Zn-SOD đạt được thấp hơn, hàm lượng protein tổng được phóng thích cao hơn nhiều so với các giá trị đạt được theo phương pháp thẩm thấu acetat ethyl. Chính phương pháp thủy phân bằng kiềm đã và dễ gây hư hại sản phẩm nội bào. Đồ thị đã chỉ ra khi nồng độ kiềm tăng cao thì hoạt tính riêng Cu,Zn-SOD max bị giảm thấp nhanh cùng theo sự tăng thời gian trích chiết. Mn-SOD cũng thu nhận được ở hàm lượng nhỏ và tăng lên theo thời gian trích ly.

IV KẾT LUẬN

— Cu,Zn-SOD luôn luôn được phóng thích khỏi tế bào với liều lượng cao hơn một cách đáng kể so với Mn-SOD ở bất kỳ điều kiện của các phương pháp phá vỡ tế bào.

_ Phương pháp nghiền bi và phương pháp nghiền cao áp được thực hiện ở điều kiện thích hợp đều thu nhận được enzyme Cu,Zn-SOD có hoạt tính cao như nhau.

_ Protein được chiết xuất ở hàm lượng rất cao bởi hai phương pháp nghiền cơ học (nghiền bi và nghiền cao áp), và bởi phương pháp thủy phân bằng dung dịch kiềm.

_ Phương pháp kết hợp của nghiền bi và dùng dung dịch đệm pH=10 -11 đã cho hiệu quả nghiền tăng cao, là phương pháp khả thi vì đã nâng cao hiệu quả quá trình nghiền, do đó có thể giảm tốc độ vòng mà vẫn đạt hiệu quả thu nhận enzyme mong muốn.

_ Phương pháp thẩm thấu bằng acetat ethyl không tiêu tốn năng lượng cao như phương pháp cơ học, nhưng vẫn đạt hiệu quả thu nhận Cu,Zn-SOD cao tương tự như các phương pháp cơ học và phương pháp thủy phân bằng kiềm; bên cạnh đó protein được trích chiết ở hàm lượng thấp, tạo điều kiện thuận lợi cho công đoạn tinh sạch Cu,Zn-SOD.

_ Có thể phá vỡ tế bào bằng dung dịch pH kiềm nồng độ tương đối thấp, trong thời gian khá dài để bảo vệ SOD ít bị tổn hại.

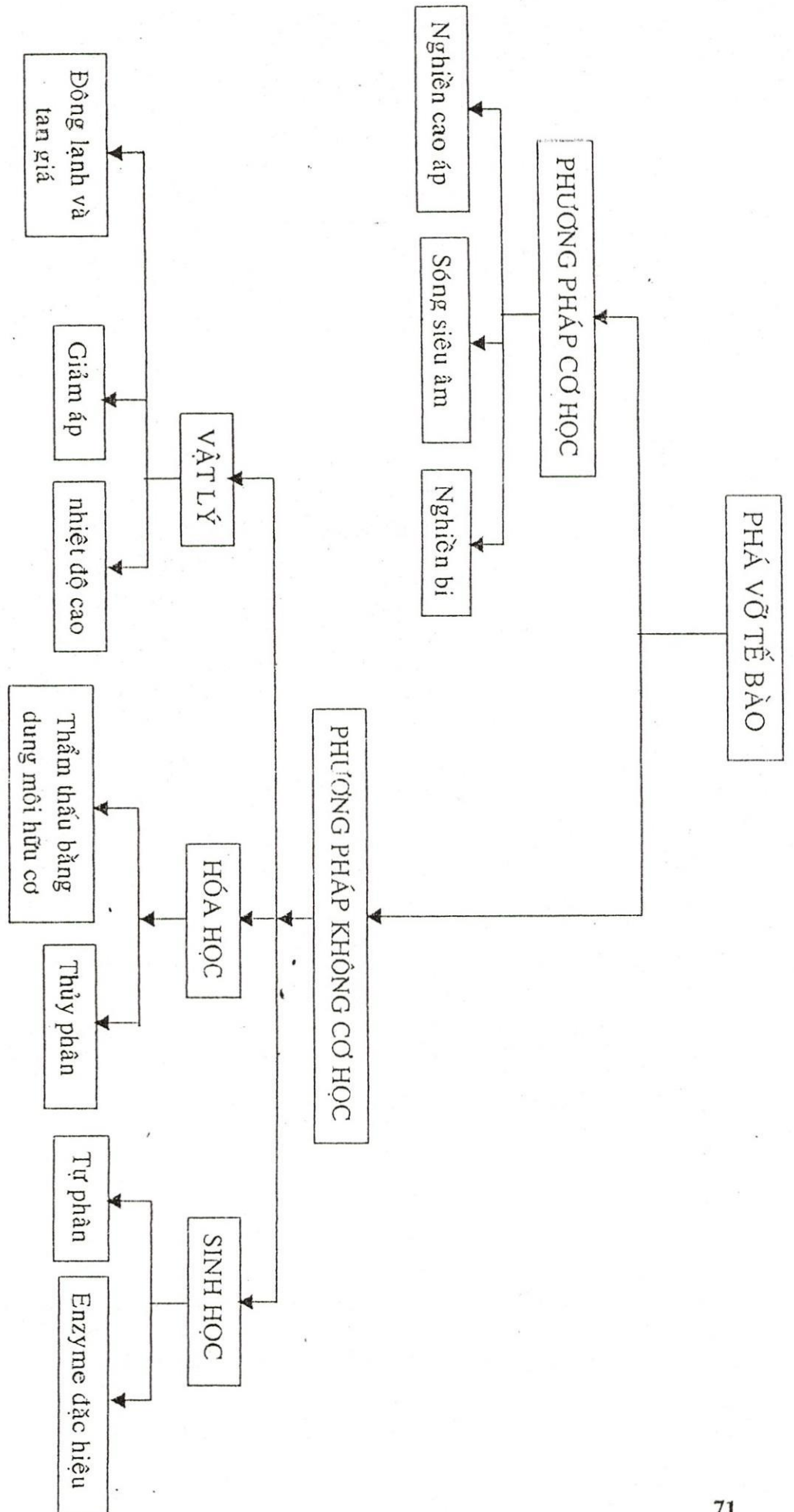
EFFICIENCY COMPARISON OF SOD RELEASE FROM BAKERS' YEAST CELLS BY THE MECHANICAL CHEMICAL DISRUPTION METHODS

**Dong Thi Anh Dao – Nguyen Duc Luong – Le Van Nhung
Yumi Yoshikawa - Kanji Matsumoto**

Efficiencies of the release of superoxide dismutase (SOD) and protein from bakers' yeast cells by the cell-disruption of agitating bead mill, high pressure homogenizer and the cell lysis of acetate ethyl, alkali solution were investigated on the fractional activity values of SOD. The same efficiencies of Cu,Zn-SOD release can be attained by the optimal conditions of these disruption methods. Beside that, the combination of alkali treatment and mechanical disruption was also realized that, showed it is an available method can enhance highly the efficiency of cell disruption and SOD release. The lysis method of acetate ethyl extracted a insignificant amount of Mn-SOD and a small amount of nucleic acid, that is advantage to purify Cu,Zn-SOD.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Darbyshire, *J. Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.*, **5**, 147-186 (1981).
- [2] H. Schotte, K.H. Kroner, H. Hustedt and M.R. Kula, *Enzyme Microb. Technol.*, **5**, 143-148 (March 1983).
- [3] I. Takagawara, T. Fujita, Y. Suzuki, J. Yamauchi, K. Fujii, J. Yamashita and T. Horio, *Hatsukou to Kougyou*, (tiếng Nhật) **35**(9), 737-739 (1982).
- [4] Tae Ho Lee and Sang Ok Lee, *Agric. Biol.Chem.*, **52**(6), 1361-1367 (1988).
- [5] A.V. Peskin, Y.M.Koen and I.B. Zbarsky, *FEBS Lett.*, **78**, 41 (1977).
- [6] Y. Ljubljana, *7th European symposium Communication*, June 12-14, 55-77 (1990).
- [7] J.M. McCord and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055 (1969).
- [8] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- [9] A.V. Melendres and H. Uno, *Doctor Thesis of Engineering*, January, Tokyo Univ. (1993).
- [10] K. Matsumoto, S. Ito, H. Ohya and M. Naito, *Huntaikougakukai Shi*, (tiếng Nhật), **26**, 61-66 (1989).
- [11] C.R. Engler and C.W. Robinson, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 765-780 (1981).
- [12] Y. Yoshikawa, A. D. T. Dong, X. x. Hui, K. Matsumoto, *J. Soc. Powder Technol., Japan*, **36**, 534-541 (1999).



Hình 1: Sơ đồ các phương pháp phá vỡ tế bào vi mô vật

