

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ  
VIỆN CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM  
301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

---

## **BÁO CÁO TỔNG KẾT KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT**

### **Đề tài cấp nhà nước**

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ ENZYM  
TRONG CHẾ BIẾN MỘT SỐ NÔNG SẢN THỰC PHẨM**

**MÃ SỐ : KC 04 – 07**

***Chủ nhiệm đề tài cấp nhà nước : PGS. TS. Ngô Tiến Hiển***

### **Đề tài nhánh cấp nhà nước**

**NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT MỘT SỐ LOẠI DẦU BÉO  
BẰNG LIPAZA**

***Chủ nhiệm đề tài nhánh cấp nhà nước : PGS. TS. Đặng thị Thu***

**Hà Nội, 10 – 2004  
Bản thảo viết xong tháng 09 – 2004**

---

*Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện đề tài cấp nhà nước,  
mã số : KC 04 - 07.*

## DANH SÁCH NGƯỜI THỰC HIỆN

| STT | Họ và tên       | Cơ quan công tác         | Mục |
|-----|-----------------|--------------------------|-----|
| 1   | Đặng Thị Thu    | Đại Học Bách Khoa HN     |     |
| 2   | Quyên Đình Thi  | Viện CNSH TTKHTN và CNQG |     |
| 3   | Phùng Thị Thủy  | Đại Học Bách Khoa HN     |     |
| 4   | Hoàng Lan       | Đại Học Bách Khoa HN     |     |
| 5   | Đỗ Biên Cương   | Đại Học Bách Khoa HN     |     |
| 6   | Thiều Linh Thuỳ | Đại Học Bách Khoa HN     |     |
| 7   | Nguyễn Thị Sánh | Đại Học Bách Khoa HN     |     |
|     |                 |                          |     |

## TÓM TẮT NỘI DUNG

Lipase (EC 3.1.1.3) là enzym được ứng dụng trong nhiều ngành như công nghiệp thực phẩm, công nghiệp hoá học, công nghiệp mỹ phẩm, công nghiệp da, trong y dược và các ngành công nghiệp khác do có khả năng xúc tác thủy phân triglycerit thành di, mono glycerit hoặc glyxerol và các axit béo nhờ hoạt động trên bề mặt phân pha dầu nước. Trong công nghiệp dầu và chất béo, việc sử dụng lipase đã rất phổ biến. Có khoảng hơn 100 loại lipase khác nhau được dùng để chuyển đổi lipid thành các chất khác

Hiện nay, Việt Nam đã sử dụng một lượng lớn lipase trong ngành công nghiệp thực phẩm, công nghiệp tẩy rửa, hoá học, y học... song các chế phẩm lipase đang sử dụng phần lớn là nhập khẩu. Do vậy, mục đích của đề tài tập trung nghiên cứu thu nhận và sử dụng hiệu quả lipase từ hai đối tượng là nấm men *Candida rugosa* và *Bacillus sp*

### Phương pháp nghiên cứu

- Vi sinh vật được nuôi cấy theo phương pháp nuôi chìm cả 2 chủng *Candida rugosa* và *Bacillus sp* trên máy lắc lắc ổn nhiệt Shellab và trên thiết bị lên men 2 lít.
- Xác định hoạt độ lipase bằng phương pháp chuẩn độ.
- Cố định lipase trên nylon 6 bằng liên kết đồng hoá trị.
- Tách và tinh chế lipase bằng etanol và sắc ký trao đổi ion DEAE cellulose.
- Bằng phương pháp toán học thực nghiệm tối ưu môi trường nuôi cấy theo mô hình bậc 1 của Box Wilson.
- So sánh sản phẩm phomat được chế biến có bổ sung lipase và không bổ sung lipase bằng phương pháp cảm quan thực phẩm.

### Đề tài đã thu được những kết quả chính sau:

- Tìm được điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sinh tổng hợp lipase từ *Candida rugosa* cho một lít là:

Môi trường nuôi gồm:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 15 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 5,5 g;  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 4g;  $\text{MgSO}_4$ : 1g;  $\text{FeCl}_3$ : 10mg; inositol: 0,004mg; biotin:

0,008mg; Thiamine.HCl: 0,2mg; Dầu oliu: 1%; axit palmitic: 1.2 g;  
H<sub>2</sub>O: 1000ml;

Số tế bào nấm men cấy ban đầu:  $2,6 \cdot 10^6$  tb/ml canh trường;

Thời gian nuôi: 40 giờ

- Tìm được điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sinh tổng hợp lipase từ *Bacillus* sp là: môi trường BMGY với thành phần: (1% (w/v) cao nấm men, 2% (w/v) bacto-peptone, 100 mM kali phosphate, pH 7.0, 4 x 10<sup>-5</sup>% (w/v) biotin và 1% (v/v) methanol) ở 30°C lắc 220 vòng/phút
- Nồng độ cồn thích hợp cho kết tủa thu lipase là 90%. Lipase sau kết tủa cồn cho chạy sắc ký trên sắc ký đồ cho thấy lipase sau khi qua cột trao đổi ion DEAE - cellulose xuất hiện 3 pick. Tiến hành xác định hoạt độ lipase ở các phân đoạn. Kết quả cho thấy chỉ có pick 1 và pick 3 có hoạt tính lipase (69UI/ml và 77UI/ml) và Lip1 và Lip3 có khối lượng phân tử là 58 và 62 kDa. Lipase sau các bước làm sạch: kết tủa etanol, sắc ký trao đổi ion DEAE – Cellulose thu được chế phẩm có hoạt độ riêng 55,16 U/mg protein, mức độ tinh sạch là 12,5 lần; hiệu suất thu hồi là 37,06%.
- Đã khảo sát được các điều kiện tối ưu để cố định lipase trên Nylon-6 đó là: nồng độ HCl chất mang là 3,5N; glutaraldehyt là 10%, nồng độ lipase đem cố định là 1mg/ml (550U/ml); sử dụng dung dịch đệm phosphat pH 7,7.
- Đã xác định một số đặc tính của lipase cố định trên Nylon-6
  - Nhiệt độ tối ưu là 70°C, bền ở vùng nhiệt độ 40 - 60°C, sau 18 giờ hoạt độ còn lại là 52,4 – 66,7%.
  - pH tối ưu là 7,0; bền ở vùng pH 7 - 7,5; sau 18 giờ hoạt độ còn 50,6 - 57%.
- Đã xác định một số đặc tính của lipase tan từ *Candida rugosa*
  - Nhiệt độ tối ưu là 60°C, bền ở vùng nhiệt độ 40 - 50°C, sau 18 giờ hoạt độ còn lại là 50,2 - 59%.

- pH tối ưu là 8,0; bền ở vùng pH 7,5 - 8,0, sau 18 giờ hoạt độ còn 53,9 - 62%.
- Điểm đẳng điện của lipase là  $pI = 7,5$
- Ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt tính của lipase:
  - Ion  $Pb^{2+}$  ức chế mạnh (làm giảm hoạt độ tới 33,26%)
  - Các ion  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$  ức chế yếu (làm giảm hoạt tính 13%)
  - Các ion  $Na^+$ ,  $K^+$  không ảnh hưởng.
- Các ion  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  có khả năng hoạt hoá lipase.
- Một số đặc tính lipase từ *Bacillus sp*
  - ♦ Tính đặc hiệu cơ chất đối với tributyrin là cao nhất: 101 U/ml.
  - ♦ Nhiệt độ tối ưu là 70°C (91,1 U/ml).
  - ♦ Lipase có độ bền nhiệt, sau 24 giờ hoạt tính vẫn còn 63%.
  - ♦ pH 9,5 là thích hợp nhất cho phản ứng, hoạt tính đạt 108,1 U/ml.
  - ♦ pH 9,0 đệm Tris-HCl và pH 10,0 đệm glycine không ảnh hưởng tới độ bền của lipase, hoạt tính còn lại vẫn đạt 117%.
  - ♦  $Ca^{2+}$  tăng hoạt tính lipase lên 10-12%, ngược lại  $K^{1+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  giảm hoạt tính lipase từ 11-42%.
  - ♦ Các dung môi hữu cơ đều giảm hoạt tính lipase. Acetone, 2-propanol và ethanol giảm một nửa, methanol giảm một phần tư.
  - ♦ Các chất tẩy ảnh hưởng lên hoạt tính lipase. Triton X-100 tăng hoạt tính lên 63%. Tween 20 giữ nguyên hoạt tính (107%). Tween 80 giảm một nửa. Còn SDS kìm hãm hoạt tính lipase 3%.
- Đã khảo sát khả năng thuỷ phân dầu đậu tương của lipase cố định thu được dầu có chỉ số axit đạt 80,5.
- Sử dụng lipase trong sản xuất phomat kết quả cho thấy phomat có bổ sung lipase đã làm tăng các chỉ tiêu chất lượng cảm quan (màu sắc, hương thơm,...) so với sản phẩm phomat không bổ sung lipase

# MỤC LỤC

|                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Mở đầu.....                                                                                        | 1         |
| <b>TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>                                                                    | <b>2</b>  |
| <b>1.1. CÁC NGUỒN THU LIPASE .....</b>                                                             | <b>2</b>  |
| <b>1.2. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP LIPASE.....</b>                            | <b>3</b>  |
| <b>1.2.1. ảnh hưởng của thành phần môi trường dinh dưỡng.....</b>                                  | <b>3</b>  |
| <b>1.2.2. ảnh hưởng của điều kiện nuôi.....</b>                                                    | <b>5</b>  |
| <b>1.3. Cấu tạo của lipase: .....</b>                                                              | <b>5</b>  |
| <i>1.3.1. Khối lượng phân tử.....</i>                                                              | <i>5</i>  |
| <i>1.3.2. Trình tự axit amin, cấu trúc không gian.....</i>                                         | <i>6</i>  |
| <b>1.4. Một vài đặc tính của lipase .....</b>                                                      | <b>8</b>  |
| <i>1.4.1. Chất hoạt hoá và chất kìm hãm.....</i>                                                   | <i>8</i>  |
| <i>1.4.2. Tính đặc hiệu cơ chất.....</i>                                                           | <b>9</b>  |
| <i>1.4.3. Cơ chế động học xúc tác của lipase.....</i>                                              | <i>11</i> |
| <i>1.4.4. Nhiệt độ và pH hoạt động của lipase.....</i>                                             | <i>12</i> |
| <b>1.5. Tách tinh chế lipase.....</b>                                                              | <b>12</b> |
| <b>1.6. Các phương pháp cố định lipase .....</b>                                                   | <b>14</b> |
| <i>1.6.1. Phương pháp gắn enzym bằng liên kết đồng hoá trị</i>                                     | <i>14</i> |
| <i>1.6.2. Phương pháp gói enzym trong khuôn gel.....</i>                                           | <b>15</b> |
| <i>1.6.3. Phương pháp hấp phụ vật lý trên các chất mang có chứa hoặc không chứa điện tích.....</i> | <i>16</i> |
| <b>1.7. Ứng dụng của lipase.....</b>                                                               | <b>16</b> |
| <i>1.7.1. Trong công nghiệp sản xuất các chất tẩy rửa.....</i>                                     | <i>17</i> |
| <i>1.7.2. Trong công nghiệp thực phẩm.....</i>                                                     | <i>17</i> |
| <i>1.7.3. Trong công nghiệp dược và hoá chất.....</i>                                              | <b>18</b> |
| <i>1.7.4. Trong công nghiệp thuộc da.....</i>                                                      | <b>19</b> |
| <i>1.7.5 Trong công nghiệp mỹ phẩm.....</i>                                                        | <i>19</i> |
| <b>NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP .....</b>                                                            | <b>20</b> |
| <b>2.1. Nguyên liệu.....</b>                                                                       | <b>20</b> |

|                                                                                                         |               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 2.1.1. <i>Chủng vi sinh vật</i> .....                                                                   | 20            |
| 2.1.2. <i>Chất mang Nylon-6</i> .....                                                                   | 20            |
| 2.1.3. <i>Hoá chất</i> .....                                                                            | 20            |
| 2.1.4. <i>Thiết bị sử dụng</i> .....                                                                    | 20            |
| 2.1.5. <i>Môi trường nghiên cứu</i> .....                                                               | 21            |
| <b>2.2. Phương pháp nghiên cứu</b> .....                                                                | <b>22</b>     |
| 2.2.1. <i>Phương pháp vi sinh vật</i> .....                                                             | 22            |
| 2.2.2. <i>Phương pháp hoá sinh</i> .....                                                                | 22            |
| <br><b>KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....                                                                   | <br><b>25</b> |
| <b>3.1. TÌM ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY THÍCH HỢP THU LIPASE</b>                                                 | <b>25</b>     |
| <b>3.1.1. Tìm điều kiện nuôi cấy thích hợp thu lipase từ <i>Candida rugosa</i></b> .....                | <b>25</b>     |
| 3.1.1.1. <b>Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi tới sinh tổng hợp lipaza</b> .....                    | 25            |
| 3.1.1.2. <b>Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ lắc đến quá trình sinh tổng hợp lipaza</b> .....              | 25            |
| 3.1.1.3. <b>Khảo sát ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh tổng hợp lipaza</b> .....                      | 26            |
| 3.1.1.4. <b>Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ axit palmitic đến sinh tổng hợp lipaza</b> .....             | 26            |
| 3.1.1.5. <b>Tối ưu hoá điều kiện nuôi chìm <i>Candida rugosa</i></b>                                    | 27            |
| <b>3.1.2. Tìm điều kiện nuôi thu lipase từ <i>Bacillus sp</i></b>                                       | 31            |
| <b>3.2. Tách tinh chế lipase từ <i>Candida rugosa</i></b> .....                                         | <b>32</b>     |
| 3.2.1. <i>Khảo sát nồng độ etanol thích hợp để kết tủa lipase</i>                                       | 32            |
| 3.2.2. <i>Tinh sạch lipase bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên hệ thống FPLC</i> .....            | 34            |
| <b>3.3. Khảo sát các điều kiện tối ưu để cố định lipase từ <i>Candida rugosa</i> trên Nylon-6</b> ..... | <b>35</b>     |
| 3.3.1. <i>Ảnh hưởng của nồng độ HCl xử lý hạt đến khả năng cố định enzym lipase</i> .....               | 36            |

|                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ glutaraldehyt đến khả năng cố định enzym.....              | 36        |
| 3.3.3. Ảnh hưởng của nồng độ enzym đến khả năng cố định enzym.....                      | 37        |
| 3.3.4. Ảnh hưởng của dung dịch đệm đến khả năng cố định enzym lipase.....               | 38        |
| <b>3.4. Xác định một số đặc tính của Lipase .....</b>                                   | <b>40</b> |
| <b>3.4.1. Một số đặc tính của lipase tự do và cố định từ <i>Candida rugosa</i>.....</b> | <b>40</b> |
| 3.3.1.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt độ lipase từ <i>Candida rugosa</i> .....       | 40        |
| 3.4.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới tính bền lipase tự do và cố định.....               | 41        |
| 3.4.1.3. Ảnh hưởng của pH tới hoạt độ lipase tự do và cố định                           | 43        |
| 3.4.1.4. Ảnh hưởng của pH tới tính bền lipase tự do và cố định                          | 45        |
| 3.4.1.5. Ảnh hưởng của ion kim loại tới hoạt độ lipase tự do                            | 47        |
| 3.4.1.6. Xác định điểm đẳng điện của lipase .....                                       | 49        |
| 3.4.2. Một số đặc tính của lipase <i>Bacillus-sp</i> .....                              | 50        |
| <b>3.5. KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG LIPASE từ <i>Candida rugosa</i>.....</b>             | <b>55</b> |
| 3.5.1. Khảo sát khả năng thủy phân dầu với lipase cố định                               | 55        |
| 3.5.2. Khảo sát khả năng sử dụng lipase tan trong sản xuất phomat.....                  | 56        |
| <b>KẾT LUẬN.....</b>                                                                    | <b>59</b> |
| <b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>                                                          | <b>62</b> |

## MỞ ĐẦU

Lipase là enzym xúc tác thủy phân triglyxerit thành di, mono glyxerit hoặc glyxerol và các axit béo nhờ hoạt động trên bề mặt phân pha dầu nước. Lipase (EC 3.1.1.3) là enzym linh hoạt có thể sử dụng xúc tác nhiều loại phản ứng khác nhau, có khả năng chịu kiềm, chịu nhiệt. Chính vì thế, lipase được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp như công nghiệp thực phẩm, công nghiệp hoá học, công nghiệp mỹ phẩm, công nghiệp da, trong y dược và các ngành công nghiệp khác[2].

Lipase được phân bố ở cả động vật, thực vật và vi sinh vật, song trong công nghiệp nguồn thu lipase lớn nhất là từ vi sinh vật. Trong đó cả nấm mốc, nấm men, vi khuẩn và xạ khuẩn đều có khả năng tổng hợp lipase.

Vào những năm cuối thế kỷ XX, tổng sản lượng các loại enzym toàn thế giới vào khoảng 1300 tấn/năm[3]. Thị trường thế giới về enzym công nghiệp trong năm 1994 ước tính khoảng 1 tỷ đôla Mỹ, trong đó lipase chiếm 7% (70 triệu) [sheldon, 1996]. Trong công nghiệp dầu và chất béo, việc sử dụng lipase đã rất phổ biến. Có khoảng hơn 100 loại lipase khác nhau được dùng để chuyển đổi lipid thành các chất khác[13].

Hiện nay, Việt Nam đã sử dụng rất phổ biến lipase trong ngành công nghiệp thực phẩm, công nghiệp tẩy rửa, hoá học, y học... và cần một lượng lớn lipase, song các chế phẩm lipase đang sử dụng phần lớn là nhập khẩu. Do vậy, đề tài tập trung nghiên cứu thu nhận và sử dụng hiệu quả lipase từ hai đối tượng là nấm men *Candida rugosa* và *Bacillus sp*

# TỔNG QUAN

## 1.1. CÁC NGUỒN THU LIPASE (EC.3.1.1.3)

Lipase được phân bố rộng trong các loài vi sinh vật, động vật và cả ở thực vật.

Ở người và động vật có xương sống, nhiều lipase kiểm soát sự thủy phân, sự hấp thụ, sự tạo thành chất béo và chuyển hoá lipoprotein. Lipase động vật chia làm 3 nhóm dựa trên vị trí và hoạt động của chúng: lipase thực phẩm, lipase mô và lipase sữa.

Ở thực vật, lipase được tìm thấy ở mô dự trữ của hạt dầu, hạt ngũ cốc trong quá trình nảy mầm của hạt. Hầu hết các lipase không hoạt động trong thời kỳ ngủ đông, ngoại trừ lipase tìm thấy ở hạt đậu caston[16].

Lượng lớn lipase trong công nghiệp được sản xuất từ các loại vi sinh vật: vi khuẩn, nấm mốc, nấm men[10].

Vi khuẩn: Lipase ngoại bào của *Streptomyces rimous* R6554 W được tách từ dịch lọc canh trường bằng sắc ký cột. *Streptomyces* là vi khuẩn đất Gram (+) thể hiện khả năng đặc biệt đối với sự tổng hợp các chất trao đổi thứ cấp và sử dụng lipase thủy phân ngoại bào để phá hủy nguyên liệu hữu cơ trong môi trường sống tự nhiên. Tuy nhiên cho đến nay, chỉ có một vài lipase *Streptomyces* đã được xác định hoạt tính[10]. Ngoài ra, người ta cũng đã tìm thấy lipase có trong một số loài vi khuẩn khác như *Pseudomonas cepacia* có hoạt tính ngay ở nhiệt độ cao, trong môi trường kiềm và kỵ nước[5].

Nấm mốc: Lipase được tìm thấy ở một số loài như: *Aspergillus*, *Rhizopus* (tách từ quả dưa), *Rhizopus oryzae* (phân lập từ dầu dừa), *Pythiumnltimum* (trong dung dịch hữu cơ, không có nhũ tương), và *Mucor sp humicola lamuginosa*[6].

Nấm men: Nấm men *Candida rugosa* là một nguồn sản xuất lipase quan trọng. Các đặc tính xúc tác cấu trúc hoá sinh của lipase trong loài nấm men *Candida rugosa* đã được công bố trên nhiều tài liệu[7]. Có ít nhất 7

giống lipase từ *Candida rugosa* trong đó có 4 giống đã được xác định đặc tính và 3 giống đã được dùng để sản xuất enzym thương phẩm.

## **1.2. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP LIPASE**

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp enzym. Nhưng những đặc điểm về tính chất, sinh lý, sinh hoá của vi sinh vật có ý nghĩa quyết định hơn cả. Vì vậy việc tuyển chọn chủng có hoạt lực tương đối ở trong tự nhiên sau đó tăng cường khả năng sinh tổng hợp cao của chúng bằng phương pháp gây đột biến làm thay đổi nguồn gen trung tâm nhờ các yếu tố hoá học, vật lý, có một ý nghĩa vô cùng quan trọng.

Không phải tất cả mọi vi sinh vật đều có khả năng sinh tổng hợp enzym như nhau, ngay cả những chủng cùng chi, cùng loài cũng có thể rất khác nhau về lượng enzym do chúng sản sinh ra. Vì thế việc tuyển chọn các vi sinh vật có khả năng tạo nhiều enzym cần phải luôn kết hợp chặt chẽ với việc kiểm tra hoạt lực của hàng chục, hàng trăm chủng vi sinh vật để tìm ra những chủng có khả năng sinh tổng hợp enzym cao nhất.

Ngoài việc tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp các hệ enzym có hoạt độ cao cần phải tiến hành nuôi cấy chúng trong các điều kiện tối ưu nhằm đảm bảo khả năng sinh tổng hợp và duy trì hoạt lực enzym của chúng.

### **1.2.1. Ảnh hưởng của thành phần môi trường dinh dưỡng**

Thành phần môi trường là nhân tố có tác động quan trọng đến hoạt động cũng như quá trình tổng hợp enzym của vi sinh vật, muốn sinh trưởng, phát triển được cần phải có các hoạt chất chứa C, N, H và O đầy đủ. Ngoài ra vi sinh vật cần được cung cấp các chất khoáng Mg, Ca, S, P, Fe, K và một số chất cảm ứng đặc trưng của từng enzym.

#### **• Ảnh hưởng của nguồn cacbon**

Các nguồn cacbon khác nhau sẽ ảnh hưởng khác nhau lên sự phát triển và sản sinh enzym của mỗi sinh vật. E. Dalmau và cộng sự (2000) đã nghiên cứu sự ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh tổng hợp lipase của chủng *Candida rugosa* bằng phương pháp nuôi bán liên tục cho thấy các hydratcacbon và các axit không liên quan đến chất béo thì không làm tăng sự sản xuất lipase. Hiệu suất thu được enzym cao nhất với các nguồn

cacbon là lipid hoặc axit béo. Sự kết hợp 2 loại cơ chất hydratcacbon và axit béo không cải thiện sự sinh tổng hợp lipase. Glucose kìm hãm sự sinh tổng hợp lipase, ngược lại, tween 80 kích thích sự tổng hợp lipase.

- **Ảnh hưởng của nguồn nitơ**

Nitơ là yếu tố ảnh hưởng lớn đến sự sinh tổng hợp của nhiều enzym, vì nitơ là nguồn cung cấp vật liệu (nguyên tố nitơ) cho quá trình sinh tổng hợp protein enzym trong quá trình phát triển. Silbel F. và cộng sự (2002) nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn cacbon và nitơ đến sự sinh tổng hợp lipase của chủng *Candida rugosa* cho thấy trong những nguồn cacbon và nitơ nghiên cứu thì hoạt độ lipase của canh trường nuôi đạt được cao nhất (5,58 U/ml) khi môi trường nuôi chứa nguồn nitơ là cao nấm men và proteose-pepton với nguồn cacbon là dầu oliu. Và hoạt độ đạt thấp nhất khi môi trường nuôi cấy chứa nguồn nitơ là trypton và nguồn cacbon là lactose. Tuy nhiên ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sự tổng hợp lipase của các chủng khác nhau là khác nhau, do vậy trong nghiên cứu của Melisa E. L. Gutara và cộng sự cho thấy khi lên men bề mặt chủng *Penicillium simplicissimum* thì ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh tổng hợp lipase là không đáng kể.

- **Ảnh hưởng của nguồn khoáng**

Các nguyên tố đa lượng và vi lượng có ảnh hưởng lớn tới sự sinh trưởng và sinh tổng hợp lipase của vi sinh vật. Theo công bố của Rohit Sharma và cộng sự (2001) cho thấy Mg có ảnh hưởng đến độ bền nhiệt của enzym, nếu thiếu Mg trong môi trường nuôi thì sự sinh tổng hợp lipase bị giảm xuống. Phospho ảnh hưởng trực tiếp tới sinh sản của nấm mốc và các vi sinh vật. Vì vậy muốn tăng cường sự tổng hợp lipase cần cung cấp đầy đủ lượng phospho đầy đủ lượng cần thiết của nguyên tố này. Lưu huỳnh kích thích sự tạo thành lipase ở nấm men, nguồn lưu huỳnh dùng là  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Khi chọn môi trường dinh dưỡng để nuôi vi sinh vật cần chú ý đến thành phần, chất lượng và sự tương quan về khối lượng giữa các cấu tử. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy có khả năng tăng cường sinh tổng hợp enzym lên hàng chục lần và hơn nữa bằng cách thay đổi thành phần môi trường một cách chuẩn xác, Tỷ lệ tối ưu giữa các cấu tử chính, tuyển chọn

và cho thêm các chất cảm ứng có hiệu lực, bổ sung lượng cần thiết các chất khoáng cũng như các yếu tố kích thích sinh trưởng.

### **1.2.2. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi**

Điều kiện nuôi có ảnh hưởng lớn đến quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật, điều kiện nuôi ở đây bao gồm các yếu tố độ ẩm, pH, độ thông khí, tốc độ lắc, nhiệt độ môi trường

- **pH môi trường**

pH ban đầu của môi cũng ảnh hưởng không nhỏ tới sự phát triển và khả năng tạo enzym. Jau-Yann Wu (2000) nghiên cứu sự sinh tổng hợp lipase cho thấy hoạt độ lipase được tổng hợp cao nhất ở pH 8,5.

- **Độ thông khí**

Trong quá trình sinh trưởng vi sinh vật tiêu thụ 25-35% chất dinh dưỡng của môi trường và thải ra một lượng lớn nhiệt và CO<sub>2</sub>. Vì vậy phải hạ nhiệt bằng thông gió với không khí vô trùng có độ ẩm tương đối gần 100%, chế độ thông khí vô trùng có thể liên tục hoặc gián đoạn hoặc thông khí tự nhiên. Trong môi trường nuôi cấy chìm phải đảm bảo sao cho độ oxy hoà tan không thấp hơn 20% độ bão hoà (F. Valero, 1998).

- **Mật độ tế bào**

Số lượng tế bào vi sinh vật cũng có ảnh hưởng tới sinh tổng hợp lipase của nấm men *Candida rugosa*. Trong cùng một môi trường nuôi, nếu số lượng tế bào quá ít sẽ làm kéo dài pha ổn định và pha logarit và ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp lipase, ngược lại khi số lượng tế bào ban đầu quá nhiều pha logarit chưa hoàn thành thì môi trường đã cạn kiệt nguồn dinh dưỡng vì vậy lipase cũng được tổng hợp ít hơn. Do vậy ta cần phải nghiên cứu tìm mật độ tế bào ban đầu thích hợp để cho khả năng sinh tổng hợp lipase cao.

## **1.3. CẤU TẠO CỦA LIPASE**

### **1.3.1. Khối lượng phân tử**

Cũng như các enzym khác, lipase có thể thu từ mô, cơ quan động, thực vật và vi sinh vật. Các lipase đều có những tính chất chung, song chúng cũng khác nhau về một số tính chất như: tính đặc hiệu cơ chất, mức

độ phân giải cơ chất, khối lượng phân tử, thành phần axit amin và điều kiện hoạt động. Sự khác nhau này không những giữa các loài mà ngay cả giữa các chủng trong cùng một loài[7].

Khối lượng phân tử của lipase dao động khá nhiều giữa các chủng vi sinh vật: *Candida rugosa* có 2 đồng phân là LipA (58kDa) và LipB (62kDa); *Geotrichum candidum* khoảng 60.000 Da[34], *Aspergillus niger* 97.000 Da, *Penicillium crustosum* 29.300 Da, *C.Paralipolytica* 55.900 Da. Awai và cộng sự cũng đã tách được từ *P.cyclopum* hai lipase có khối lượng phân tử 27 kDa và 30 kDa. Lipase được sản xuất bởi *P.camemberti* là một gluco-protein có khối lượng phân tử là 38 kDa.

### 1.3.2. Trình tự axit amin

Thành phần axit amin của lipase từ các nguồn khác nhau cũng khác nhau, nhưng nhiều trình tự axit amin được suy ra từ trình tự của lipase tách dòng, từ đó cho thấy có những điểm tương đồng giữa những cấu trúc không gian của lipase. Chẳng hạn như trình tự của 20 axit amin đầu của lipase từ động vật có vú giống với vùng N- của lipase từ *P.camemberti* và giống một phần với lipase từ *Humicola lanuginosa* và *Aspergillus oryzae* nhưng khác nhau so với lipase từ *P.Cyclopium* lipase 1. So sánh tiếp đầu N tiếp theo của lipase 1 từ *P. expansum* và *P.solium* cho thấy ngoài 16 của 20 axit amin đầu là khác nhau còn lại là như nhau. Những axit amin cuối có 15 trong số 20 axit amin lắng cặn là do lipase *P.expansum* và *P.solium*[11].

Đối với lipase từ *Candida rugosa* thì sự sắp xếp trình tự N của những protein thể hiện sự tương đồng với lipase 2 và 3 nhưng không tương đồng với lipase 1[13]. Sự quyết định trình tự N- trên 19 axit amin chỉ là sự tương đồng cao với những lipase tương tự .

Nói chung có rất ít những trình tự giống nhau hoàn toàn, ngoại trừ những trình tự quanh vùng trung tâm hoạt động. Khi so sánh trình tự axit amin vùng quanh trung tâm hoạt động của nhóm gồm 3 enzym là protease, lipase, cutinase với enzym esterase, người ta thấy sự tồn tại của trình tự bảo thủ GxGxG ở vị trí serin. Ngoại lệ duy nhất đã biết với trình tự bảo thủ

trên là sự thay thế của alanin cho glyxin thứ 2 trong subtilisin. Không một trình tự bảo thủ nào được tìm thấy quanh vùng gốc histidin hoặc  $\alpha$ -aspartic (glutamic) của trung tâm hoạt động trừ trường hợp của các enzym tương đồng từ các loài họ hàng rất gần.

|            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|-----|
| MELALALSLI | ASVAAAPTAT | LANGDTITGL | NAIINEAFLG | 40  |
| IPFAEPPVGN | LRFKDPVPYS | GSLDGQKFTS | YGPSCMQQNP | 80  |
| EGTYEENLPK | AALDLVMQSK | VFEAVSPSSE | DCLTINVVRP | 120 |
| PGTKAGANLP | VMLWIFGGGF | EVGGTSTFPP | AQMITKSIAM | 160 |
| GKPIIHVSVN | YRVSSWGFLA | GDEIKAEGSA | NAGLKDQRLG | 200 |
| MQWVADNIAA | FGGDPTKVTI | FGESAGSMSV | MCHILWNDGD | 240 |
| NTYKGKPLFR | AGIMQSGAMV | PSDAVDGIYG | NEIFDLLASN | 280 |
| AGCGSASDKL | ACLRGVSSDT | LEDATNNTPG | FLAYSSLRLS | 320 |
| YLPRPDGVNI | TDDMYALVRE | GKYANIPVII | GDQNDGTF   | 360 |
| GTSSLNVTTD | AQAREYFKQS | FVHASDAEID | TLMTAYPGDI | 400 |
| TQGSFPDGTI | LNALTPQFKR | ISAVLGDLGF | TLARRYFLNH | 440 |
| YTGGTKYSFL | SKQLSGLPVL | GTFHSNDIVF | QDYLLGSGSL | 480 |
| IYNNAFIAFA | TDLDPNTAGL | LVKWPEYTSS | SQSGNNLMMI | 520 |
| NALGLYTGKD | NFRTAGYDAL | FSNPPSFFV  |            | 549 |

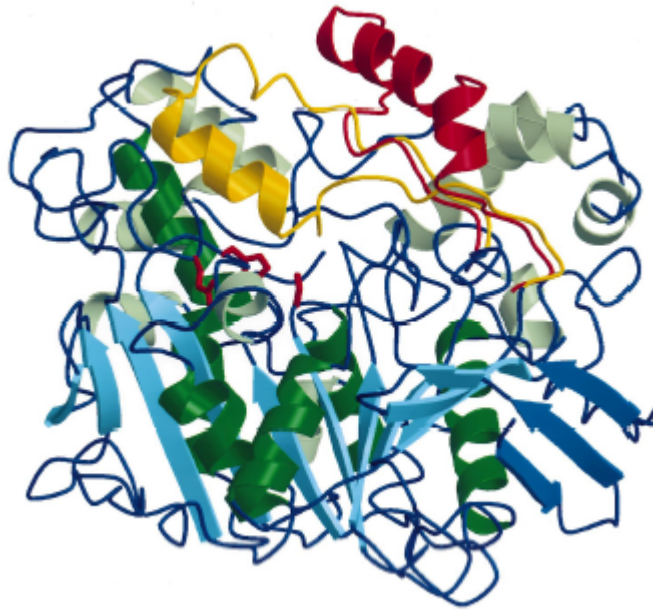
**Hình 1.** Trình tự axit amin của lipase từ *Candida rugosa*

### 1.3.3. Cấu trúc không gian

Đã có rất nhiều thí nghiệm được triển khai nhằm tìm hiểu cấu trúc của lipase, trong đó cấu trúc ba chiều của lipase được coi là cơ sở để hiểu được phản ứng động học, đặc hiệu cơ chất, tiên đoán những đặc điểm sinh hoá và hoạt động của lipase tại bề mặt phân pha dầu nước. Lipase từ *Rhizomun miehei* là enzym thuỷ phân dầu tiên có cấu trúc bậc 3 được xác định bởi tinh thể học tia X[16].

Dùng phương pháp tia X đã phát hiện cấu trúc  $\alpha/\beta$ . Liên kết  $\beta$  song song làm cầu nối với cấu trúc xoắn ốc  $\alpha$  để hình thành cấu trúc phức tạp. Các cầu disulfua được tìm thấy trong phân tử lipase có lẽ nhằm làm ổn định cấu trúc gấp nếp của enzym. Trong cấu trúc này protein hình cầu chứa một nhân kỵ nước tạo nên một chuỗi không cực ở cạnh có ý nghĩa quan trọng cho sự ổn định phân tử. Bên cạnh đó còn có vài nhóm có cực và những phân tử được liên kết. Sự có mặt của những phân tử nước đã làm

tăng lực liên kết của Vander Wall và lực phân tán trong nhân, vì vậy sự ổn định về cấu trúc không gian của phân tử enzym được tăng lên[16].



**Hình 2.** Cấu trúc không gian của lipase từ *Candida rugosa* [21]

Nhóm quan trọng nhất tạo thành trung tâm hoạt động của lipase là bộ ba Asp...His...Ser. Lipase tham gia vào vị trí xúc tác với proteinase và esterase. Đối lập với proteinase, trung tâm xúc tác của nó không phân bố ở bề mặt ngoài mà nằm dưới chuỗi xoắn bề mặt. Vị trí hoạt động của mọi lipase đều có Ser, His và Asp (hoặc Glu) và hoàn toàn bị che khuất bởi một đoạn nắp cấu tạo bởi một hoặc hai chuỗi xoắn. Bề mặt mang Trypsin hoàn toàn không cực và tác động qua lại với đầu kỵ nước bao quanh trung tâm hoạt động. Trong hầu hết cấu trúc lipase, đầu serin hoạt động trong chuỗi pentapeptit có trình tự Gly-X<sub>1</sub>-Ser-X<sub>2</sub>-Gly cấu trúc đó cũng được tìm thấy ở protease serin (Boel và cộng sự, 1998).

## **1.4. MỘT VÀI ĐẶC TÍNH CỦA LIPASE**

### **1.4.1. Chất hoạt hoá và chất kìm hãm**

Phản ứng do enzym xúc tác phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó chất hoạt hoá và chất kìm hãm cũng ảnh hưởng tới vận tốc phản ứng và hoạt độ enzym trong phản ứng. Hoạt độ enzym có thể bị thay đổi dưới tác dụng của một số chất có bản chất hoá học khác nhau.

### **\* *Chất hoạt hoá enzym***

Chất này làm tăng hoạt độ xúc tác của enzym. Các chất này có bản chất hoá học khác nhau, có thể là các anion, các ion kim loại hoặc các chất hữu cơ có cấu tạo phức tạp hơn.

Các chất hoạt động cation như các muối amon được đưa vào để làm tăng khả năng thuỷ phân dầu oliu của lipase từ *Mucor* [Shamkant Patkar và Fredrick Bjorkling, 1992].

Didier Rotticci và cộng sự đã chứng minh rằng lipase từ *Candida antarctica* có thể được hoạt hoá bởi các chất hoạt động bề mặt. Trong môi trường cơ chất là axetat p-nitrophenyl có chứa chất hoạt động ion SDS (Sodium dodecyl sulfate) thì tốc độ phản ứng tăng lên. Chứng tỏ SDS có tác dụng trong việc tăng cường tốc độ phản ứng của lipase[9].

Tuy nhiên tác dụng kích hoạt chỉ giới hạn ở những nồng độ xác định, vượt quá giới hạn này có thể làm giảm hoạt độ của enzym.

### **\* *Chất kìm hãm enzym***

Các chất làm giảm hoạt độ của enzym gọi là chất kìm hãm (ức chế-Inhibitor), kí hiệu là I. Các chất này có thể là những ion, các phân tử vô cơ, hữu cơ, kể cả các protein. Các hợp chất kìm hãm hoạt tính lipase có thể bằng cách thay đổi cấu trúc lipase hoặc tác động vào tính chất bề mặt.

Cơ chế hoạt động kìm hãm lipase bởi protein và polypeptit vẫn chưa được nghiên cứu rõ ràng. Để giải thích hoạt động của sự kìm hãm này có hai giả thuyết được đưa ra: (1) chất kìm hãm protein được hấp phụ lên bề mặt và gây ra sự thay đổi các tính chất của bề mặt đó; (2) Sự tác động qua lại trực tiếp của protein với lipase và cạnh tranh với cơ chất. Người ta làm nghiên cứu về kìm hãm lipase từ tụy tạng ngựa và lipase từ *Rhizopus arrhizus*, *R.delemar* với một loạt các protein phổ biến gồm : myoglobin, serum albumin, ovalbumin, melitin. Tất cả các protein này kìm hãm lipase từ tụy tạng ngựa khi không có mặt colipase và muối mật. Một điều thú vị là lipase từ *R.delmar* bị kìm hãm bởi các protein này trong khi đó lipase từ *R. Arrhizus* không hề bị ảnh hưởng bởi các protein đó[24].

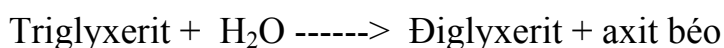
#### **1.4.2. Tính đặc hiệu cơ chất**

### ***\* Đặc điểm của nguồn cơ chất***

Lipase (EC.3.1.1.3) là enzym xúc tác trong quá trình thủy phân các triglyceride không trộn nước ở mặt phân cách nước và lipid. Các este của axit cacboxylic mạch ngắn dễ tan trong nước và được thủy phân từ từ với thể tích nước lớn và có thể thủy phân hoàn toàn. Các chất tạo thành của quá trình thủy phân là 1,2- hoặc 2,3- diglycerit; 2-monoglycerit; 1- hoặc 3-monoglycerit và glyxerol. Dựa vào các điều kiện của phản ứng thủy phân đạt được đến cân bằng và các thành phần trung gian ở chuỗi thủy phân được tách ra nhờ sự kết tinh, chưng cất hoặc sắc ký[16].

Lipase là chất xúc tác thủy phân chuỗi triglycerit dài hoặc các este methyl alcohol của một chuỗi dài các axit béo

lipase



### ***\* Thủy phân các liên kết este giữa glyxerol và các axit béo***

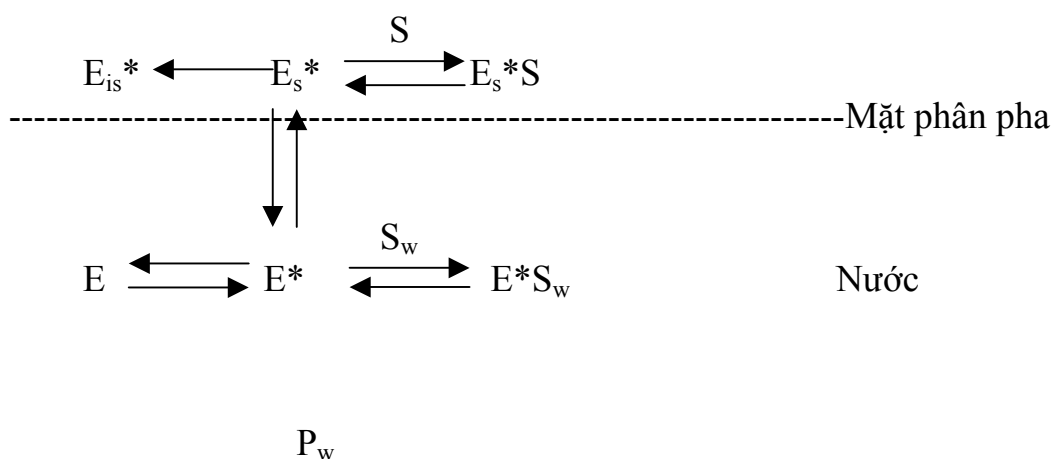
Lipase là một chất xúc tác sinh học được sử dụng vào nhiều mục đích khác nhau. Trên thế giới đã áp dụng thành công lipase từ các nguồn khác nhau xúc tác cho sự thủy phân, sự tổng hợp chất béo và sự trao đổi nhóm của những chất este[13]. Tính chất đặc thù khá phổ biến với tất cả các lipase là phản ứng của chúng trong môi trường không đồng nhất, trong đó lipase hầu như chỉ thể hiện chức năng riêng ở mặt phân pha dầu nước[16]. Lipase được sử dụng rất nhiều trong tổng hợp hoá hữu cơ với vai trò là một nhóm enzym có khả năng phân giải hydro từ triacylglycerol, trên bề mặt phân pha dầu nước[7].

Gần đây người ta đã phát hiện được lipase từ cây cải dầu có tính chất xúc tác sự thủy phân triolein nhanh hơn khoảng 70 lần so với sự thủy phân của tri-linolein dưới những điều kiện không có nước, lipase này xúc tác sự este hoá axit oleic bằng butanol[14].

Lipase xúc tác phản ứng thủy phân dầu không tan thành các sản phẩm hoà tan; phản ứng này cũng có thể xảy ra theo chiều ngược lại trong đó lipase xúc tác để tạo thành acyl glyxerol từ glyxerol và axit béo.

### 1.4.3. Cơ chế động học xúc tác của lipase

Theo các nghiên cứu lipase có nhóm serin, histidin và axit aspatic ở trung tâm hoạt động của nó. Với các cơ chất không tan trong nước, hoạt tính của lipase đạt được cực đại chỉ khi nó được phân tán vào giữa bề mặt phân pha dầu nước. Quá trình đó được gọi là quá trình hoạt hoá phân pha[24] (hình 3)



**Hình 3.** Mô hình hoạt động của lipase trên cơ chất hoà tan và không tan trong nước. Sự thay đổi hình thể của lipase trong quá trình hoạt động xúc tác. Mô hình này do Verger đề xuất (1980).

Trong đó:

E: Lipase hoà tan không hoạt động

E\*: Lipase hoà tan dạng hoạt động

E<sub>s</sub>\*: Lipase hoạt động có hấp phụ

E<sub>is</sub>\*: Lipase không hoạt động được hấp phụ

S<sub>w</sub>: Cơ chất tan trong nước

S: Cơ chất không tan trong nước

E\*S<sub>w</sub> và E<sub>s</sub>\*S: Phức hợp lipase- cơ chất

Khi không có mặt nước hoặc khi có nước với lượng nhỏ, phản ứng este hoá và phản ứng este được ưu tiên. Trong trường hợp này, những đặc

tính như tốc độ xúc tác và tính đặc hiệu phụ thuộc nhiều vào điều kiện phản ứng và bản chất cơ chất [Paul Woolley & Steffen B. Petersen, 1992].

#### **1.4.4. Nhiệt độ và pH hoạt động của lipase**

Nhiệt độ và pH là hai yếu tố ảnh hưởng rất nhiều đến hoạt động cũng như tính bền của lipase. Lipase thu từ các nguồn khác nhau chịu ảnh hưởng bởi nhiệt độ và pH khác nhau.

Theo Marija Ablamic và Iwanalescie, lipase tổng hợp từ chủng *Streptomyces riromus* R6554W hoạt động mạnh nhất ở dải nhiệt độ 50-60°C, pH tối ưu là 9,5. Ở điều kiện pH và nhiệt độ không thích hợp, lipase đều bị kìm hãm hoạt động và giảm tính bền. Ở pH 9,5; nhiệt độ 23°C sau 24 giờ hoạt độ giảm 5%, ở pH 10-11 hoạt độ giảm 55%. Ở nhiệt độ 30°C hoạt độ giảm còn 25%, ở 90°C hoạt độ còn 30% so với hoạt độ lipase tại 55°C[17].

Lipase từ chủng *S.riromus* bền ở cùng nhiệt độ 20-50°C và mất hoạt tính nhanh ở vùng nhiệt độ cao hơn 70°C[17].

Lipase từ chủng *Penicillium cyclopium* có pH tối ưu trong khoảng 4,5-7,0[10]. Lipase từ nấm *Pythium ultium* có pH hoạt động ở điều kiện tối ưu là 7,5-8,5. Còn đối với lipase từ chủng *Rhizopus oryae* có pH tối ưu là 7,5[6].

Đa số lipase hoạt động ở nhiệt độ 50-60°C, tuy nhiên có một vài chủng hoạt động ở nhiệt độ thấp hơn. Chủng *Penicillium cyclopium*, *Pythium ultium* và *Rhizopus oryae* chịu nhiệt kém, sẽ bị ức chế khi nhiệt độ lên tới 50°C[6].

Lipase từ *Candida rugosa* ổn định ở trong môi trường kiềm pH từ 7-10 và có hoạt độ mạnh nhất ở pH 8,5 [Sharon và cộng sự, 1998].

#### **1.5. TÁCH TINH CHẾ LIPASE**

Tuỳ vào mục đích sử dụng mà người ta tinh sạch enzym ở các mức độ khác nhau. Để có được enzym thuần khiết hơn, người ta tiến hành tinh chế enzym từ chế phẩm enzym thô. Có nhiều phương pháp để tinh chế: Phương pháp kết tủa dựa trên tính hoà tan, các phương pháp sắc ký trao đổi ion dựa trên độ tích điện của enzym; phương pháp lọc gel dựa vào khối

lượng phân tử, kích thước enzym; các phương pháp sắc ký ái lực dựa vào vị trí liên kết đặc hiệu của enzym. Hiện nay, việc tách tinh chế enzym được tiến hành dựa trên sự kết hợp của nhiều phương pháp. Các phương pháp sắc ký thường được sử dụng hơn cả vì nó cho phép thu nhiều chế phẩm enzym có độ thuần khiết cao. Vấn đề tách enzym thuần khiết vẫn còn gặp phải một số khó khăn do lượng enzym có trong tế bào ít nhiều có lẫn tạp chất và luôn có đồng thời với các protein khác cũng có các tính chất lý hoá giống nhau, enzym lại không bền và dễ bị mất khả năng xúc tác do tác động của các yếu tố bên ngoài[4].

Đối với các enzym nội bào do các phân tử enzym không có khả năng đi qua màng tế bào do đó cần phải phá vỡ cấu trúc của tế bào bằng các biện pháp cơ học (nghiền với bột thuỷ tinh hoặc đồng hoá bằng thiết bị đồng hoá) hoặc phá vỡ tế bào bằng tác dụng của các dung môi hữu cơ trong sóng siêu âm... Sau khi phá vỡ tế bào enzym được chiết rồi loại tạp chất rồi mới được tách tinh chế bằng các phương pháp khác nhau.

Lipase đã được nhiều nhà khoa học trên thế giới nghiên cứu nhằm làm tinh sạch hơn và thường được thực hiện qua nhiều cột. M. Kambourova và cộng sự tiến hành tinh sạch lipase từ *Bacillus stearothermophilus* MC7 qua lọc gel đạt độ tinh sạch là 1,56 và hiệu suất thu hồi là 75%; qua cột Sephadex G-20 đạt độ tinh sạch là 16,47, hiệu suất thu hồi là 60%; qua cột DEAE- xenlulo thì độ tinh sạch là 19,25 và hiệu suất thu hồi là 10,2%. Qua kiểm tra độ tinh sạch bằng chạy điện di protein biến tính trên SDS-PAGE xác định được khối lượng phân tử là 66kDa (2003)[20].

Lipase từ *Pseudomonas mendocina* PK-12CS được tinh sạch qua cột sắc ký trao đổi anion DE-52 đạt được độ tinh sạch là 240,99 và hiệu suất thu hồi là 14,78%. Qua kiểm tra độ tinh sạch bằng chạy điện di protein biến tính trên SDS-PAGE xác định được khối lượng phân tử là 80kDa (2003)[33].

R. K. Saxena và cộng sự đã tách và tinh sạch lipase từ *Aspergillus carneus* qua cột tương tác kỵ nước Octyl Sepharose đạt được mức độ tinh sạch là 24,1 và hiệu suất thu hồi là 38,4% (2003)[25].

Đối với lipase từ *Candida rugosa*, M. A. Pernas và cộng sự đã tiến hành tinh sạch qua cột DEAE- Sephacel đạt độ tinh sạch là 2,3 và hiệu suất thu hồi là 4,9%. Qua kiểm tra độ tinh sạch bằng chạy điện di protein biến tính trên SDS-PAGE xác định được khối lượng phân tử là 60 kDa (2000)[15].

## **1.6. CÁC PHƯƠNG PHÁP CỐ ĐỊNH LIPASE**

Enzym cố định là những enzym được gắn lên trên những chất mang không hoà tan hoặc các enzym được liên kết lại với nhau tạo đại phân tử enzym không tan. Việc sử dụng enzym cố định có ý nghĩa to lớn như có thể sử dụng nhiều lần mỗi lượng enzym đem lại hiệu quả kinh tế cao. Dùng enzym cố định lẫn vào trong sản phẩm sau đó người ta có thể tách ra khỏi sản phẩm dễ dàng nên không làm ảnh hưởng đến màu sắc, mùi vị và chất lượng thực phẩm. Sử dụng enzym cố định có thể làm ngừng phản ứng nhanh chóng bằng cách lấy chế phẩm ra khỏi phản ứng khi cần thiết. Chính vì vậy mà enzym cố định được sử dụng rộng rãi và người ta cũng đã tìm ra được rất nhiều phương pháp để cố định enzym.

### **1.5.1. Phương pháp gắn enzym bằng liên kết đồng hoá trị**

Cố định enzym bằng liên kết đồng hoá trị với các polyme đã được hoạt hoá là một trong những phương pháp cố định enzym phổ biến nhất, đảm bảo liên kết vững chắc của enzym với chất mang. Bản chất của phương pháp này là enzym được gắn với chất mang thông qua “cầu” nối. Cầu nối này có kích thước không lớn và có hai đầu, một đầu nối với chất mang polyme, đầu còn lại nối với enzym. Ví dụ glutaraldehyt cũng hay được sử dụng làm cầu nối để gắn enzym vì nó chứa hai nhóm aldehyt ở hai đầu của phân tử. Hai nhóm này ở giá trị pH trung tính sẽ phản ứng với các nhóm  $\text{NH}_2$  tự do. Như vậy, một đầu của glutaraldehyt được gắn vào chất mang còn đầu kia sẽ được gắn vào enzym[4].

Chất mang thường được sử dụng là các polyme khác nhau như: cellulosa, agaroza, alginic axit, chitin, collagen, keratin và các dẫn xuất của chúng; hoặc sử dụng các polyme tổng hợp như polyme của acrylic axit, polyurethan, các dẫn xuất N-vinylpyrrolidon và các loại polyme khác[4].

Dựa trên cơ sở lý thuyết đó, Carneiro-da-Cunha và cộng sự đã cố định lipase từ *Candida rugosa* lên màng xenluloza và dẫn xuất của cellulosa, sử dụng tác nhân hoạt hoá là cacbodiimit ( $\text{HN}=\text{C}=\text{NH}$ ) thu được kết quả cố định trên màng cellulosa axetat độ hoạt động là  $0(\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2})$ ; trên Textile cotton tissue là  $1002(\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2})$  (1999)[18].

Sử dụng phương pháp này, theo P. Padmini có thể cố định lipase trên hạt polyamid (Nylon-6). Nylon-6 có lỗ hổng nhỏ được sử dụng làm chất mang cho việc cố định lipase. Trong quá trình cố định sử dụng glutaraldehyt 10% , nồng độ HCl 3,5N để xử lý hạt và nồng độ enzym là 1mg/ml trong đệm photphat 7,7[23].

### **1.6.2. Phương pháp gói enzym trong khuôn gel**

Nguyên tắc của phương pháp này là gói enzym vào trong khuôn gel bằng cách trùng hợp hoá gel khi có mặt đồng thời gel và enzym. Sau khi kết thúc quá trình trùng hợp của gel thì enzym được gói trong các khuôn gel đó.

Gel thường sử dụng là gel polyacrylamit hoặc agaroza, Na-alginat. Có nhiều phương pháp để gói enzym vào khuôn gel: gói dưới dạng hạt (viên); gói enzym trong các lỗ nhỏ của gel dạng sợi; gói enzym trong bao vi thể (Microcapsul); phương pháp tiền polyme.

Để cố định lipase từ *Candida rugosa* theo phương pháp này, người ta gắn enzym vào trong khuôn gel dưới dạng hạt. Monome được dùng ở đây là Na alginat. Alginat từ lâu đã được dùng tạo màng gel cố định tế bào và enzym xúc tác các phản ứng trong các dung môi hoà tan. Mạng gel Ca alginat có tác dụng làm cho enzym ổn định hơn, bền nhiệt hơn khi nó bọc trong các khuôn gel. Lipase sau khi được cố định trong các hạt alginat có thể được xúc tác phản ứng liên tục hoặc có thể tái sử dụng nhiều lần cho hiệu quả kinh tế cao[28]. O'Connell và J. Varley dựa trên phương pháp

này đã cố định lipase từ *Candida rugosa* lên màng khí CGAs (Colloidal Gas Aphrons) thu được hiệu suất cố định là 80% (2001)[22].

### **1.6.3. Phương pháp hấp phụ vật lý trên các chất mang có chứa hoặc không chứa điện tích**

Phương pháp cố định enzyme được sử dụng phổ biến nhất là phương pháp hấp phụ vật lý không thông qua liên kết hoá trị. Quá trình thực hiện hấp phụ khá đơn giản: chất hấp phụ và enzyme được trộn lẫn với nhau trong một khoảng thời gian cho phép sự hấp phụ xảy ra nhờ tương tác của các liên kết ion, kỵ nước, hydrogen và lực Van der Waals. Tuy nhiên phương pháp này có nhược điểm là quá trình giải hấp phụ enzyme dễ dàng xảy ra bởi sự thay đổi pH, nhiệt độ và thành phần ion[4].

Nếu chất mang không có lỗ xốp, enzyme được hấp phụ trên bề mặt chất mang. Nếu chất mang có lỗ xốp, enzyme sẽ được hấp phụ nhờ liên kết ion. Các chất mang vô cơ thường được sử dụng là nylon, các loại chitin của vỏ tôm, mai cua, bột san hô, than hoạt tính, than củi, gạch, đá, sỏi, cát... Chất mang hữu cơ thường sử dụng là dẫn xuất cellulosa.

Lipase có thể được cố định trên hạt Amberlite-XAD16 bằng phương pháp hấp phụ vật lý lên bề mặt hạt[35].

Theo phương pháp này, lipase từ *Candida rugosa* cũng có thể được cố định trên dung môi hữu cơ metanol cho hiệu suất cố định là 12,6%; etanol hiệu suất đạt 15,2% và axeton hiệu suất là 16,3% (Sol Montero và cộng sự)[29].

Cũng dựa trên phương pháp hấp phụ vật lý lên chất mang, Tien-Chieh Hung và cộng sự đã tiến hành cố định lipase từ *Candida rugosa* trên Chitosan sử dụng glutaraldehyt làm tác nhân hoạt hoá (2003)[31].

## **1.7. ỨNG DỤNG CỦA LIPASE**

Lipase được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất bột giặt, tổng hợp các chất hữu cơ, trong công nghiệp chế biến sữa và phô mát, công nghiệp sản xuất dược phẩm, hoá công, mỹ phẩm và các công nghiệp khác. Ngoài ra lipase được sử dụng rộng rãi trong các hoạt động biến đổi sinh

học trong quá trình thuỷ phân cũng như quá trình tổng hợp và kiểm soát được các bước trong công nghiệp giấy, bột giấy.

#### **1.7.1. Trong công nghiệp sản xuất các chất tẩy rửa**

Hiện nay thị trường lớn nhất cho các loại lipase là việc sử dụng nó như những chất cấu thành trong các loại bột giặt ở công nghệ giặt khô. Ngày nay lipase được dùng trong bột giặt để thuỷ phân các vết dầu mỡ mà con người tiết ra quần áo, chăn đệm trong điều kiện nhiệt độ thấp và pH cao với những chất hoá học có hoạt tính bề mặt [Gormen & Malmos, 1991]. Một số lipase ở dạng thương phẩm đã được sử dụng trong ngành thuốc tẩy là: Lipase humicola của Novo Nordisk, lipolase hoặc lipase P.glumace của Unilever [Estell và cộng sự, 1985] được sử dụng trong ngành công nghiệp tẩy rửa. Nhưng những lipase dùng làm bột giặt cho những hộ gia đình giữ ổn định với các protease và hoạt động có hiệu quả trong điều kiện kiềm.

#### **1.7.2. Trong công nghiệp thực phẩm**

Trong công nghiệp thực phẩm người ta sử dụng lipase để cải biến các triacylglycerol, nâng cao chất lượng các loại dầu thực vật rẻ tiền, chất lượng thấp bằng cách thay thế các axit béo no bởi các axit béo không no, trong dung môi hiếm nước.

Ví dụ: Lipozyme (Novo) được dùng để sản xuất bơ Cocoa tương đương từ dầu cọ và các axit stearic để sử dụng trong công nghiệp chế biến đồ hộp [Bjorkling, 1991].

Đối với thực phẩm được chế biến từ sữa, lipase được sử dụng rộng rãi để làm tăng mùi vị, làm tăng độ chín của phomat, hoặc chế biến những sản phẩm như phomat và phân giải lipit [Bech, 1992]. Những axit béo tự do mạch ngắn (chủ yếu là C4, C6) được thuỷ phân ra do tăng lipase vào sữa béo dẫn đến sự tăng hương vị đặc trưng cho sữa. Trong khi đó nếu các axit béo mạch trung bình (C12, C14) được tạo ra sẽ có xu hướng tạo ra mùi vị tựa như xà phòng cho sản phẩm. Thêm vào đó những axit béo tự do này có thể tham gia vào các phản ứng hoá học đơn giản với vi sinh vật dẫn đến việc tổng hợp những gia vị có mùi thơm khác nhau. Những nguồn lipase

dùng cho việc tăng hương vị ở phomat trên mô của những loài động vật nhai lại (dê non, cừu, bê). Một số chế phẩm lipase được sử dụng làm tăng mùi vị và làm chín phomat được thu từ một số chủng như: *M.miehei*, *A.niger* hay *A. oryzae*.

Lipase được sử dụng để làm tăng những chất béo nhờ việc chuyển este hoá tới một triglycerit có giá trị cao, bơ cocoa, có một hỗn hợp 1,3-2-oleoyl-glycerol chưa no (palmitic, stearic và axit oleic) có thể được chế xuất từ loại dầu rẻ tiền chiết xuất ở tổng hợp thân cây cọ (1,3-dipalmitoyl 1-2-oleoyl-glycerol) với axit tritearin hay axit stearic lần lượt là 1, 3 số lipase đặc trưng [Mastua và cộng sự, 1981], trong khi phương pháp chuyển đổi este hoá hoá học dưới những điều kiện kiềm có thể dẫn đến sự tạo thành sản phẩm mang tính ngẫu nhiên và tạo thành sản phẩm phụ không mong muốn. Bằng việc sử dụng phương pháp chuẩn bị giống khác nhau (axit palmitic hầu như không có trong hai vị trí với 1, 3- dioleoyl-2palmitoyl-glycerol) có thể được thay thế bằng những chất thay thế sữa béo được chiết xuất phần nhiều từ cây cọ, dầu palmitoyl glycerides với những axit béo không no [King & Padly, 1990]. Triglycerides cùng với axit octanoic và axit decanoic ở vị trí 1,3- và một axit béo cần thiết ở vị trí 2- có thể được sản xuất theo cách này dành cho những bệnh nhân không đủ dịch tụy hoặc kém hấp thụ.

### **1.7.3. Trong công nghiệp dược và hoá chất**

Trong những năm gần đây enzym ngày càng được sử dụng nhiều và rộng rãi trong y học, để sản xuất một số thuốc và dùng trực tiếp để chữa bệnh. Ở nhiều nước trên thế giới, đặc biệt ở Nhật Bản hàng năm người ta đã sản xuất một lượng lớn chế phẩm enzym vi sinh vật có độ tinh khiết cao trong đó có mặt của lipase.

Trong dược phẩm lipase được ứng dụng rộng rãi trong quá trình sản xuất thuốc chữa bệnh cho người và các loại hoá chất bảo vệ thực vật (thuốc trừ sâu, trừ cỏ)[19]. Gần đây hơn, trong lĩnh vực hoá học tinh khiết, người ta đã dùng lipase để tạo các chất trung gian tổng hợp qua quá trình thủy phân lập thể chọn lọc, ứng dụng trong sản xuất thuốc trừ sâu Pyrethroidic.

Ngoài ra trong phòng thí nghiệm các lipase cũng được nhà hoá học hữu cơ dùng làm công cụ tổng hợp một số chất khác như phân giải *Raxemic epoxieste* nhờ lipase của *Rhizopus arhisus* [J.A Laitte (Pháp)]. Với mong muốn có thể sản xuất một loại thuốc làm giãn động mạch vành, người ta dựa vào tính chất chọn lọc thủy phân của lipase trong môi trường dung môi hữu cơ.

Các lipase có thể xúc tác este hoá, chuyển đổi este hoá và este hoá tương tác trong các dung môi hữu cơ với lượng nước thấp [Kazlauskas và Bornscheuer, 1998; Godberg và cộng sự, 1989], ứng dụng chính của các lipase trong hoá hữu cơ là sự phân giải các hỗn hợp enantiomeric. Có một vài nhóm phân tử liên quan đến sự truyền tính trạng dấu hiệu làm gia tăng những căn bệnh di ứng, viêm là những lipid hay lipid analogues. Sự truyền tín hiệu ở giữa và trong nội bào ở sinh vật liên quan gần gũi với những loại lipid đơn lẻ như phosphatidylinositol, lipase cũng như phospholipase đều có thể được sử dụng để tổng hợp trên phạm vi lớn.

#### **1.7.4. Trong công nghiệp thuộc da**

Quá trình thuộc da yêu cầu phải bỏ lớp chất béo dưới da. Sử dụng phối hợp lipase với các enzym thủy phân khác như protease đã mở ra con đường mới cho công nghiệp thuộc da. Một quá trình enzym mới cho sản xuất từ da sống đến thuộc da bao gồm việc giặt, rũ lông và rửa sạch trong bể nước có pH khoảng 8-13 chứa một enzym ưa kiềm. Rõ ràng cần sử dụng phối hợp lipase với các protease kiềm hay trung tính và một chất hoạt động bề mặt khác. Tại Nga đã có bằng sáng chế sử dụng chế phẩm enzym để thuộc da cừu với các đặc tính ưu việt hơn như độ bền, độ co giãn tăng và giảm cứng[36].

#### **1.7.5. Trong công nghiệp mỹ phẩm**

Lipase được ứng dụng nhiều trong công nghiệp mỹ phẩm để sản xuất các chất hoạt động bề mặt và các hợp chất thơm. Những thành phần chủ yếu trong mỹ phẩm và nước hoa được điều chế bằng phản ứng ester hoá glycerol được xúc tác bởi lipase. Việc chuyển ester hoá của 3,7- dimethyl 4,7- octadien- 1- ol bởi lipase từ nhiều nguồn vi sinh vật khác nhau để điều

chế oxide hoa hồng là một hương liệu quan trọng trong sản xuất nước hoa[36].

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. NGUYÊN LIỆU

#### 2.1.1. Chủng vi sinh vật

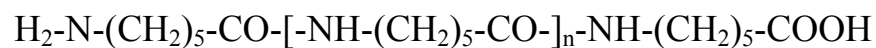
*Candida rugosa* nhận từ Viện bảo tàng giống vi sinh vật Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ Thực phẩm- Đại học Bách Khoa- Hà Nội.

Chủng *Bacillus* sp nhận từ Phòng Công nghệ Gene Sét Việt - Viện Công nghệ Sinh học

#### 2.1.2. Chất mang Nylon-6: của hãng Sigma- Mũ (d= 1.084)

Nylon-6 là chất nhựa kỹ thuật nổi tiếng là có độ cứng cao và sức đề kháng cao đối với chất hoá học và dầu mỡ. Mặc dù vậy, Nylon-6 có nhiệt độ chuyển biến nhựa thấp và nhiệt độ biến dạng thấp. Đó là điều cần thiết để trộn lẫn Nylon-6 với các polyme khác tạo thành các chất có khả năng chịu nhiệt cao(1996)[26].

Nylon-6 có lỗ hồng nhỏ được sử dụng làm chất mang cho việc cố định lipase. Nó cung cấp các nhóm amin hoạt động mạnh ở cuối phân tử polyme, có thể tạo phản ứng với nhóm liên kết glutaraldehyt [8].



Nylon-6

#### 2.1.3. Hoá chất

Dầu oliu, cao nấm men, pepton, glucoza, dịch chiết malt,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaOH}$ , Inositol, Biotin, thiamine.HCl, Axit palmitic, cồn 99%, glutaraldehyt, hạt Nylon-6, và một số hoá chất cần dùng khác.

#### 2.1.4. Thiết bị sử dụng

- |                                       |             |
|---------------------------------------|-------------|
| - Tủ cấy vi sinh vật (clear benchtop) | : Nhật      |
| - Nồi hấp tiệt trùng                  | : Nhật      |
| - Máy đo màu quang điện UV-Vis        | : Thụy Điển |
| - Máy đo pH 900 Prescisa              | : Thụy Sĩ   |

- Máy khuấy từ gia nhiệt (Magnetic stirrer) : Đức
- Máy lắc ổn nhiệt Shellab : Mỹ
- Máy lọc hút chân không : Đức
- Máy ly tâm lạnh allegra 64R : Mỹ
- Hệ thống sắc ký cột FPLC : Thụy Điển

Và một số thiết bị thông thường khác.

#### **2.1.5. Môi trường nghiên cứu:**

##### **\* *Môi trường hoạt hoá chủng *Candida rugosa* (g/l)***

- Dịch chiết malt : 3g
- Cao nấm men : 3g
- Pepton : 5g
- Glucoza : 10g

Bổ sung nước cất đến tổng thể tích là 1000ml. Khử trùng hỗn hợp ở điều kiện 1 atm, 110°C trong 30 phút.

**\* *Môi trường giữ giống *Candida rugosa*:*** thành phần giống môi trường hoạt hoá

##### **\* *Môi trường sinh tổng hợp lipase từ *Candida rugosa* (g/l)***

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 15g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  : 5,5g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  : 4g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 1g
- $\text{FeCl}_3$  : 10mg
- Inositol : 0,004mg
- Biotin : 0,008mg
- Thiamine.HCl : 0,2mg
- Axit palmitic : 1,2g
- Cơ chất dầu oliu 1%

Bổ sung nước cất đến tổng thể tích là 1000ml. Khử trùng hỗn hợp ở điều kiện 1 atm, 110°C trong 45 phút.

Môi trường nuôi cấy *Bacillus* (BMGY): (1% (w/v) cao nấm men, 2% (w/v) bacto-peptone, 100 mM kali phosphate, pH 7.0,  $4 \times 10^{-5}\%$  (w/v) biotin và 1% (v/v) methanol) ở 30°C lắc 220 vòng/phút.

## **2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.2.1. Phương pháp vi sinh vật**

Hoạt hoá chủng nấm men *Candida rugosa* trong môi trường hoạt hoá ở nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 24 giờ.

Sau đó tiến hành nuôi cấy sinh tổng hợp lipase bằng phương pháp nuôi cấy chìm trên môi trường sinh tổng hợp ở nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 40 giờ.

### **2.2.2. Phương pháp hoá sinh**

- ***Phương pháp cố định lipase trên Nylon-6 [23]***

- \* *Nguyên lý*

Sử dụng phương pháp gắn enzym lên chất mang bằng liên kết đồng hoá trị. Dựa trên hoạt độ enzym trước và sau khi cố định, xác định được hiệu suất cố định enzym.

- \* *Tiến hành*

Lấy 30g hạt Nylon-6 được lắc trong 600ml dung dịch HCl 3,5N ở 45°C trong 15 phút (tốc độ lắc 200 vòng/phút). Sau đó những hạt này được tách ra bằng máy lọc chân không và rửa nhiều lần bằng nước cất.

Sau đó được bổ sung 150ml glutaraldehyt 10% và lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C trong 30 phút. Những hạt này lại được tách ra bằng máy lọc chân không.

Sau khi hoạt hoá, những hạt này được trộn với 100ml dung dịch enzym (1mg/ml) trong đệm phosphat pH=7,7; rồi lắc ở 45°C trong 120 phút (tốc độ lắc 200 vòng/phút).

Sau đó hỗn hợp được để ở 4°C qua đêm. Rồi được rửa nhiều lần bằng nước cất, mỗi lần 20ml để loại những enzym không được gắn kết.

- ***Phương pháp xác định hoạt độ lipase bằng chuẩn độ [32]***

- \* *Nguyên lý*

Dựa trên khả năng xúc tác thủy phân lipit của lipase, xác định lượng axit béo tạo ra trong 15 phút bằng lượng NaOH cần bổ sung để duy trì pH cố định. Hiệu số giữa lượng NaOH sau và trước khi bổ sung enzym đặc trưng cho hoạt tính xúc tác của lipase.

*\* Tiến hành:*

Lấy 10ml dầu ăn + 200ml nước cất + 1% Gum arabic -> đánh tan bằng máy xay sinh tố trong 5 phút, tạo huyền phù.

Lấy 20ml dung dịch huyền phù cho vào cốc thủy tinh đặt lên máy khuấy từ, điều chỉnh nhiệt độ tới 65°C.

Thêm 470  $\mu$ l dung dịch  $\text{CaCl}_2$  đo pH và điều chỉnh pH tới 8,3 (chuẩn bằng NaOH 10mM). Sau khi ổn định pH và nhiệt độ, đo độ tự thủy phân của dung dịch cơ chất trong 15 phút để giữ pH luôn luôn bằng 8,3 (lượng NaOH tiêu tốn là a ml).

Sau đó thêm 20  $\mu$ l dung dịch lipase vào hỗn hợp cơ chất và chuẩn bằng NaOH 10mM để đạt pH= 8,3 và bắt đầu tính lượng tiêu hao NaOH trong 15 phút để giữ pH luôn luôn = 8,3 (lượng NaOH tiêu tốn là b ml).

*\* Đơn vị hoạt độ lipase*

Một đơn vị hoạt độ lipase (U) được xác định như là lượng enzym có khả năng chuyển hoá tạo 1 micromol axit béo trong thời gian 1 phút.

Hoạt độ lipase trong 1ml dịch nổi được tính theo công thức:

$$\text{Hoạt độ lipase} = \frac{(b-a) \cdot 0,01}{t \cdot v} \quad \text{U/ml}$$

Với t: thời gian đo độ tự thủy phân (phút)

v: Thể tích enzym (ml)

a: Lượng NaOH 10mM tiêu tốn khi chưa có enzym ( $\mu$ l)

b: Lượng NaOH 10mM tiêu tốn khi có enzym ( $\mu$ l)

0,01: hệ số chuyển đổi nồng độ

- **Phương pháp tách tinh chế lipase bằng sắc ký trao đổi ion DEAE cellulose [15]**

*\* Nguyên lý:*

Dựa trên phương pháp sắc ký trao đổi ion, chính là sự trao đổi ion của protein tích điện với ion của nhựa trao đổi ion. Trong đó nhóm tích điện (+) là chất mang trao đổi với các ion (-) và do đó chúng được gọi là các chất trao đổi anion và ngược lại chúng được gọi là chất trao đổi cation.

*\* Tiến hành:*

Dịch enzym sau kết tủa phân đoạn bằng etanol nồng độ 60% được cho qua cột DEAE cellulose với điều kiện tách phân đoạn như sau: cột được cân bằng trong đệm Tris-HCl 25mM, pH 7,5; tốc độ chảy 1 ml/phút với gradien nồng độ 0-0,25M NaCl, mỗi phân đoạn thu mẫu là 1ml/ống. Ở mỗi phân đoạn đo hàm lượng protein, xác định hoạt độ lipase để biết được phân đoạn tách lipase tốt nhất.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Tìm điều kiện nuôi cấy thích hợp thu lipase

#### 3.1.1. Tìm điều kiện nuôi cấy thích hợp thu lipase từ *Candida rugosa*

##### 3.1.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi tới sinh tổng hợp lipaza

Chủng nấm men được nuôi cấy trên môi trường MT2, với các điều kiện: nhiệt độ nuôi là 30°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút. Khảo sát với 6 thời gian nuôi khác nhau: 24, 30, 36, 42, 48, 54 giờ. Sau mỗi mốc thời gian trên dịch nuôi cấy được lấy ra và xác định hoạt độ. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1:** ảnh hưởng của thời gian nuôi đến sinh tổng hợp lipaza

| Thời gian (giờ) | Hoạt độ lipaza (U/ml) |
|-----------------|-----------------------|
| 24              | 2                     |
| 30              | 5.2                   |
| 36              | 7.5                   |
| <b>42</b>       | <b>8.33</b>           |
| 48              | 6.9                   |
| 54              | 3.9                   |

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng nghiên cứu có khả năng sinh tổng hợp lipaza ngay từ những giờ đầu nuôi cấy và đạt cực đại sau 42 giờ nuôi, cho hoạt lực 8.33 U/ml.

##### 3.1.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ lắc đến quá trình sinh tổng hợp lipaza

Thí nghiệm được tiến hành ở 4 tốc độ lắc khác nhau: 100, 150, 200, 250 vòng/phút trên môi trường sinh tổng hợp lipaza ở nhiệt độ 30°C, thời gian nuôi 42h. Kết quả thể hiện ở bảng 2

**Bảng 2.** ảnh hưởng của tốc độ lắc đến quá trình sinh tổng hợp lipaza

| Tốc độ lắc (v/p) | Hoạt độ lipaza |
|------------------|----------------|
| 100              | 5              |
| <b>150</b>       | <b>8.33</b>    |
| 200              | 4              |
| 250              | 3              |

Kết quả bảng trên cho thấy quá trình sinh tổng hợp lipaza đạt cực đại ở tốc độ lắc 150 vòng/phút.

### 3.1.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh tổng hợp lipaza

Chúng tôi tiến hành khảo sát với 5 nguồn cacbon khác nhau trên môi trường sinh tổng hợp lipaza ở nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, cơ chất 1% dầu oliu, thời gian nuôi 42h. Kết quả thể hiện ở bảng 3

**Bảng 3. ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh tổng hợp lipaza**

| <b>Nguồn cacbon ( 2g/l)</b> | <b>Hoạt độ lipaza (U/ml)</b> |
|-----------------------------|------------------------------|
| Glucosa                     | 8,67                         |
| Galactosa                   | 12,30                        |
| Tween 80                    | 6,67                         |
| <b><u>Axit Palmitic</u></b> | <b><u>18,00</u></b>          |
| Glyxerol                    | 12,67                        |

Qua bảng trên cho thấy hoạt độ lipaza đạt được cao nhất trên nguồn cacbon là axit palmitic, các nguồn cacbon khác như glyxerol và galactosa cũng cho hoạt độ tương đối cao. Vậy nguồn cacbon thích hợp nhất cho sinh tổng hợp lipaza của chủng nghiên cứu là axit palmitic. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của tác giả E.Dalmau (2000) khi nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn cacbon khác nhau đến sinh tổng hợp lipaza của chủng *candida rugosa*.

### 3.1.1.4. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ axit palmitic đến sinh tổng hợp lipaza

Tiến hành nuôi cấy chủng nấm men trên môi trường sinh tổng hợp lipaza với các điều kiện thích hợp đã tìm được ở trên, thay đổi hàm lượng axit palmitic trong môi trường (g/l): 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3. Sau 42 h nuôi

cấy xác định hoạt độ trong dịch canh trường thu được kết quả trong bảng 4 sau đây.

**Bảng 4. ảnh hưởng của nồng độ axit palmitic**

| Nồng độ axit palmitic (g/l) | Hoạt độ lipaza (U/ml) |
|-----------------------------|-----------------------|
| 0.5                         | 12.3                  |
| 1                           | 15.83                 |
| 1.5                         | <b><u>17.67</u></b>   |
| 2                           | 13.67                 |
| 2.5                         | 9.33                  |
| 3                           | 5.67                  |

Từ kết quả trên ta thấy nồng độ axit palmitic cũng ảnh hưởng nhiều tới khả năng sinh tổng hợp lipaza. Nồng độ axit palmitic 1,5 g/l cho hoạt độ cao nhất là 17.67 (UI/ml).

#### **3.1.1.5. Tối ưu hoá điều kiện nuôi chìm *Candida rugosa***

Từ các điều kiện khảo sát được ở trên chúng tôi tiến hành tối ưu hoá bậc 1 điều kiện nuôi chủng *Candida rugosa* theo 3 yếu tố sau:

$X_1$ : axit palmitic (g/l)

$X_2$ : Số tế bào nấm men (tb/ ml )

$X_3$ : thời gian (giờ)

Khi ấy hàm mục tiêu là Y: hoạt độ lipaza (U/ml)

- Các mức thí nghiệm**

| Mức thí nghiệm  | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Mức gốc         | 1.5   | 4     | 42    |
| Khoảng biến đổi | 0.5   | 2     | 1     |
| Mức trên        | 2     | 6     | 46    |
| Mức dưới        | 1     | 2     | 38    |

- Lập ma trận thí nghiệm và kết quả

| ST<br>N | X <sub>1</sub> |      | X <sub>2</sub> |     | X <sub>3</sub> |     | Y <sub>1</sub> | Y <sub>2</sub> | Y <sub>tb</sub>  | S <sub>j</sub> <sup>2</sup> |
|---------|----------------|------|----------------|-----|----------------|-----|----------------|----------------|------------------|-----------------------------|
|         | Mã             | Thực | Mã             | Thứ | M              | Thứ |                |                |                  |                             |
| 1       | -              | 0.05 | -              | 2   | -              | 34  | 9.56           | 10.67          | 10.12            | 0.62                        |
| 2       | +              | 0.15 | -              | 2   | -              | 34  | 16.67          | 14.33          | 15.5             | 2.74                        |
| 3       | -              | 0.05 | +              | 6   | -              | 34  | 13.37          | 11.87          | 12.62            | 1.13                        |
| 4       | +              | 0.15 | +              | 6   | -              | 34  | 15.3           | 14.76          | 15.03            | 0.15                        |
| 5       | -              | 0.05 | -              | 2   | +              | 42  | 15.63          | 14.87          | 15.25            | 0.29                        |
| 6       | +              | 0.15 | -              | 2   | +              | 42  | 14.78          | 15.63          | 15.21            | 0.36                        |
| 7       | -              | 0.05 | +              | 6   | +              | 42  | 17.2           | 17.67          | 17.44            | 0.11                        |
| 8       | +              | 0.15 | +              | 6   | +              | 42  | 18.67          | 17.53          | 18.1             | 0.65                        |
|         |                |      |                |     |                |     |                |                | $\bar{Y}=119.27$ | $\bar{S}=6.05$              |

- Xử lý thống kê các kết quả thực nghiệm thu được

- ♦ Kiểm tra độ đồng nhất của ma trận theo chuẩn Cochran

Nếu  $G_b > G_{tt}$  thì ma trận đồng nhất

$$G_{tt} = \max S_j^2 = 0.45$$

$$\bar{S}^2$$

$$G_b \text{ tra bảng} = 0.6798$$

$\Rightarrow G_b > G_{tt}$  nên các số liệu được đo cùng một độ chính xác như nhau và có thể chấp nhận được

**Xác định các hệ số của mô hình theo công thức**

$$b = \frac{\sum \bar{y}}{N}$$

$$b_0=14.91 \quad b_1=1.05 \quad b_2=0.88 \quad b_3=1.59$$

Phương trình hồi quy có dạng :  $y = 14.91 + 1.05x_1 + 0.88x_2 + 1.59x_3$

♦ **Kiểm tra sự có nghĩa của các hệ số**

$$|b_i| \geq t.S_b = 2.12 \cdot 0.31 = 0.6572$$

với t là chuẩn student tra bảng ( $p=0,05$ ;  $f=16$ ) = 2.12

ta thấy các hệ số  $|b_0|, |b_1|, |b_2|, |b_3|$  đều  $\geq 0.6572$

Tất cả các hệ số trên đều có nghĩa

Vậy phương trình hồi qui cuối cùng là:

$$y = 14.91 + 1.05x_1 + 0.88x_2 + 1.59x_3$$

♦ **Kiểm tra sự thích ứng của phương trình hồi quy theo chuẩn Fisher**

| STT | Mô hình                    | Y <sub>tt</sub> | Y <sub>tn</sub> | (Y <sub>tt</sub> -Y <sub>tn</sub> ) <sup>2</sup> |
|-----|----------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------------------------|
| 1   | 14.91 - 1.05 - 0.88 - 1.59 | 11.39           | 10.12           | 1.61                                             |
| 2   | 14.91 + 1.05 - 0.88 - 1.59 | 13.49           | 15.5            | 4.04                                             |
| 3   | 14.91 - 1.05 + 0.88 - 1.59 | 13.15           | 12.62           | 0.28                                             |
| 4   | 14.91 + 1.05 + 0.88 - 1.59 | 15.25           | 15.03           | 0.05                                             |
| 5   | 14.91 - 1.05 - 0.88 + 1.59 | 14.57           | 15.25           | 0.46                                             |
| 6   | 14.91 + 1.05 - 0.88 + 1.59 | 16.67           | 15.21           | 2.31                                             |
| 7   | 14.91 - 1.05 + 0.88 + 1.59 | 16.33           | 17.44           | 1.23                                             |
| 8   | 14.91 + 1.05 + 0.88 + 1.59 | 18.43           | 18.1            | 0.11                                             |
|     |                            |                 |                 | Σ3.93                                            |

$$Stu^2 = \frac{\sum (y_{tt} - y_{tn})^2}{N - B}$$

$$F_{tt} = \frac{\max(\bar{S}y^2, Stu^2)}{\min(\bar{S}y^2, Stu^2)}$$

$$S_{tu} = 3.93 / 4 = 0.98$$

$$F_{tt} = 0.98 / 0.38$$

$$= 2.58$$

$$F_b = 3.01 \text{ tra bảng với } f_1 = N - B = 4$$

$$f_2 = N (k - 1) = 8$$

Trong đó N: số thí nghiệm

B: số hệ số có nghĩa

k: số lần lặp lại

$$F_{tt} \leq F_b \Rightarrow \text{Mô hình trên là thích ứng}$$

- **Tối ưu hoá theo Box - Wilson**

$$\lambda_i = X^0 - \text{cận dưới} = \text{cận trên} - X^0$$

$$|b_1 \lambda_1| = 1,05 * 0,5 = 0.525$$

$$|b_2 \lambda_2| = 0,92 * 2 = 1.84$$

$$|b_3 \lambda_3| = 1,61 * 4 = 6.44 \Rightarrow \text{đạt giá trị lớn nhất nên ta chọn } X_3 \text{ làm } X_{cs}$$

Chọn bước nhảy của  $X_3$  là  $\Delta_3 = 2$

$$\Delta_1 = (b_1 \lambda_1 / b_3 \lambda_3). \Delta_3 = 0,2$$

$$\Delta_2 = (b_2 \lambda_2 / b_3 \lambda_3). \Delta_3 = 0.6$$

**Kết quả tối ưu theo Box - Wilson**

| STT | $X_1$      | $X_2$      | $X_3$     | Hoạt độ             |
|-----|------------|------------|-----------|---------------------|
| 1   | 1          | 2          | 38        | 16.17               |
| 2   | <b>1.2</b> | <b>2.6</b> | <b>40</b> | <b><u>18.67</u></b> |
| 3   | 1.4        | 3.2        | 42        | 11.67               |
| 4   | 1.6        | 3.8        | 44        | 9.33                |
| 5   | 1.8        | 4.4        | 46        | 6.67                |

Từ kết quả trên cho thấy quá trình sinh tổng hợp enzym lipaza của chủng nấm men *Candida rugosa* đạt hiệu quả tốt nhất ở thí nghiệm thứ 2 với điều kiện:

Hàm lượng axit palmitic: 1.2 g/l

Số tế bào nấm men :  $2,6.10^6$  tb/ml canh trường

Thời gian nuôi: 40 giờ

### 3.1.2. Tìm điều kiện nuôi thu lipase từ *Bacillus* sp

Chúng tôi đã nuôi cấy chủng vi sinh trong 6 môi trường khác nhau về thành phần (bảng 5) và xác định hoạt tính lipase trong dịch nổi sau 120 giờ nuôi cấy. Kết quả cho thấy hoạt độ enzym đạt cao nhất khi nuôi cấy trong môi trường BMMY (67 U/ml canh trường). Môi trường này sẽ được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

**Bảng 5. Hoạt tính lipase *Bacillus*- sp nuôi cấy ở 6 môi trường khác nhau**

| Môi trường<br>(50 ml) | Thành phần                                                                              | Hoạt độ sau 120<br>giờ nuôi cấy<br>(U/ml) |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| A                     | Bột ngô: 0,8g. Bột đậu tương: 1,6 g.<br>Nước dừa: 50 ml. Methanol 1%.                   | 3,2                                       |
| B                     | Bột ngô: 0,8g. Bột đậu tương: 1,6 g.<br>Nước dừa: 50 ml. Methanol: 1%.<br>Biotin:       | 5,1                                       |
| C                     | Bột ngô: 0,8g. Bột đậu tương: 1,6 g.<br>Nước máy: 50 ml. Methanol: 1%.                  | 3,4                                       |
| D                     | Bột ngô: 0,8g. Bột đậu tương: 1,6 g.<br>Đệm K-phosphate: 50 ml. Methanol:<br>1%.        | 10,2                                      |
| E                     | Bột ngô: 0,8g. Bột đậu tương: 1,6 g.<br>Đệm K-phosphate: 50 ml. Methanol:<br>1%. Biotin | 8,3                                       |
| BMMY                  |                                                                                         | 67,0                                      |

Thí nghiệm tiếp sau đây nhằm khảo sát ảnh hưởng của một số cơ chất cảm ứng tới khả năng sinh tổng hợp lipase. Môi trường cơ bản BMMY được bổ sung một số loại dầu hoặc gum arabic (bảng 2).

Tiến hành nuôi với 6 loại môi trường khác nhau, cứ 24 giờ lấy mẫu để xác định hoạt tính và tốc độ phát triển của vi khuẩn (OD). Kết quả cho thấy các cơ chất này không làm tăng khả năng sinh tổng hợp enzyme của chủng nghiên cứu.

**Bảng 6. ảnh hưởng của dầu và gum arabic tới khả năng sinh tổng hợp lipase *Bacillus*-sp**

| TT | Các chất bổ sung vào môi trường BMMY | Hoạt độ (U/ml) |      |      |      |             |             |
|----|--------------------------------------|----------------|------|------|------|-------------|-------------|
|    |                                      | 24 h           | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h       | 144 h       |
| 1  | Đối chứng (BMMY)                     | 16,0           | 37,2 | 42,0 | 48,4 | <u>67,0</u> | 54,0        |
| 2  | 1% Gum arabic                        | 16,0           | 16,5 | 17,7 | 22,0 | 32,2        | <b>41,0</b> |
| 3  | 1% dầu Marvela                       | 21,0           | 23,0 | 32,0 | 37,0 | 44,0        | <b>44,0</b> |
| 4  | 1% dầu Marvela + 1% Gum arabic       | 23,3           | 24,2 | 36,0 | 37,0 | 45,0        | <b>50,0</b> |
| 5  | 1% dầu mè                            | 19,0           | 21,2 | 38,0 | 42,0 | 42,0        | <b>42,8</b> |
| 6  | 1% dầu mè + 1% Gum arabic            | 30,0           | 36,0 | 46,0 | 52,0 | 56,0        | 62,0        |

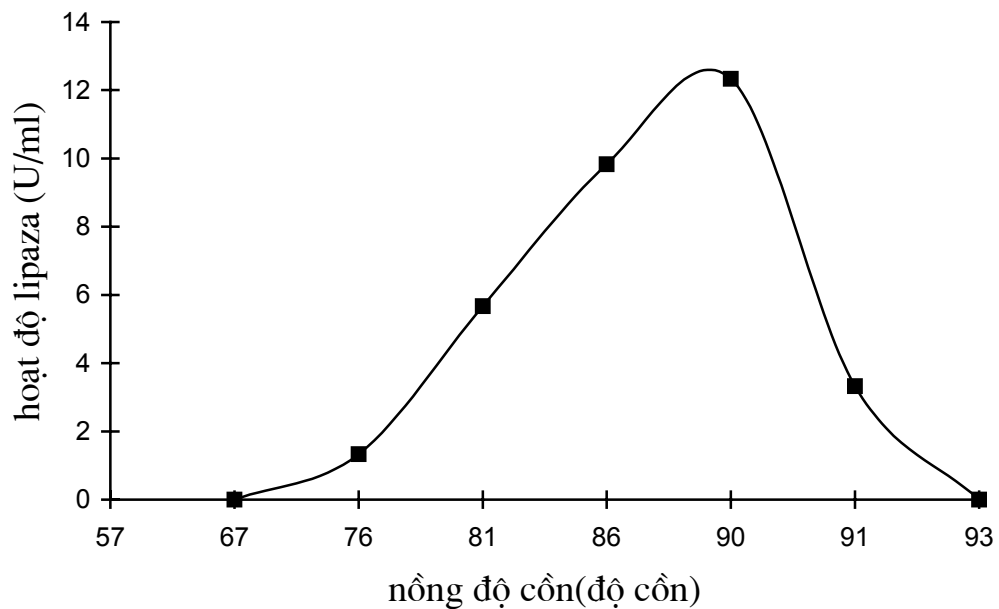
### 3.2. Tách và tinh chế lipase từ *Candida rugosa*

#### 3.2.1. Khảo sát nồng độ etanol thích hợp kết tủa lipaza từ *Candida rugosa*

Tiến hành thí nghiệm kết tủa lipaza với các nồng độ khác nhau: 60, 70, 80, 90%, ly tâm lạnh, thu kết tủa cho bốc hơi dung môi ta thu được lipaza thô. Kết quả xác định hoạt độ được thể hiện ở bảng 7

***Bảng 7. Kết quả lipaza ở các nồng độ etanol khác nhau***

| Nồng độ etanol (%v/v) | Hoạt độ lipaza trước khi kết tủa (UI/ml) | Hoạt độ lipaza sau khi kết tủa còn (UI/ml) | Hiệu suất thu lipaza (%) |
|-----------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------|
| 57                    | 16.73                                    | 0                                          | 0                        |
| 67                    | 16.73                                    | 0                                          | 0                        |
| 76                    | 16.73                                    | 1.33                                       | 7.95                     |
| 81                    | 16.73                                    | 5.67                                       | 21.94                    |
| 86                    | 16.73                                    | 9.83                                       | 58.76                    |
| 90                    | 16.73                                    | 12.33                                      | <b><u>73.7</u></b>       |
| 91                    | 16.73                                    | 3.33                                       | 19.9                     |
| 93                    | 16.73                                    | 0                                          | 0                        |



***Hình 1: kết quả kết tủa enzym bằng etanol***

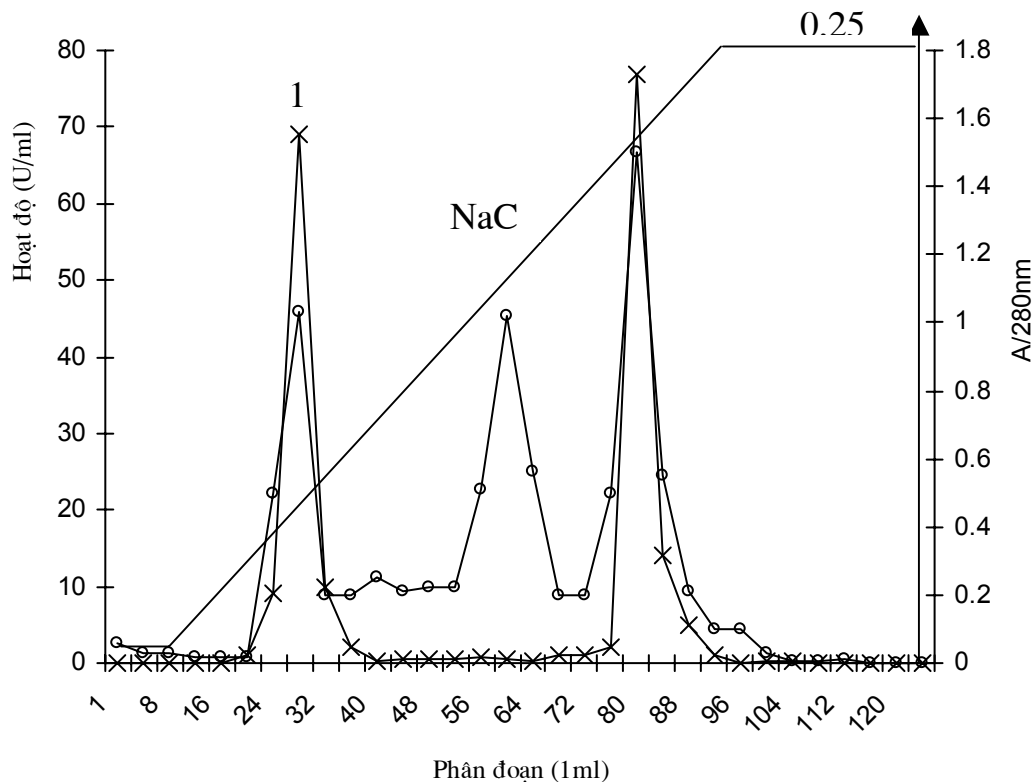
Từ kết quả thu được ở trên ta nhận thấy các nồng độ cồn trong khoảng 0 -67% có cho ta kết tủa nhưng không có hoạt độ enzym, chỉ khi nồng độ cồn từ 67% trở lên là có hoạt độ và ở nồng độ cồn là 90% thì cho ta hoạt

độ cao nhất. Qua thí nghiệm này cho thấy ở nồng độ cồn từ 67% trở xuống chỉ có protein tạp bị kết tủa vì vậy chúng ta có thể kết tủa phân đoạn để loại bỏ bớt protein tạp.

### 3.1.2. Tinh sạch lipase bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion-DEAE-cellulose trên thiết bị FPLC

Dịch enzym sau rửa bằng etanol được lấy 15 ml cho vào cột đã được cân bằng trong đệm Tris-HCl 25mM pH 7,5; tốc độ chạy là 1,5ml/phút. Dung dịch đẩy lipase là NaCl với gradien nồng độ 0-0,25M; mỗi phân đoạn thu 1ml/ống.

Kết quả được biểu diễn trên sắc ký đồ hình 2



**Hình 2.** Sắc ký đồ tinh sạch lipase

Sắc ký đồ hình 2 cho thấy lipase sau khi qua cột trao đổi ion DEAE - cellulose xuất hiện 3 pick. Tiến hành xác định hoạt độ lipase ở các phân đoạn thuộc các pick. Kết quả cho thấy chỉ có pick 1 và pick 3 có hoạt tính lipase (69UI/ml và 77UI/ml). Điều này phù hợp với nghiên cứu

của M.A. Pernas (2000) [15] đã công bố Lip1 và Lip3 có khối lượng phân tử là 58 và 62 kDa.

Kết quả các bước tách và làm sạch được thể hiện ở bảng 8

**Bảng 8. Kết quả tách làm sạch lipase**

| Các bước làm sạch  | Tổng thể tích (ml) | Protein tổng (mg) | Hoạt độ lipase |                | Mức độ sạch (lần) | Hiệu suất (%) |
|--------------------|--------------------|-------------------|----------------|----------------|-------------------|---------------|
|                    |                    |                   | Tổng (U)       | Riêng (U/mgPr) |                   |               |
| Dịch thô           | 200                | 340               | 1500           | 4,41           | (1)               | (100)         |
| Sau kết tủa etanol | 20                 | 66,8              | 1245           | 18,64          | 4,22              | 83,00         |
| DEAE - Cellulose   | 8                  | 10,08             | 556            | 55,16          | 12,50             | 37,06         |

Kết quả sắc ký đồ hình 2 và bảng 8 cho thấy lipase sau các bước làm sạch liên tiếp: kết tủa etanol, sắc ký trao đổi ion DEAE – Cellulose thu được chế phẩm có hoạt độ riêng 55,16 U/mg protein, mức độ tinh sạch của lipase là 12,5 lần; hiệu suất thu hồi là 37,06%.

### 3.3. KHẢO SÁT CÁC ĐIỀU KIỆN TỐI ƯU ĐỂ CỐ ĐỊNH LIPASE tổ *Candida rugosa* trên nylon 6

#### 3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ HCl hoạt hoá Nylon-6 đến khả năng cố định lipase

Nylon-6 là một polyamit tích điện (+). Lipase là enzym kiềm tính chứa nhóm (OH<sup>-</sup>) vì vậy sử dụng HCl để hoạt hoá chất mang, làm tăng điện tích (+) là cần thiết. Do vậy tiến hành thí nghiệm bằng cách sử dụng lipase sau kết tủa etanol cố định trên Nylon-6 ở các nồng độ HCl khác nhau với các điều kiện ổn định:

Tổng lượng hạt Nylon-6 đem xử lý : 3g

Nồng độ glutaraldehyt : 10%

Đệm kali phosphat : pH 7,7

Tốc độ lắc : 200 vòng/phút

Kết quả biểu diễn ở bảng 9

**Bảng 9.** Ảnh hưởng của nồng độ HCl hoạt hoá Nylon-6 đến khả năng cố định lipase

| Nồng độ HCl (N)        | Tổng thể tích nước rửa (ml) | Hoạt độ còn lại trong nước rửa (U) | Hiệu suất cố định enzym (%) |
|------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| Đối chứng (lipase tan) | -                           | 550                                | 100                         |
| 3                      | 33,5                        | 276,4                              | 49,75                       |
| <b>3,5</b>             | <b>33,5</b>                 | <b>226,1</b>                       | <b>58,90</b>                |
| 4                      | 33,5                        | 245,3                              | 55,40                       |
| 4,5                    | 33,5                        | 259,6                              | 52,80                       |

Bảng 9 cho thấy, với nồng độ HCl 3,5N hiệu suất cố định đạt 58,9% là cao nhất. Có thể với nồng độ HCl thấp chưa đủ khả năng hoạt hoá chất mang, còn với nồng độ cao làm thay đổi pH, ảnh hưởng đến khả năng liên kết lipase vào chất mang. Kết quả này phù hợp với tài liệu đã công bố trước đây[23].

### 3.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ glutaraldehyt đến khả năng cố định lipase

Tiến hành cố định lipase với các nồng độ glutaraldehyt khác nhau (8%, 10%, 12%) và các điều kiện:

Tổng lượng hạt Nylon-6 đem xử lý : 3g

Nồng độ HCl : 3,5N

Đệm kali phosphat : pH 7.7

Tốc độ lắc : 200 vòng/phút

Kết quả khảo sát thể hiện ở bảng 10

**Bảng 10.** *Ảnh hưởng của nồng độ glutaraldehyt đến khả năng cố định lipase*

| Nồng độ glutaraldehyt (%) | Tổng thể tích nước rửa (ml) | Hoạt độ còn lại trong nước rửa (U) | Hiệu suất cố định enzym (%) |
|---------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| Đối chứng (lipase tan)    | -                           | 550                                | 100                         |
| 8                         | 33,5                        | 293,1                              | 46,7                        |
| <b>10</b>                 | <b>33,5</b>                 | <b>209,4</b>                       | <b>61,9</b>                 |
| 12                        | 33,5                        | 376,8                              | 31,5                        |

Qua kết quả khảo sát cho thấy ở nồng độ glutaraldehyt 10% cho hiệu suất cố định lipase cao nhất (61,9%). Như vậy nồng độ glutaraldehyt 10% là nồng độ thích hợp để liên kết enzym lại với nhau và tăng độ liên kết lên chất mang Nylon-6.

### **3.3.3. Ảnh hưởng của nồng độ lipase đến khả năng cố định**

Tiến hành cố định lipase ở các nồng độ enzym khác nhau (0,5; 1; 1,5; 2 mg/ml) và cố định các điều kiện:

Tổng lượng hạt Nylon-6 đem xử lý : 3g

Nồng độ HCl : 3,5N

Đệm kali phosphat : pH 7.7

Tốc độ lắc : 200 vòng/phút

Kết quả được thể hiện ở bảng 11

**Bảng 11. Ảnh hưởng của nồng độ enzym đến khả năng cố định lipase**

| Nồng độ enzym (mg/ml) | Tổng thể tích nước rửa (ml) | Hoạt độ còn lại trong nước rửa (U) | Hiệu suất cố định (%) |
|-----------------------|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| 0,5 (270U)            | 33,5                        | 160,80                             | 40,45                 |
| <b>1 (550U)</b>       | <b>33,5</b>                 | <b>224,45</b>                      | <b>59,20</b>          |
| 1,5 (820U)            | 33,5                        | 375,20                             | 54,25                 |
| 2 (1100U)             | 33,5                        | 753,75                             | 31,50                 |

Khảo sát khả năng cố định lipase trên Nylon-6 với các nồng độ enzym khác nhau ta thấy với nồng độ enzym là 1 mg/ml, hiệu suất cố định cao nhất (59,2%). Kết quả khảo sát này phù hợp với kết quả đã nghiên cứu trước đây[23].

#### **3.3.4. Ảnh hưởng của dung dịch đệm đến khả năng cố định lipase**

Tiến hành khảo sát 3 dung dịch đệm khác nhau: đệm photphat, đệm borat, đệm đa năng với các điều kiện cố định:

Tổng lượng hạt Nylon-6 đem xử lý : 3g

Nồng độ HCl : 3,5N

Nồng độ glutaraldehyt : 10%

Tốc độ lắc : 200 vòng/phút

Kết quả khảo sát thể hiện ở bảng 12.

**Bảng 12. Ảnh hưởng của dung dịch đệm đến khả năng cố định lipase**

| Các dung dịch đệm      | Tổng thể tích nước rửa (ml) | Hoạt độ còn lại trong nước rửa (U) | Hiệu suất cố định (%) |
|------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| Đối chứng (lipase tan) | -                           | 550                                | 100                   |
| <b>Đệm photphat</b>    | <b>33,5</b>                 | <b>251,25</b>                      | <b>54,30</b>          |
| Đệm borat              | 33,5                        | 335,00                             | 39,10                 |
| Đệm đa năng            | 33,5                        | 418,75                             | 23,86                 |

Qua kết quả khảo sát với các loại đệm cho thấy hiệu suất cố định với đệm phosphat là cao nhất (54,3%). Như vậy đệm thích hợp cho việc cố định lipase trên Nylon-6 là đệm phosphat pH 7,7. Phù hợp với kết quả đã nghiên cứu trước đây[23].

### 3.4. Đặc tính của lipase

#### 3.4.1. Một số đặc tính của lipase tự do và cố định từ *Candida rugosa*

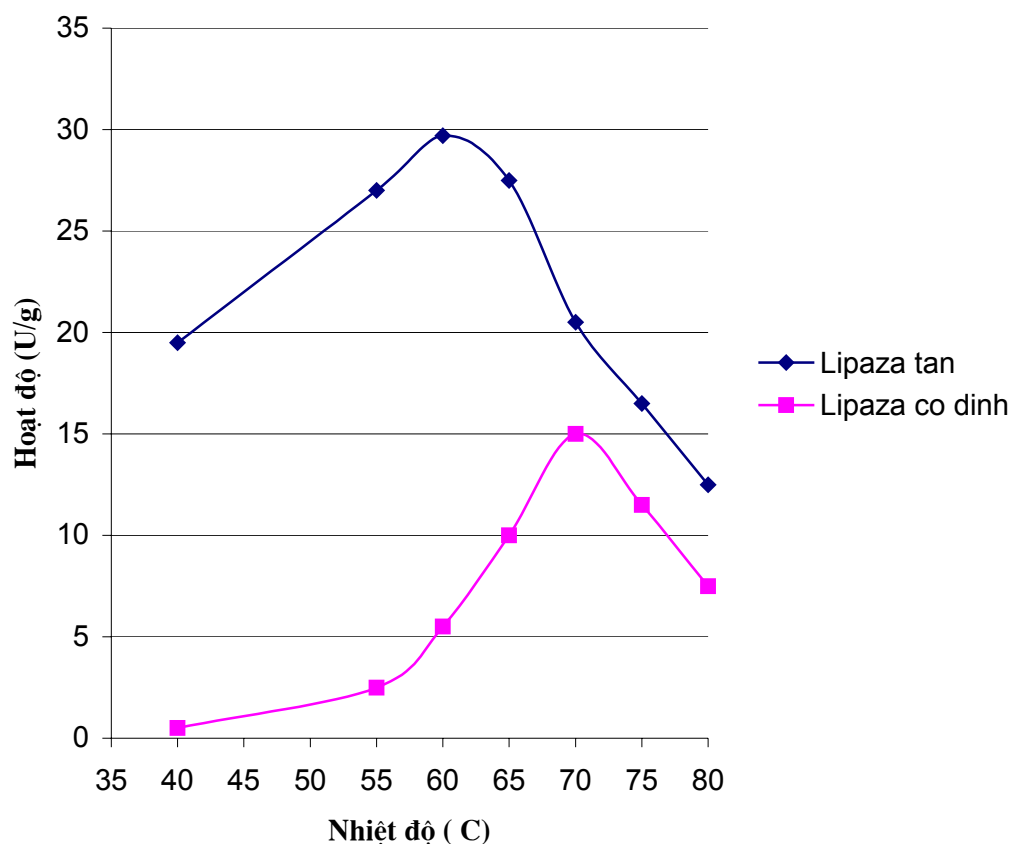
##### 3.3.1.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt độ lipase từ *Candida rugosa*

Nhiệt độ là yếu tố tác động mạnh mẽ tới hoạt độ của enzym. Khi nhiệt độ tăng thì vận tốc phản ứng cũng tăng nhưng đến một giới hạn nào đó thì vận tốc đạt cực đại, nếu tiếp tục tăng thì vận tốc enzym sẽ giảm vì nhiệt độ cao sẽ làm biến tính protein gây bất hoạt enzym. Nhiệt độ mà tại đó enzym hoạt động mạnh nhất gọi là nhiệt độ tối ưu. Mỗi enzym có một vùng hoạt động khác nhau. Để xác định nhiệt độ tối ưu của lipase ta tiến hành xác định hoạt độ ở các nhiệt độ 55, 60, 65, 70, 75°C bằng phương pháp chuẩn độ theo mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu.

Kết quả thể hiện ở bảng 9 và hình 3

**Bảng 13.** Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt độ lipase tự do và cố định

| Nhiệt độ (°C) | Hoạt độ lipase tự do (U/g) | Hoạt độ lipase cố định (U/g) |
|---------------|----------------------------|------------------------------|
| 40            | 19,5                       | 0,5                          |
| 55            | 27,0                       | 2,5                          |
| 60            | <b>29,7</b>                | 5,5                          |
| 65            | 27,5                       | 10,0                         |
| 70            | 20,5                       | <b>15,0</b>                  |
| 75            | 16,5                       | 11,5                         |
| 80            | 12,5                       | 7,5                          |



**Hình 3.** Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt độ lipase tự do và cố định

Theo hình 3 cho thấy khi nhiệt độ tăng từ 60°C trở lên hoạt độ lipase cố định tăng dần và đạt cực đại tại 70°C (15 U/g). Đối với lipase tan, ở nhiệt độ 60°C hoạt độ lipase đã đạt cực đại (29,7U/g) và giảm dần khi nhiệt độ tăng lên.

Như vậy nhiệt độ thích hợp cho lipase tự do và cố định hoạt động là khác nhau. Nhiệt độ tối ưu của lipase cố định cao hơn của lipase tự do vì lipase cố định có lớp chất mang bảo vệ nên có khả năng chịu nhiệt.

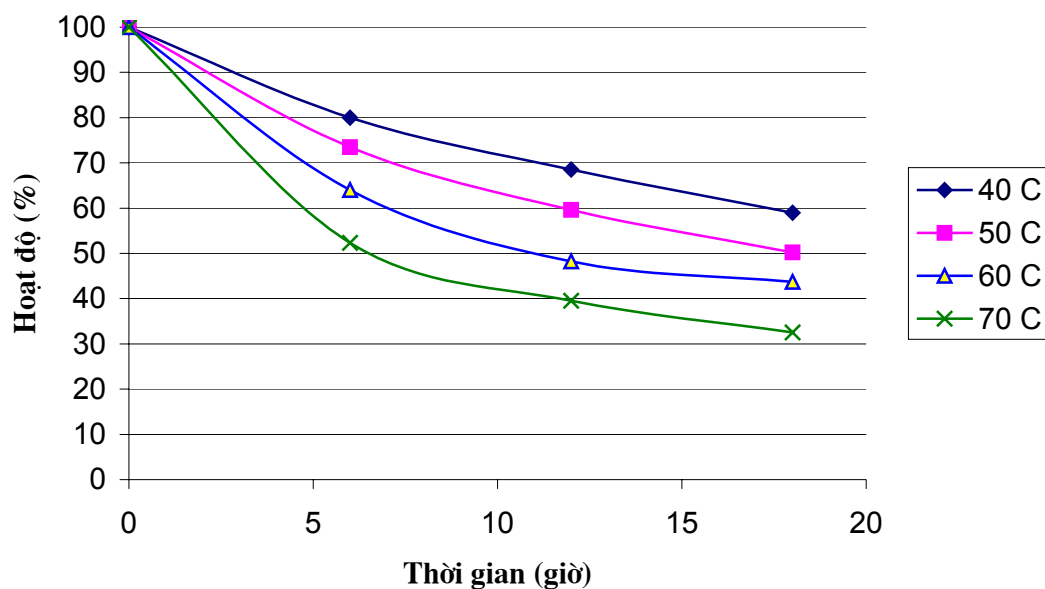
#### **3.4.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới tính bền lipase tự do và cố định**

Tiến hành thí nghiệm với lipase tự do và cố định ở các nhiệt độ khác nhau: 40, 50, 60, 70°C với thời gian xác định trong 18 giờ, cứ sau 6 giờ xác định hoạt độ một lần.

Kết quả xác định tính bền nhiệt của lipase tự do và cố định được thể hiện ở bảng 14 và hình 4.

**Bảng 14.** Ảnh hưởng của nhiệt độ tới tính bền lipase tự do

| Nhiệt độ<br>( <sup>0</sup> C) | Thời gian (giờ) |     |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------------|-----------------|-----|------|------|------|------|------|------|
|                               | 0               |     | 6    |      | 12   |      | 18   |      |
|                               | Hoạt độ         |     |      |      |      |      |      |      |
|                               | U/g             | %   | U/g  | %    | U/g  | %    | U/g  | %    |
| 40                            | 29,5            | 100 | 23,6 | 80,0 | 20,2 | 68,5 | 17,4 | 59,0 |
| 50                            | 29,5            | 100 | 21,7 | 73,5 | 17,6 | 59,6 | 14,8 | 50,2 |
| 60                            | 29,5            | 100 | 18,9 | 64,0 | 14,2 | 48,2 | 12,9 | 43,7 |
| 70                            | 29,5            | 100 | 15,4 | 52,3 | 11,7 | 39,5 | 9,6  | 32,5 |

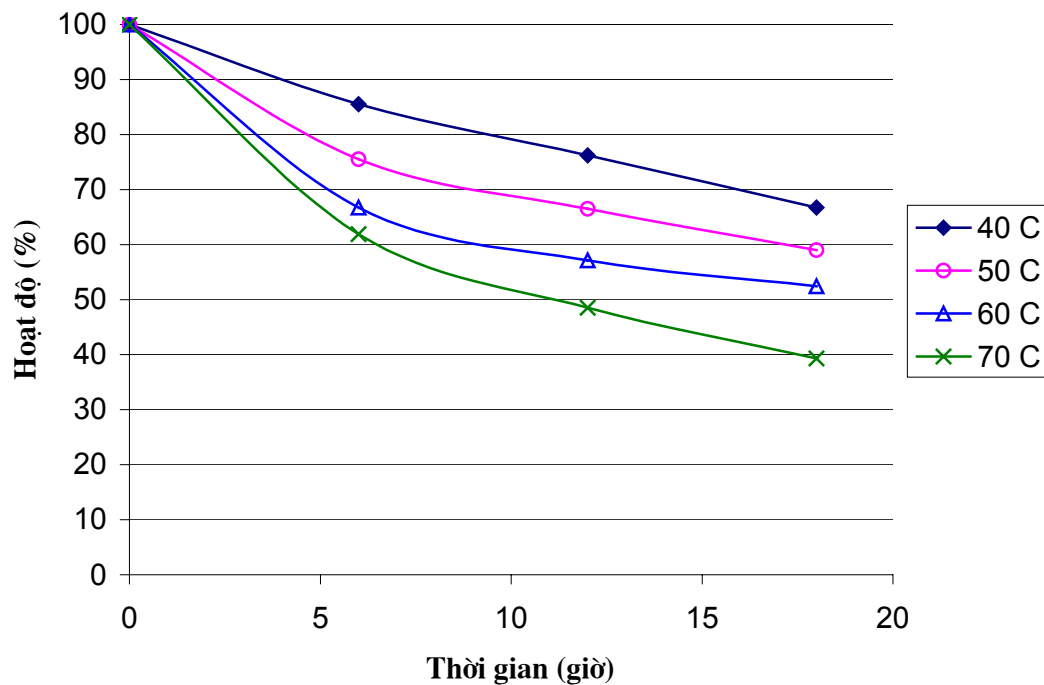


**Hình 4.** Ảnh hưởng của nhiệt độ tới tính bền của lipase tự do

Kết quả cho thấy, đối với enzym tự do vùng bền nhiệt ở 40-50°C, sau 18 giờ hoạt độ lipase còn 50,2 - 59% . Ở 70°C hoạt độ giảm mạnh sau 18 giờ chỉ còn 32,5%.

**Bảng 15.** Ảnh hưởng của nhiệt độ tới tính bền của lipase cố định

| Nhiệt<br>độ<br>(°C) | Thời gian (giờ) |     |      |      |      |      |      |      |
|---------------------|-----------------|-----|------|------|------|------|------|------|
|                     | 0               |     | 6    |      | 12   |      | 18   |      |
|                     | Hoạt độ         |     |      |      |      |      |      |      |
|                     | U/g             | %   | U/g  | %    | U/g  | %    | U/g  | %    |
| 40                  | 21              | 100 | 17,8 | 85,5 | 16,0 | 76,2 | 14,0 | 66,7 |
| 50                  | 21              | 100 | 15,9 | 75,5 | 13,9 | 66,5 | 12,4 | 59,0 |
| 60                  | 21              | 100 | 14,0 | 66,7 | 12,0 | 57,1 | 11,0 | 52,4 |
| 70                  | 21              | 100 | 13,0 | 61,9 | 10,2 | 48,5 | 8,3  | 39,3 |



**Hình 5.** Ảnh hưởng của nhiệt độ tới tính bền lipase cố định

Kết quả cho thấy lipase cố định bền ở vùng nhiệt độ 40 - 60°C (sau 18 giờ hoạt độ còn 52,4 – 66,7% so với hoạt độ ban đầu). Sau 18 giờ, ở 70°C hoạt độ lipase cố định còn 39,3%. Như vậy ở mỗi nấc nhiệt độ, hoạt độ lipase cố định tăng khoảng 10% so với lipase tự do.

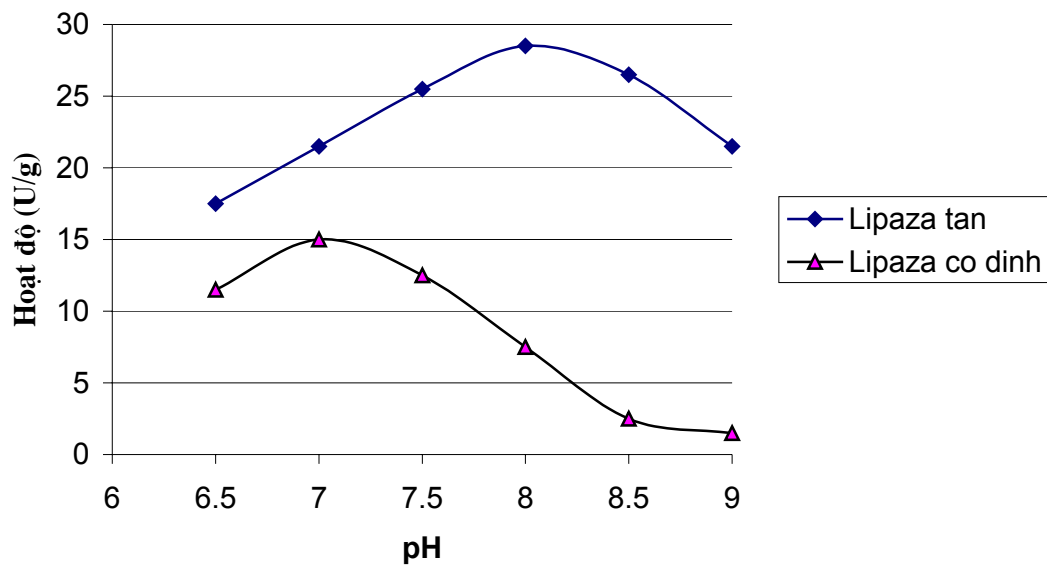
#### 3.4.1.3. Ảnh hưởng của pH tới hoạt độ lipase tự do và cố định

pH có ảnh hưởng khá lớn đến vận tốc phản ứng của enzym, mỗi enzym hoạt động mạnh trong 1 dải pH khác nhau. Ở giá trị pH mà tại đó enzym hoạt động mạnh nhất gọi là pH tối ưu. Tiến hành xác định hoạt độ lipase tự do và cố định với các giá trị pH thay đổi từ 7,0 - 8,3 với cùng cơ chất dầu đậu nành 5%, ở nhiệt độ 65°C.

Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 16 và biểu diễn trên hình 6

**Bảng 16.** Ảnh hưởng của pH tới hoạt độ lipase

| PH  | Hoạt độ lipase tự do (U/g) | Hoạt độ lipase cố định (U/g) |
|-----|----------------------------|------------------------------|
| 6,5 | 17,5                       | 11,5                         |
| 7   | 21,5                       | 15,0                         |
| 7,5 | 25,5                       | <b>12,5</b>                  |
| 8   | <b>28,5</b>                | 7,5                          |
| 8,5 | 26,5                       | 2,5                          |
| 9   | 21,5                       | 1,5                          |



**Hình 6.** Ảnh hưởng của pH tới hoạt độ lipase

Qua bảng 16 và hình 6 cho thấy hoạt độ lipase cố định hoạt động mạnh nhất ở pH 7,0 (15 U/g). Khi tăng pH lên trên 9,0 thì hoạt độ enzym giảm chỉ còn 1,5 U/g.

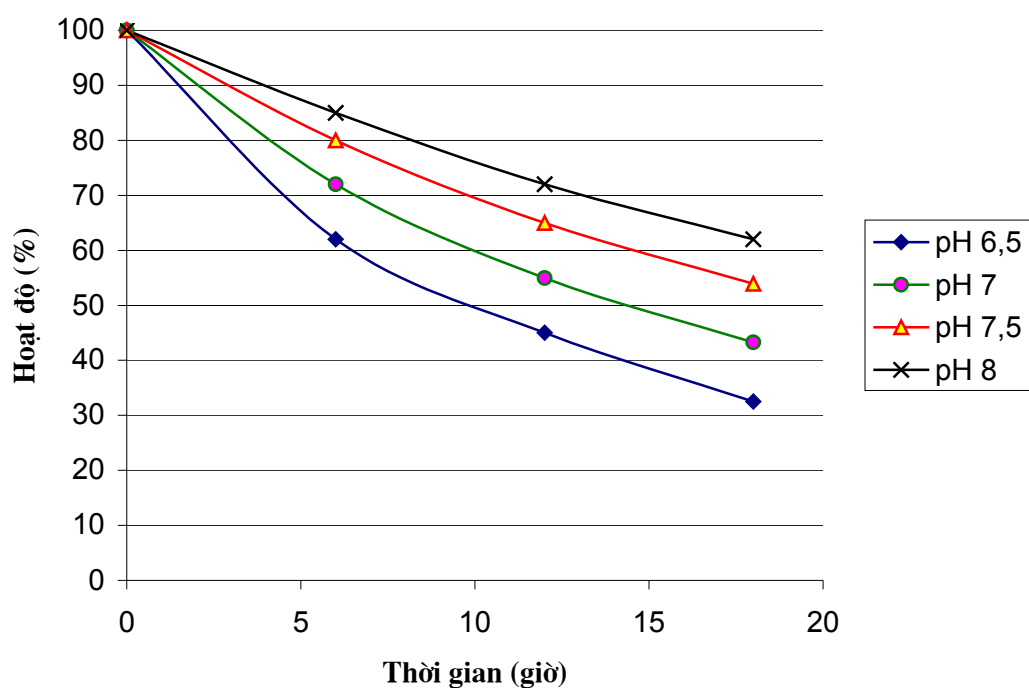
Đối với lipase tự do, hoạt động mạnh ở pH 8,0 (28,5U/g). Điều này cũng phù hợp với lý thuyết, lipase được cố định lên chất mang polyamit tích điện dương nên pH tối ưu chuyển về vùng axit.

#### 3.4.1.4. Ảnh hưởng của pH tới tính bền lipase tự do và cố định

Để xác định ảnh hưởng pH tới tính bền lipase tự do và cố định, tiến hành thí nghiệm ở các giá trị pH khác nhau: 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 với nhiệt độ 30°C trong thời gian 18 giờ. Cứ sau 2 giờ xác định hoạt độ lipase. Kết quả thể hiện ở bảng 17 và hình 7

**Bảng 17.** Ảnh hưởng của pH tới tính bền lipase tan

| pH  | Thời gian (giờ) |     |      |      |      |      |      |      |
|-----|-----------------|-----|------|------|------|------|------|------|
|     | 0               |     | 6    |      | 12   |      | 18   |      |
|     | Hoạt độ         |     |      |      |      |      |      |      |
|     | U/g             | %   | U/g  | %    | U/g  | %    | U/g  | %    |
| 6,5 | 29,5            | 100 | 18,3 | 62,0 | 13,3 | 45,0 | 9,6  | 32,5 |
| 7   | 29,5            | 100 | 21,2 | 72,0 | 16,2 | 55,0 | 12,8 | 43,5 |
| 7,5 | 29,5            | 100 | 23,6 | 80,0 | 19,2 | 65,0 | 15,9 | 53,9 |
| 8   | 29,5            | 100 | 25,1 | 85,0 | 21,2 | 72,0 | 18,3 | 62,0 |

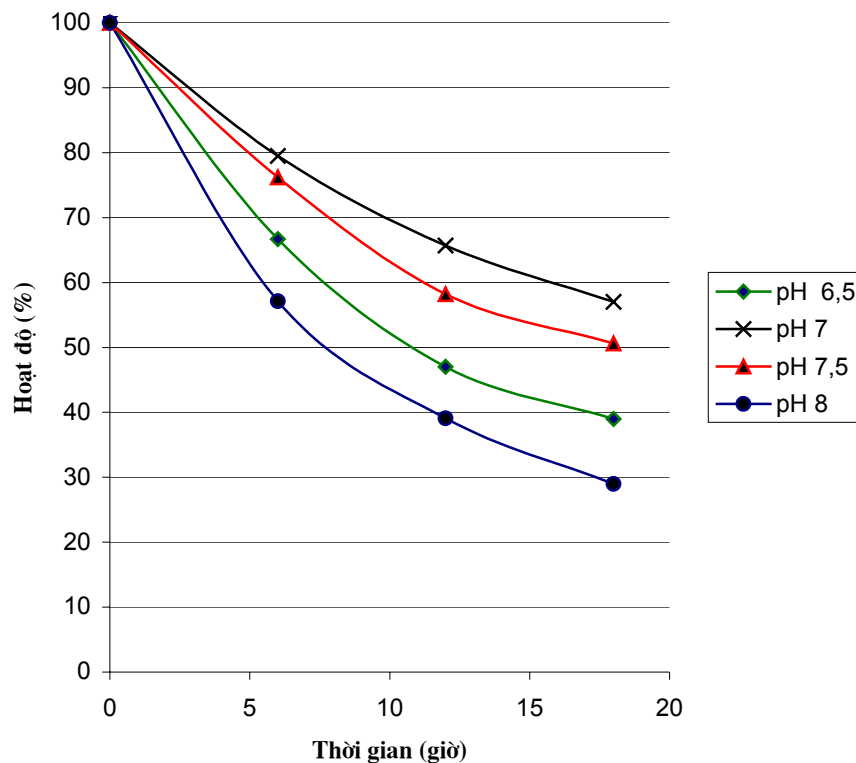


**Hình 7. Ảnh hưởng của pH tới tính bền lipase tan**

Kết quả cho thấy lipase tự do bền ở vùng pH 7,5 – 8,0 sau 18 giờ vẫn còn 53,9 - 62 %.

**Bảng 18. Ảnh hưởng của pH tới tính bền lipase cố định**

| pH  | Thời gian (giờ) |     |      |      |      |      |      |      |
|-----|-----------------|-----|------|------|------|------|------|------|
|     | 0               |     | 6    |      | 12   |      | 18   |      |
|     | Hoạt độ         |     |      |      |      |      |      |      |
|     | U/g             | %   | U/g  | %    | U/g  | %    | U/g  | %    |
| 6.5 | 21              | 100 | 14,0 | 66,7 | 9,9  | 47,0 | 8,2  | 39,0 |
| 7   | 21              | 100 | 16,7 | 79,5 | 13,8 | 65,7 | 12,0 | 57,0 |
| 7.5 | 21              | 100 | 16,0 | 76,2 | 12,2 | 58,2 | 10,6 | 50,6 |
| 8   | 21              | 100 | 12,0 | 57,1 | 8,2  | 39,1 | 6,1  | 29,0 |



**Hình 8.** Ảnh hưởng của pH tới tính bền lipase cố định

Kết quả bảng 18 và hình 8 cho thấy lipase cố định bền ở vùng pH 7 - 7,5 sau 18 giờ hoạt độ còn 50,6 – 57%. Như vậy lipase cố định ở vùng axit hơn so với lipase tự do.

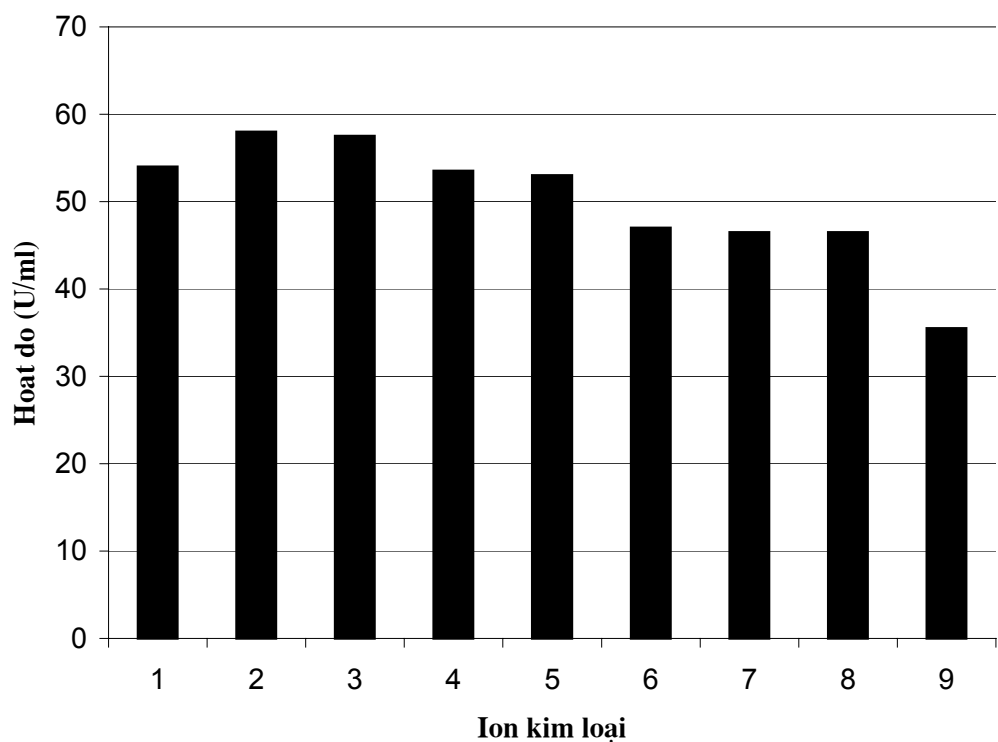
#### **3.4.1.5. Ảnh hưởng của ion kim loại tới hoạt độ lipase tự do**

Để xác định ảnh hưởng của các ion kim loại lên khả năng xúc tác của enzym tiến hành nghiên cứu đối với các ion kim loại:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ . Tiến hành ủ enzym với dung dịch đệm chứa các ion kim loại trên với nồng độ 10mM trong 30 phút, ở điều kiện nhiệt độ phòng ( $30^{\circ}\text{C}$ ) đem xác định hoạt độ theo phương pháp chuẩn độ so với mẫu đối chứng không ủ ion kim loại để biết được mức độ ảnh hưởng của chúng với enzym lipase.

Kết quả thể hiện ở bảng 19 và hình 9

**Bảng 19.** Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt độ lipase tự do

| Các ion kim loại<br>( $10^{-3}\text{M}$ ) | Hoạt độ lipase (U/ml) | % hoạt độ |
|-------------------------------------------|-----------------------|-----------|
| Mẫu đối chứng                             | 54,0                  | 100       |
| $\text{Ca}^{2+}$                          | 58,0                  | 107,40    |
| $\text{Mg}^{2+}$                          | 57,5                  | 106,48    |
| $\text{Na}^{+}$                           | 53,5                  | 99,07     |
| $\text{K}^{+}$                            | 53,0                  | 98,15     |
| $\text{Cu}^{2+}$                          | 47,0                  | 87,03     |
| $\text{Fe}^{3+}$                          | 46,5                  | 86,11     |
| $\text{Zn}^{2+}$                          | 46,5                  | 86,11     |
| $\text{Pb}^{2+}$                          | 35,5                  | 67,74     |



**Hình 9.** Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt độ lipase tự do

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các ion kim loại  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  không ảnh hưởng nhiều đến hoạt độ lipase, trong đó  $\text{Ca}^{2+}$  và  $\text{Mg}^{2+}$  còn có chiều hướng hoạt hoá làm tăng hoạt độ lipase. Còn các ion kim loại nặng  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ức chế yếu lên hoạt độ lipase khoảng 13-14%.  $\text{Pb}^{2+}$  ức chế lipase mạnh nhất, nó làm giảm hoạt độ khoảng 33%.

#### 3.4.1.6. Xác định điểm đẳng điện của lipase tự do

Điểm đẳng điện (pI) là pH mà tại đó phân tử protein trung hoà về điện. Tại điểm đẳng điện, phân tử protein enzyme hoạt động kém và dễ bị kết tủa. Điểm đẳng điện của protein enzyme không những có ý nghĩa lý thuyết mà còn có ý nghĩa thực tiễn trong sản xuất vì vậy cần phải xác định điểm đẳng điện của enzyme bằng cách đo độ đục của dung dịch enzyme khi kết tủa với cồn theo Droxov (1970)

Tiến hành lấy 5ml dịch enzyme chứa 5-8mg protein enzyme, 10ml đệm borat ở các pH khác nhau từ 6,6 đến 9,0. Sau đó cho kết tủa bằng cồn 96° với nồng độ cồn là 60%. Để lạnh trong 30 phút, lấy ra đo hàm lượng protein ở bước sóng  $\lambda = 620\text{nm}$ . Ở pH nào dịch enzyme sau tủa có độ đục cao nhất, tức là độ đục cao nhất, đó là điểm đẳng điện pI của enzyme nghiên cứu. Kết quả thể hiện ở bảng 20.

**Bảng 20.** Kết quả xác định điểm đẳng điện của lipase tự do

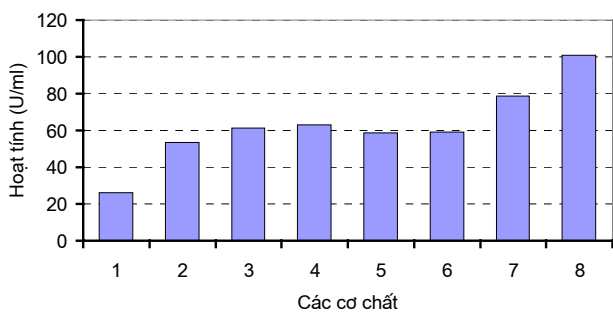
| PH  | OD <sub>620</sub> |
|-----|-------------------|
| 6,6 | 0,577             |
| 7,0 | 0,631             |
| 7,5 | 0,704             |
| 8,0 | 0,688             |
| 8,4 | 0,615             |
| 8,8 | 0,566             |
| 9,1 | 0,454             |

Kết quả thu được ở bảng 20 cho thấy tại pH 7,5 dịch enzym của *Bacillus* có độ đục cao nhất. Vậy pI của lipase là 7,5

### 3.4.2. Một số đặc tính của lipase *Bacillus-sp*

#### ♦ Đặc hiệu cơ chất

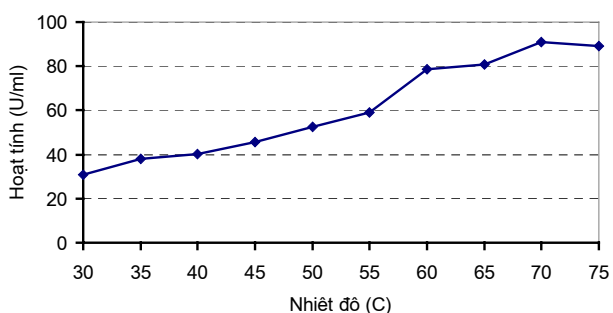
Lipase *Bacillus* có hoạt tính đặc hiệu đối với từng cơ chất và dầu ăn rất khác nhau. Hoạt tính đối với dầu olive thấp nhất chỉ đạt 26 U/ml, đối với các loại dầu khác như dầu mè tinh luyện, dầu nành, Neptune, Meizan, Nakydaco đạt 53-63 U/ml, đối với dầu Tường an đạt 79 U/ml và đối với tributyrin đạt 101 U/ml (hình 10).



**Hình 10.** Hoạt độ lipase *Bacillus* đặc hiệu của từng cơ chất. 1: Dầu olive; 2: Dầu mè (tinh luyện); 3: Dầu nành (tinh luyện); 4: Dầu neptune (dầu cọ + dầu hạt cải); 5: Dầu Meizan (dầu olein + dầu hạt cải + dầu nành); 6: Dầu Nakydaco (dầu olein dừa + dầu nành); 7: Dầu Tường an (dầu olein + dầu nành + dầu canola); 8: Tributyrin (1%).

#### ♦ ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ tối ưu của lipase chủng *Bacillus* chịu nhiệt này được xác định qua việc đo hoạt tính dịch nổi ở nhiệt độ phản ứng khác nhau từ 30 đến 75°C với cơ chất là dầu ăn tổng hợp nồng độ 5% và pH 8,0. Khi nhiệt độ tăng từ 30 đến 75°C thì hoạt tính lipase cũng tăng theo với tốc độ đều từ 31 đến 91 đơn vị/ml (hình 11). Hoạt tính đạt tối ưu ở nhiệt độ 70°C là 91 đơn vị/ml (hình 11). Sau nhiệt độ 70°C, hoạt tính lipase có giảm chút ít (89 U/ml ở nhiệt độ 75°C). Với biểu đồ nhiệt độ tối ưu này, lipase *Bacillus* thuộc vào một trong các lipase ưa nhiệt đã được nghiên cứu trên thế giới.

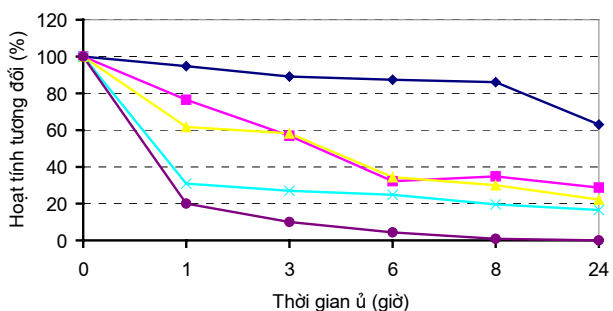


**Hình 11.** ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ lipase.

### ◆ ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ bền của lipase

Dưới tác động của nhiệt độ, hoạt tính lipase ít nhiều đều bị ảnh hưởng. Mức độ ảnh hưởng tùy thuộc vào từng loại lipase khác nhau và tùy theo khoảng thời gian enzym được ủ ở nhiệt độ đó. Trong quá trình xử lý nhiệt, có thể trước tiên một số liên kết hydro trong mạng lưới liên kết hydro tham gia vào việc giữ vững cấu trúc của lipase bị đứt gãy dẫn đến cấu trúc của enzyme bị biến đổi, làm cho cơ chất không liên kết được với enzyme và không bị chuyển hóa dưới tác dụng của enzyme. Nếu xử lý enzyme ở một nhiệt độ quá cao, các liên kết trong phân tử enzyme sẽ hoàn toàn bị phá hủy làm enzyme bị mất hoạt tính và lúc này khi đưa về nhiệt độ bình thường thì hoạt tính của nó không thể hồi phục lại được.

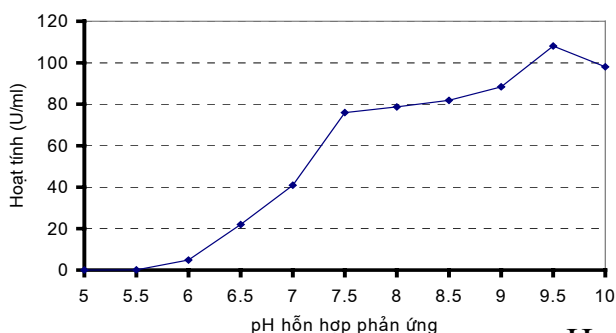
Thời gian ủ lipase càng lâu và nhiệt độ càng cao thì hoạt tính còn lại càng thấp. ở nhiệt độ 30°C, hoạt tính lipase giảm nhẹ cho tới 8 giờ (86%) và sau 24 giờ hoạt tính còn lại là 63% (hình 12). ở nhiệt độ 40 và 50°C, đồ thị hoạt tính - nhiệt độ tương tự nhau, chúng giảm mạnh đều cho tới 6 giờ ủ (32 và 34%), sau đó hoạt tính giảm nhẹ cho tới 24 giờ ủ (29 và 22%). Đối với nhiệt độ 60 và 70°C, đồ thị hoạt tính - nhiệt độ cũng tương tự nhau, chúng giảm rất nhanh chỉ sau 1 giờ ủ (31 và 20%) và sau đó giảm dần cho tới zero (70°C) và 17% (60°C). Kết quả này cho thấy độ bền của lipase phụ thuộc vào nhiệt độ và thời gian ủ.



**Hình 12.** ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ bền lipase. Nhiệt độ 30°C (◆); 40°C (■); 50°C (▲); 60°C (X); 70°C (●).

#### ◆ ảnh hưởng của pH đến hoạt tính

pH hỗn hợp phản ứng có ảnh hưởng rõ rệt đến hoạt tính enzyme vì nó liên quan đến mức độ ion hóa cơ chất và độ bền của lipase. Để tìm ra khoảng pH tối ưu cho hoạt tính lipase, xuất phát từ một số thông tin về pH tối ưu của một số chủng *Bacillus*, chúng tôi bắt đầu dò tìm pH từ 7,0 và đi dần về phía acid và kiềm.

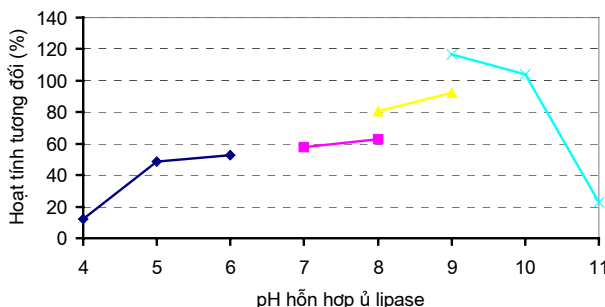


**Hình 13.** ảnh hưởng của pH đến hoạt tính lipase.

Hoạt tính lipase tỷ lệ thuận với độ tăng pH hỗn hợp phản ứng trong một khoảng pH giới hạn 5,0-9,5. ở pH 5,0, hoạt tính lipase là zero có nghĩa là lipase này không hoạt động trong môi trường acid. Hoạt tính tăng nhanh đều khi pH tăng lên 7,5 (76 U/ml). Hoạt tính bắt đầu tăng chậm khi pH đi từ 7,5 (76 U/ml) lên 9,5 (108 U/ml) và đạt cực đại tại pH 9,5. Hoạt tính giảm nhẹ ở pH 10,0 (98 U/ml). Dải pH cần thiết để cho lipase hoạt động là 7,5-9,5, một loại lipase ưa kiềm. Đặc tính này cùng với khả năng thủy phân tốt các loại dầu ăn khác nhau cho thấy đây là một loại enzyme rất thích hợp cho ngành công nghiệp sản xuất các chất tẩy rửa hoạt động ở một môi trường có tính kiềm cao.

#### ♦ ảnh hưởng của pH đến độ bền của lipase

Giống như nhiệt độ, pH cũng ảnh hưởng rõ rệt đến độ bền lipase. Khi ủ ở pH 4, hoạt tính lipase chỉ còn 12%, và khi ủ ở pH 5-7 hoạt tính còn lại một nửa (48-58%) (hình 14). Lipase giữ nguyên hoạt tính (92-117%) khi



ủ ở môi trường pH 9,0-10 (hình 14), nhưng khi môi trường quá kiềm (pH 11) hoạt tính còn lại chỉ 23%. Cùng một pH, nhưng trong các đệm khác nhau, hoạt tính còn lại cũng khác nhau (hình 14). Điều này cho thấy các ion

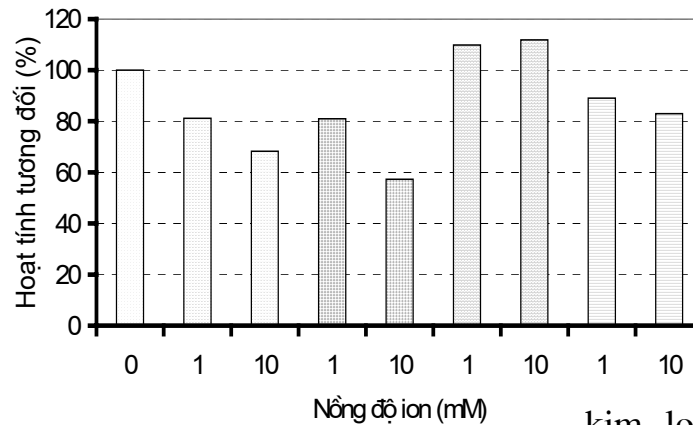
cũng ảnh hưởng tới độ bền lipase. Như vậy lipase có độ bền cao ở môi trường kiềm và thấp ở môi trường acid.

**Hình 14.** ảnh hưởng của pH đến độ bền lipase. Đệm acetate (♦); đệm phosphate (■); đệm Tris-HCl (▲); đệm glycine (X).

#### ♦ ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính

Theo nhiều tài liệu nghiên cứu về cấu trúc của lipase cho thấy lipase không phải là một enzyme kim loại. Tác động của kim loại đến lipase trong quá trình xúc tác phản ứng có thể theo nhiều cách khác nhau: (a) Tham gia vào việc giữ vững ổn định cấu dạng không gian cần thiết của phân tử lipase để đảm bảo việc thực hiện các phản ứng enzyme. (b) Có tác dụng làm tăng tốc độ phản ứng thông qua việc tạo thành phức với cơ chất. (c) Tham gia làm cầu nối kết hợp cơ chất với trung tâm hoạt tính của enzyme.

Kết quả cho thấy các ion kim loại hóa trị I, II và III đều ảnh hưởng đến hoạt tính của lipase.  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  làm giảm đáng kể hoạt tính của lipase (80-89% đối với 1 mM và 57-83% đối với 10 mM) trong khi đó  $Ca^{2+}$  lại có ảnh hưởng tích cực đến hoạt tính của lipase (tăng 10-12%) (hình 15).



**Hình 15.** ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt tính

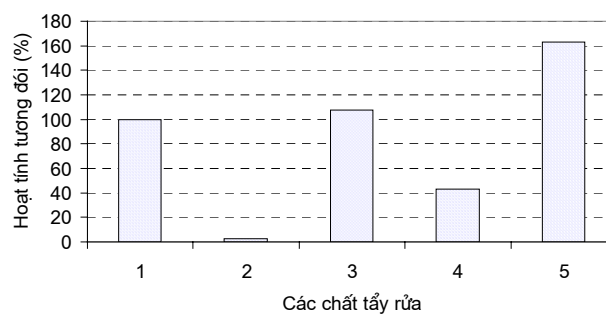
lipase. Cột gạch ngang: KCl; cột carô: MgCl<sub>2</sub>; cột xây gạch: CaCl<sub>2</sub>; cột thang: FeCl<sub>3</sub>.

#### ♦ ảnh hưởng của dung môi hữu cơ

Sự có mặt của dung môi hữu cơ 1% đã làm giảm hoạt tính lipase. Acetone, 2-propanol và ethanol giảm hoạt tính lipase một nửa, còn methanol giảm một phần tư

#### ♦ ảnh hưởng của chất tẩy rửa

Một số chất tẩy rửa có hoạt tính bề mặt như SDS, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 ảnh hưởng đến hoạt tính lipase. Triton X-100 tăng hoạt tính lipase lên 63% và Tween 20 giữ nguyên được hoạt tính lipase (107%), trong khi đó Tween 80 giảm một nửa, còn SDS thì ức chế lipase hoạt tính còn khoảng 3% (hình 17).



**Hình 17.** ảnh hưởng của chất tẩy rửa đến độ bền của lipase. 1: đối chứng. 2: SDS. 3: Tween 20. 4: Tween 80; 5: Triton X-100.

### **3.5. KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG LIPASE tảo *Candida rugosa***

#### **3.5.1. Khảo sát khả năng thủy phân dầu với lipase cố định**

Trong công nghiệp dược người ta thường sản xuất viên nang có chứa chất béo với chỉ số axit 80 – 100. Cũng như trong khẩu phần thức ăn kiêng của những bệnh nhân nhiễm mỡ trong máu nếu sử dụng các loại dầu ăn thực vật đã được thủy phân sơ bộ chỉ số axit tăng đến 80 – 100 thì sẽ làm giảm hàm lượng mỡ trong máu. Do vậy chúng tôi nghiên cứu khảo sát khả năng thủy phân dầu đậu nành của lipase cố định.

Do lipase chỉ có khả năng thủy phân dầu trên bề mặt liên pha vì vậy chúng tôi tiến hành khảo sát sự thủy phân dầu ăn bằng cách cho hỗn hợp dầu: nước với các tỷ lệ khác nhau 1:1, 2:1, 1:2 chảy qua cột có chứa enzym cố định 2 lần với tốc độ chảy 15 giọt/phút ở nhiệt độ phòng và có bổ sung  $\text{CaCl}_2$  5mM 2%. Sau đó xác định chỉ số axit của dầu sau khi thực hiện phản ứng thủy phân. Kết quả khảo sát thể hiện ở bảng 21

**Bảng 21.** Ảnh hưởng tỷ lệ dầu: nước đến khả năng thủy phân dầu của lipase

| Tỷ lệ dầu: nước | Chỉ số axit  |              |
|-----------------|--------------|--------------|
|                 | Lần 1        | Lần 2        |
| 1:1             | 40,32        | 60,14        |
| <b>2:1</b>      | <b>61,30</b> | <b>82,50</b> |
| 1:2             | 50,49        | 70,14        |

Kết quả bảng 21 cho thấy với tỷ lệ dầu: nước là 2:1 khả năng thủy phân của lipase là tốt nhất cho chỉ số axit là 82,5. Nên chúng tôi sẽ sử dụng điều kiện này cho thủy phân với lượng dầu lớn hơn sau này.

### 3.5.2. Khảo sát khả năng sử dụng lipase tan trong sản xuất phomat

Trong quá trình sản xuất phomat từ sữa tươi, ở giai đoạn lên men đông tụ phomat người ta sử dụng renin và một số proteaza axit tính hoặc kiềm tính làm tác nhân đông tụ sữa. Trong giai đoạn ủ chín có thể bổ sung lipase nhằm làm tăng hương vị đặc trưng cho phomat.

Để khảo sát khả năng sử dụng lipase trong quá trình sản xuất phomat, tiến hành thí nghiệm trên 2 mẫu. Mẫu 1: sản xuất phomat có bổ sung 50% renin + 50% proteaza đông tụ sữa. Mẫu 2: sản xuất phomat bổ sung 50% renin + 50% proteaza + 0,001% lipase.

Cả 2 mẫu được ủ chín ở nhiệt độ 4 – 10°C trong 6 tuần. Sau đó đánh giá chất lượng bằng phương pháp cảm quan.

Đánh giá bằng phiếu cho điểm (thang điểm 10) theo các chỉ tiêu chất lượng phomat. Kết quả biểu diễn ở bảng 22

**Bảng 22:** *Kết quả đánh giá chất lượng phomat bằng phương pháp cảm quan*

| <i>Chỉ tiêu</i>     | Điểm                       |                      |
|---------------------|----------------------------|----------------------|
|                     | Mẫu 1<br>(Không có lipase) | Mẫu 2<br>(có lipase) |
| Màu sắc             | 1,14                       | 2,21                 |
| Mùi kem             | 4,64                       | 5,92                 |
| Mùi chua            | 5,85                       | 4,57                 |
| Mùi ôi              | 3,28                       | 1,71                 |
| Mùi bơ              | 3,64                       | 5,00                 |
| Mùi lactic          | 4,00                       | 5,50                 |
| Mùi lạ              | 1,00                       | 0,35                 |
| Vị ngọt             | 4,07                       | 5,78                 |
| Vị chua             | 5,57                       | 5,35                 |
| Vị đắng             | 2,14                       | 1,42                 |
| Vị mặn              | 7,78                       | 6,85                 |
| Độ chắc             | 4,00                       | 5,92                 |
| Độ tan              | 5,85                       | 4,21                 |
| Độ mịn              | 5,78                       | 5,28                 |
| Độ dính             | 5,28                       | 5,42                 |
| Cảm giác béo        | 5,00                       | 6,28                 |
| Chất lượng tổng hợp | 6,42                       | 7,85                 |

Kết quả đánh giá cảm quan các chỉ tiêu của sản phẩm phomat có và không bổ sung lipase cho thấy các chỉ tiêu của sản phẩm phomat có sử dụng lipase đều tốt hơn cả về màu sắc và hương vị so với phomat không bổ sung lipase.

## KẾT LUẬN

- Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sinh tổng hợp lipase từ *Candida rugosa* cho một lít là:

Môi trường nuôi gồm:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 15 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 5,5 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 4g;  $\text{MgSO}_4$ : 1g;  $\text{FeCl}_3$ : 10mg; inositol: 0,004mg; biotin: 0,008mg; Thiamine.HCl: 0,2mg; Dầu oliu: 1%; axit palmitic: 1.2 g;  $\text{H}_2\text{O}$ : 1000ml;

Số tế bào nấm men cấy ban đầu:  $2,6 \cdot 10^6$  tb/ml canh trường;

Thời gian nuôi: 40 giờ

- Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sinh tổng hợp lipase từ *Bacillus sp* là: môi trường BMGY với thành phần: (1% (w/v) cao nấm men, 2% (w/v) bacto-peptone, 100 mM kali phosphate, pH 7.0,  $4 \times 10^{-5}$ % (w/v) biotin và 1% (v/v) methanol) ở 30°C lắc 220 vòng/phút
- Nồng độ cồn thích hợp cho kết tủa thu lipase là 90%. Lipase sau kết tủa cồn cho chạy sắc ký trên sắc ký đồ cho thấy lipase sau khi qua cột trao đổi ion DEAE - cellulose xuất hiện 3 pick. Tiến hành xác định hoạt độ lipase ở các phân đoạn. Kết quả cho thấy chỉ có pick 1 và pick 3 có hoạt tính lipase (69UI/ml và 77UI/ml) vậy Lip1 và Lip3 có khối lượng phân tử là 58 và 62 kDa. Lipase sau các bước làm sạch: kết tủa etanol, sắc ký trao đổi ion DEAE – Cellulose thu được chế phẩm có hoạt độ riêng 55,16 U/mg protein, mức độ tinh sạch là 12,5 lần; hiệu suất thu hồi là 37,06%.
- Điều kiện tối ưu để cố định lipase trên Nylon-6 đó là: nồng độ HCl thích hợp cho hoạt hóa, chất mang là 3,5N; glutaraldehyt là 10%, nồng độ lipase đem cố định là 1mg/ml (550U/ml); sử dụng dung dịch đệm phosphat pH 7,7.
- Một số đặc tính của lipase cố định trên Nylon-6

- Nhiệt độ tối ưu là 70°C, bền ở vùng nhiệt độ 40 - 60°C, sau 18 giờ hoạt độ còn lại là 52,4 – 66,7%.
- pH tối ưu là 7,0; bền ở vùng pH 7 - 7,5; sau 18 giờ hoạt độ còn 50,6 - 57%.
- Một số đặc tính của lipase tan từ *Candida rugosa*
  - Nhiệt độ tối ưu là 60°C, bền ở vùng nhiệt độ 40 - 50°C, sau 18 giờ hoạt độ còn lại là 50,2 - 59%.
  - pH tối ưu là 8,0; bền ở vùng pH 7,5 - 8,0, sau 18 giờ hoạt độ còn 53,9 - 62%.
  - Điểm đẳng điện của lipase là  $pI = 7,5$
  - Ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt tính của lipase:
    - Ion  $Pb^{2+}$  ức chế mạnh (làm giảm hoạt độ tới 33,26%)
    - Các ion  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$  ức chế yếu (làm giảm hoạt tính 13%)
    - Các ion  $Na^+$ ,  $K^+$  không ảnh hưởng.
    - Các ion  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  có khả năng hoạt hoá lipase.
- Một số đặc tính lipase từ *Bacillus sp*
  - ♦ Tính đặc hiệu cơ chất đối với tributyrin là cao nhất: 101 U/ml.
  - ♦ Nhiệt độ tối ưu là 70°C (91,1 U/ml).
  - ♦ Lipase có độ bền nhiệt, sau 24 giờ hoạt tính vẫn còn 63%.
  - ♦ pH 9,5 là thích hợp nhất cho phản ứng, hoạt tính đạt 108,1 U/ml.
  - ♦ pH 9,0 đệm Tris-HCl và pH 10,0 đệm glycine không ảnh hưởng tới độ bền của lipase, hoạt tính còn lại vẫn đạt 117%.
  - ♦  $Ca^{2+}$  tăng hoạt tính lipase lên 10-12%, ngược lại  $K^{1+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  giảm hoạt tính lipase từ 11-42%.
  - ♦ Các dung môi hữu cơ đều giảm hoạt tính lipase. Acetone, 2-propanol và ethanol giảm một nửa, methanol giảm một phần tư.

Các chất tẩy ảnh hưởng lên hoạt tính lipase. Triton X-100 tăng hoạt tính lên 63%. Tween 20 giữ nguyên hoạt tính (107%). Tween 80 giảm một nửa. Còn SDS kìm hãm hoạt tính lipase 3%.

- Đã khảo sát khả năng ứng dụng của lipase trong công nghiệp dược, thực phẩm:

- Tỷ lệ dầu nước là 2:1, tốc độ chảy là 15 giọt/ phút, nồng độ lipase 10U/ml dầu, nhiệt độ phòng, thu được dầu đậu nành có chỉ số axit 80,5.
- Với hàm lượng lipase là 0,001% bổ sung vào quá trình sản xuất phomat thu được các chỉ tiêu chất lượng sản phẩm tốt hơn sản phẩm phomat không bổ sung lipase cả màu sắc và hương vị.