



## LY TRÍCH ENZYME AMYLASE VÀ PROTEASE TỪ TUYẾN TUY CỦA GÀ

Nguyễn Minh Chơn<sup>1</sup> và Nguyễn Phạm Tuấn<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh An Giang

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/9/2014

Ngày chấp nhận: 07/11/2014

### Title:

Extracting amylase and protease from chicken pancreas

### Từ khóa:

Amylase, protease, SDS-PAGE và tụy gà

### Keywords:

Amylase, chicken pancreas, protease and SDS-PAGE

### ABSTRACT

Chicken pancreas, which is an organ involved in many digestion processes, is one of the by-products utilized to extract enzymes. In Vietnam, the amylase and protease, have been applied in many different areas, but these enzymes must be imported from foreign countries with rather high price. This study was carried out to aim at finding out usable extractive methods of amylase and protease from chicken pancreas. The results showed that enzyme extraction method using phosphate buffer solution with pH 7 and precipitated protein by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  of 60% saturation, then dialyzed and freeze-dried obtained the most effectively extracted enzyme. Amylase which was extracted from the chicken pancreas worked well at 50°C and pH 7.5. The addition of 0.1% NaCl and 0.05%  $\text{CaCl}_2$  increased the activity of amylase. Protease was extracted from the chicken pancreas worked well at 50°C and pH 7.6. The addition of cysteine 0.01% and 0.1 ppm  $\text{CaCl}_2$  increased protease activity. SDS-PAGE analysis showed the presence of the enzyme  $\alpha$  amylase, trypsin and chymotrypsin in the extracted protein samples. After 90 days storage at -20°C, the enzyme products still maintained their catalytic activities.

### TÓM TẮT

Tụy gà là một cơ quan tham gia nhiều vào quá trình tiêu hóa và là nguồn phụ phẩm có thể tận dụng để ly trích enzyme. Ở Việt Nam, các loại enzyme amylase và protease đã được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Hiện nay, enzyme vẫn phải được nhập từ nước ngoài với giá thành tương đối cao. Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục đích tìm ra phương pháp hiệu quả để ly trích enzyme amylase và protease từ tụy gà. Kết quả cho thấy phương pháp ly trích enzyme bằng dung dịch đệm phosphate có pH 7 rồi kết tủa protein bằng  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60% bão hòa, sau đó đem đi thẩm tích và đông khô chân không đã cho hiệu quả ly trích enzyme tốt nhất. Amylase được trích từ tụy gà hoạt động tốt ở nhiệt độ 50°C với pH 7,5. Việc thêm NaCl 0,1% và  $\text{CaCl}_2$  0,05% đều làm tăng hoạt tính của amylase. Protease được trích từ tụy gà hoạt động tốt ở nhiệt độ 50°C với pH 7,6. Việc thêm cysteine 0,01% và  $\text{CaCl}_2$  0,1 ppm đã làm tăng hoạt tính protease. Phân tích điện di SDS-PAGE cho thấy sự hiện diện của enzyme amylase, trypsin và chymotrypsin trong mẫu protein trích được. Sản phẩm sau khi bảo quản 90 ngày ở -20°C vẫn duy trì hoạt tính xúc tác.

## 1 GIỚI THIỆU

Công nghệ enzyme là một ngành quan trọng trong lĩnh vực công nghệ sinh học bên cạnh các lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật, động vật, vi sinh vật,... Enzyme là chất xúc tác sinh học không những xúc tác cho các phản ứng xảy ra trong cơ thể sống, mà sau khi tách khỏi hệ thống sống, ở những điều kiện nhất định chúng vẫn giữ được hoạt tính xúc tác (Phạm Thị Trần Châu và Phan Tuấn Nghĩa, 2007). Vì vậy, việc nghiên cứu và ứng dụng các sản phẩm của enzyme đã được nhiều nước triển khai, phát triển và đã đem lại lợi nhuận rất lớn cho nhiều quốc gia. Ở Việt Nam, công nghệ enzyme đã được nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực nhưng chưa thật sự phát triển. Các sản phẩm thương mại của enzyme hiện nay vẫn phải nhập nội vào Việt Nam với giá thành rất cao. Enzyme amylase và protease là nhóm enzyme được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như công nghệ sản xuất rượu bia, công nghệ thực phẩm, y học... Vai trò chính của amylase và protease là thủy phân hồ tinh bột và thủy phân liên kết peptide trong protein. Những enzyme này được trích từ các nguồn động, thực vật và vi sinh vật, vừa mang nguồn gốc tự nhiên vừa không độc với con người nên rất được ưa chuộng và ngày càng được sử dụng rộng rãi. Hằng ngày, các lò giết mổ gia cầm thải ra nhiều phụ phế phẩm của gà cần được xử lý hoặc chế biến tiếp, để tránh ô nhiễm môi trường. Phụ phẩm của gà, đặc biệt là tuyến tụy gà, là một trong những cơ quan tiêu hóa quan trọng chứa nhiều enzyme tiêu hóa tinh bột và protein (Nguyễn Thị Kim Đông và Nguyễn Văn Thu, 2009). Trong nội dung nghiên cứu này, phụ phế phẩm từ tụy gà đã được dùng để ly trích enzyme nhằm tạo ra nguồn sản phẩm enzyme dồi dào và làm tăng giá trị phụ phế phẩm từ gà.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

– Nguyên liệu chính được dùng trong thí nghiệm là tụy gà được lấy từ lò giết mổ gia cầm Ngọc Xuân ở Thành phố Cần Thơ và được ướp lạnh để giữ hoạt tính của enzyme.

– Các thiết bị chính đã dùng là máy ly tâm lạnh (Rotanta 460 - Hettich) và máy đông khô chân không (Virtis) được dùng trong quá trình ly trích enzyme. Máy đo quang phổ (Thermo - Spectronic Helios) được dùng để phân tích mẫu và thử hoạt tính của enzyme.

– Vật tư và hóa chất được dùng trong nghiên cứu là túi thẩm tích seamless cellulose tubing 36/32 để làm sạch mẫu ly trích được. Các hóa chất chính được dùng để ly trích enzyme, đánh giá hoạt tính của enzyme và phân tích điện di SDS-PAGE gồm dung dịch đệm phosphate (pH 7), muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , cồn 96%, bovine serum albumin (BSA), tyrosine, hồ tinh bột, trichloroacetic acid (TCA), thuốc thử Folin - phenol, casein 0,2%, beta-mercaptoethanol, cysteine,...

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Hiệu quả của các phương pháp ly trích enzyme amylase và protease từ tụy

Mục đích: tìm phương pháp thích hợp để ly trích enzyme amylase và protease từ tụy gà.

Nguyên liệu được nghiền với dung dịch đệm phosphate pH 7 (4°C) theo tỉ lệ nguyên liệu và dung dịch đệm phosphate pH 7 (1: 2 w/v) để trích enzyme. Hỗn hợp được ly tâm với tốc độ 9.500 rpm ở nhiệt độ là 4°C trong 30 phút để lấy phần dung dịch ở bên trên và loại bỏ phần bên dưới ống ly tâm. Sau đó, dung dịch chứa enzyme sẽ được trích bằng ba phương pháp khác nhau.

*Phương pháp ly trích enzyme bằng dung dịch đệm phosphate pH 7 (Phương pháp 1):* Phần hỗn hợp sau khi được trích với dung dịch đệm phosphate pH 7 sẽ được ly tâm với tốc độ 9.500 rpm rồi được đem đông khô và trữ ở -20°C.

*Phương pháp ly trích enzyme bằng dung dịch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60% bão hòa (Phương pháp 2):* Hỗn hợp thu được sau khi trích với dung dịch đệm phosphate pH 7 và ly tâm sẽ được kết tủa bằng dung dịch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60% bão hòa. Phần kết tủa thu được sẽ được đem đi ly tâm ở 4°C với tốc độ 11.500 rpm trong 30 phút. Hỗn hợp thu được bên dưới ống ly tâm sẽ được đem đi thẩm tích bằng túi seamless cellulose tubing 36/32. Sau khi thẩm tích, mẫu được đông khô và trữ ở -20°C.

*Phương pháp ly trích enzyme bằng cồn 96% (Phương pháp 3):* Hỗn hợp thu được sau khi trích với dung dịch đệm phosphate pH 7, sẽ được kết tủa với cồn 96% theo tỉ lệ dung dịch và cồn (1: 4 v/v). Sau đó, hỗn hợp được ly tâm ở 11.500 rpm trong 30 phút với nhiệt độ là 4°C. Mẫu thu được đem đi đông khô và trữ ở -20°C.

*Xác định hàm lượng protein* (Nguyễn Đức Lượng và Cao Cường, 2003).

Nguyên tắc: Dựa vào phản ứng màu của protein với thuốc thử Folin-phenol tạo thành phức chất có màu xanh dương, hấp thụ ánh sáng ở bước sóng

750 nm. Cường độ màu của dung dịch tỷ lệ thuận với nồng độ protein. Dựa vào đường chuẩn xác định nồng độ protein.

*Xác định hoạt lực amylase bằng phản ứng thủy phân hồ tinh bột* (Rukhliadeva, 1982).

Nguyên tắc: Enzyme amylase có khả năng thủy phân tinh bột tạo thành các dextrin. Khi cho tác dụng với iode, phần cơ chất tinh bột còn lại sẽ tạo màu. Đo cường độ màu tạo thành ở bước sóng 570 nm dựa vào đường chuẩn tinh bột sẽ tính được nồng độ tinh bột còn lại sau phản ứng, từ đó suy ra được hoạt tính của enzyme amylase. Sử dụng cơ chất là hồ tinh bột có nồng độ 1%.

*Xác định hoạt lực protease theo phương pháp Anson cải tiến* (Nguyễn Đức Lượng và Cao Cường, 2003).

Nguyên tắc: Phương pháp này dựa trên cơ sở xác định lượng tyrosine sinh ra trong quá trình thủy phân bởi protease và cho phản ứng tạo màu với thuốc thử Folin. Đo độ hấp thụ của phức màu được tạo ra ở bước sóng 750 nm. Dựa vào đường chuẩn tyrosine để kiểm tra hoạt tính của protease. Cơ chất được sử dụng là casein 0,2%.

*Xác định enzyme trong mẫu bằng phương pháp điện di SDS-PAGE* (Harlow và Lane 1988).

Phân tích điện di SDS-PAGE theo phương pháp của Harlow và Lane (1988). Phân tích điện di dùng để xác định trọng lượng phân tử của protein dựa trên thang chuẩn protein của công ty Novagen (15 - 150 kDa).

### 2.2.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt tính của enzyme amylase và protease

Mục đích: Tìm ra khoảng nhiệt độ và pH tối ưu thích hợp để làm tăng hoạt tính xúc tác của enzyme amylase và protease từ tụy gà.

Xác định hoạt tính enzyme amylase tương tự thí nghiệm 1 ở 6 mức nhiệt độ từ 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C và 80°C và 8 mức pH từ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 và 10. Tương tự thí nghiệm với enzyme amylase, hoạt tính enzyme protease được thực hiện ở 6 mức nhiệt độ từ 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C và 80°C và 6 mức pH từ 5, 6, 7, 8, 9 và 10.

Hoạt tính enzyme amylase và protease được xác định tương tự thí nghiệm 1 theo phương pháp của Rukhliadeva (1982) và Nguyễn Đức Lượng và Cao Cường (2003).

### 2.2.3 Ảnh hưởng của chất hoạt hóa lên hoạt tính của enzyme amylase và protease

Mục đích: tìm ra khoảng nồng độ chất hoạt hóa thích hợp nhất để làm tăng hoạt tính xúc tác của các enzyme.

Chất hoạt hóa được sử dụng đối với enzyme amylase là NaCl và CaCl<sub>2</sub> tương ứng với các mức nồng độ: 0%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5% và 1%. Khảo sát ảnh hưởng được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ và pH tối ưu (ở mục 2.2.2). Phản ứng thủy phân được thực hiện bằng cách lần lượt cho vào ống nghiệm 680 μL dung dịch pH tối ưu và 470 μL dung dịch chất hoạt hóa với nồng độ tương ứng dùng để khảo sát, thêm vào 200 μL hồ tinh bột nồng độ 1%.

Chất hoạt hóa được sử dụng đối với enzyme protease là cysteine và CaCl<sub>2</sub> với các nồng độ (%): 0%, 0,00001%, 0,005%, 0,01%, 0,05% và 0,1%. Phản ứng thủy phân casein được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ và pH tối ưu. Casein được sử dụng ở 0,2%. Dung dịch cysteine và CaCl<sub>2</sub> (từ nồng độ 0,00001% đến 0,1%) được pha trong môi trường pH tối ưu ở thí nghiệm 2. Hỗn hợp enzyme protease ly trích được hòa tan trong dung dịch cysteine và CaCl<sub>2</sub> tương ứng với các nồng độ từ 0,00001 % đến 0,1%.

Hoạt tính enzyme amylase và protease được xác định tương tự theo phương pháp của Rukhliadeva (1982), Nguyễn Đức Lượng và Cao Cường (2003) (ở mục 2.2.1).

### 2.2.4 Ảnh hưởng của thời gian tồn trữ lên hoạt tính của enzyme amylase và protease

Mục đích: nhằm đánh giá hoạt tính của enzyme amylase và protease khi bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Mẫu enzyme tồn trữ được đem thử hoạt tính sau một thời gian bảo quản để đánh giá khả năng sử dụng của nó trong tương lai.

## 2.3 Phương pháp thống kê

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và thống kê bằng phần mềm Statgraphic plus 4.0. Các giá trị trung bình được kiểm định bằng phép thử LSD hoặc phép thử Duncan.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Hiệu quả các phương pháp ly trích enzyme amylase và protease từ tụy gà

Sau khi ly trích enzyme từ tuyến tụy bằng 3 phương pháp khác nhau (bằng dung dịch đệm phosphate pH 7, kết tủa bằng dung dịch (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60% bão hòa và kết tủa bằng cồn 96%), thu được

hỗn hợp enzyme, tiến hành đông khô mẫu bằng máy đông khô chân không (Virtis, Anh) và bảo quản các mẫu enzyme ở điều kiện nhiệt độ -20°C. Quá trình ly trích được thực hiện với lượng nguyên liệu ban đầu cho mỗi phương pháp là 250 g tuyến tụy của gà. Kết quả cho thấy, hiệu suất thu hồi sản phẩm từ phương pháp 1 là lớn nhất đạt 15,2% (38 g/250 g nguyên liệu ban đầu), hiệu suất thu hồi sản phẩm từ phương pháp 2 là 4,29% (10,74 g) và phương pháp 3 là 5,79% (14,48 g) (Bảng 1). Nguyên nhân là do phương pháp 2 và phương pháp 3 có dùng chất gây kết tủa protein là  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nên lượng protein thu được nhiều hơn nhưng đã loại ra các thành phần khác nên hiệu suất thu hồi chung thấp hơn so với phương pháp trích bằng dung dịch đệm phosphate pH 7 (không qua giai đoạn kết tủa protein). Ở phương pháp 2 (kết tủa bằng muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), qua giai đoạn thẩm tích loại muối nên hiệu suất thu hồi thấp hơn phương pháp 3 (kết tủa bằng cồn) không qua giai đoạn thẩm tích.

Tiến hành xác định hàm lượng protein và đánh giá hoạt tính của enzyme trích được bằng các phương pháp khác nhau. Hàm lượng protein và hoạt tính của enzyme protease được xác định theo

phương pháp Anson cải tiến (Nguyễn Đức Lượng và Cao Cường, 2003). Hoạt tính của enzyme amylase được xác định bằng phản ứng thủy phân hồ tinh bột (Rukhliadeva, 1982). Kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Hàm lượng protein hòa tan giữa các phương pháp ly trích khác nhau và có sự khác biệt thống kê giữa các phương pháp ở mức ý nghĩa 1% theo phép thử LSD. Kết quả cho thấy, hàm lượng protein thu được cao nhất ở phương pháp 3 (kết tủa bằng cồn) là 37,3 mg, hàm lượng protein thu được ở phương pháp 2 (kết tủa bằng muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) là 33,5 mg và hàm lượng protein thu được thấp nhất ở phương pháp 1 (trích bằng dung dịch đệm phosphate pH 7) là 24,3 mg. Phương pháp 2 và 3 có thực hiện kết tủa protein nên tỉ lệ protein thu được trong mẫu nhiều do đó hàm lượng protein hòa tan cao hơn phương pháp 1 (không qua giai đoạn kết tủa protein nên còn lẫn nhiều tạp chất). Ở mẫu trích protein sử dụng cồn 96% thì khả năng loại bỏ vô hydrate hóa của phân tử protein mạnh hơn so với muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nên làm tủa protein nhiều hơn và không qua giai đoạn thẩm tích loại muối nên hàm lượng protein hòa tan cao hơn.

**Bảng 1: Khối lượng mẫu, hàm lượng protein, hoạt tính amylase và protease từ tụy gà qua các phương pháp trích**

Chỉ tiêu	Phương pháp 1	Phương pháp 2	Phương pháp 3	F	CV (%)
Nguyên liệu (g)	250,0	250,0	250,0		
Sau đông khô (g)	38,00	10,74	14,48		
Hiệu suất (%)	15,20	4,29	5,79		
Hàm lượng protein (mg/100g)	24,3 <sup>c</sup>	33,5 <sup>b</sup>	37,3 <sup>a</sup>	**	0,85
Hoạt tính amylase (%)	42,76 <sup>b</sup>	52,1 <sup>a</sup>	52,72 <sup>a</sup>	**	0,64
Hoạt tính protease (UI)	0,107 <sup>c</sup>	0,156 <sup>a</sup>	0,140 <sup>b</sup>	**	2,17

\*\* : khác biệt có ý nghĩa 1% theo phép thử LSD. Trong cùng một hàng, các số trung bình có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử LSD

- Phương pháp 1: Ly trích enzyme bằng dung dịch đệm phosphate pH 7 rồi đông khô mẫu
- Phương pháp 2: Sau khi trích enzyme, mẫu được kết tủa bằng dung dịch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60% bão hòa
- Phương pháp 3: Sau khi trích enzyme, mẫu được kết tủa bằng cồn 96%

Kết quả thử hoạt tính cho thấy rằng, hỗn hợp enzyme trích từ các phương pháp khác nhau có khả năng thủy phân hồ tinh bột và casein. Điều này chứng tỏ, hỗn hợp enzyme trích được có sự hiện diện của hai enzyme amylase và protease (Bảng 1). Hoạt tính enzyme amylase và protease từ tuyến tụy gà của các phương pháp trích có sự khác biệt thống kê ở mức 1% qua phép thử LSD. Hoạt tính của enzyme amylase được thể hiện qua phân trăm tinh bột thủy phân sau 1 phút. Enzyme trích từ phương pháp 3 (kết tủa bằng cồn) và phương pháp 2 (kết tủa bằng muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) cho hiệu quả tương đương nhau với 52,11% đến 52,72% tinh bột được

thủy phân trong 1 phút. Enzyme trích từ phương pháp 1 (trích bằng dung dịch đệm phosphate pH 7) cho hiệu quả thủy phân là 42,76% tinh bột thủy phân trong 1 phút. Kết quả này thấp hơn so với phương pháp 2 và 3 (Bảng 1). Hoạt tính của enzyme protease cao nhất thu được ở phương pháp trích thứ 2 với lượng tyrosine sinh ra là 0,156 UI, lượng tyrosine sinh ra ở phương pháp 3 là 0,140 UI và lượng tyrosine sinh ra phương pháp 1 là 0,107 UI. Tóm lại, phương pháp ly trích enzyme từ tụy gà bằng dung dịch đệm phosphate pH 7 có sử dụng kết tủa protein bằng muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và kết tủa bằng cồn đã cho hiệu quả tốt hơn việc không thực



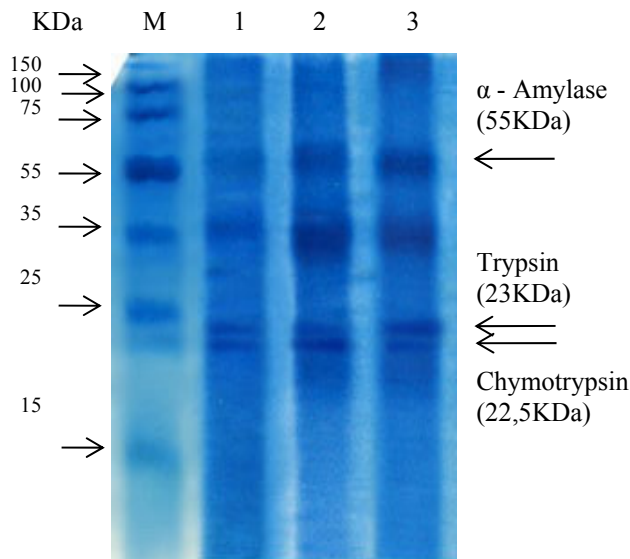
hiện kết tủa (phương pháp trích bằng dung dịch đệm phosphate pH 7). Hàm lượng protein thu được, hoạt tính của enzyme amylase và protease trong hai phương pháp trích này đều cao hơn so với phương pháp trích bằng dung dịch đệm phosphate pH 7.

*Kết quả phân tích điện di SDS-PAGE*

Qua kết quả thử hoạt tính enzyme amylase và protease từ tuyến tụy của gà bằng phương pháp thủy phân hồ tinh bột (Rukhliadeva, 1982) và khảo sát hàm lượng tyrosine sinh ra (Nguyễn Đức Lượng và Cao Cường, 2003), bước đầu cho thấy hỗn hợp trích từ tuyến tụy của gà có sự hiện diện của hai enzyme. Để xác định chính xác sự hiện diện của hai enzyme trong hỗn hợp trích được, tiến hành phân tích điện di SDS-PAGE. Kết quả phân tích điện di SDS-PAGE được thể hiện ở Hình 1 cho thấy rằng, hỗn hợp enzyme trích từ 3 phương pháp có sự hiện diện của 3 vạch tương ứng với trọng lượng phân tử khoảng 22,5 kDa, 23 kDa và 55 kDa. Theo Nguyễn Đức Lượng và *ctv.* (2004)

thì enzyme chymotrypsin và trypsin có trọng lượng phân tử tương ứng là 22,5 kDa và 23 kDa. Tương tự, Desseaux *et al.* (1991) cho rằng enzyme  $\alpha$  - amylase có trọng lượng phân tử khoảng 55 kDa. Bên cạnh đó, nhiều tác giả cho rằng trong tuyến tụy của gà chứa nhiều enzyme như amylase, trypsin, chymotrypsin, nuclease, ribonuclease, amylopsin, esterase, dipeptidase, collagenase, aminopeptidase, lipase (Ensminger, 1992; Dương Thanh Liêm, 2003; Nguyễn Đức Lượng và *ctv.*, 2004; Nguyễn Thị Kim Đông và Nguyễn Văn Thu, 2009). Điều này chứng tỏ rằng hỗn hợp enzyme trích được từ tụy gà bằng 3 phương pháp khác nhau có sự hiện diện của enzyme amylase, chymotrypsin và trypsin.

Qua kết quả thử hoạt tính của enzyme amyalse, protease và phân tích điện di SDS-PAGE cho thấy, hỗn hợp enzyme trích từ tụy gà chứa enzyme  $\alpha$  - amylase và protease, gồm hai enzyme trypsin và chymotrypsin.



**Hình 1: Kết quả phân tích điện di SDS-PAGE**

*M: marker chuẩn; Giếng 1: mẫu protein của phương pháp 1  
Giếng 2: Mẫu protein của phương pháp 2; Giếng 3: Mẫu protein của phương pháp 3*

**3.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt tính của enzyme protease và amylase**

Nhiệt độ ảnh hưởng rất lớn đến khả năng xúc tác của enzyme. Tốc độ của phản ứng do enzyme xúc tác tăng tỷ lệ thuận với nhiệt độ trong một giới hạn nhất định. Nhiệt độ tương ứng với tốc độ phản ứng của enzyme cao nhất gọi là nhiệt độ tối ưu.

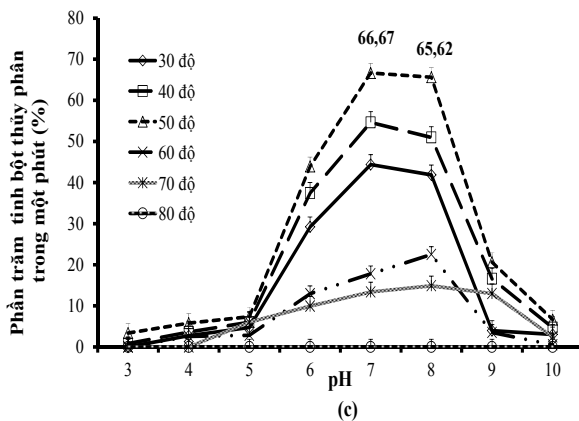
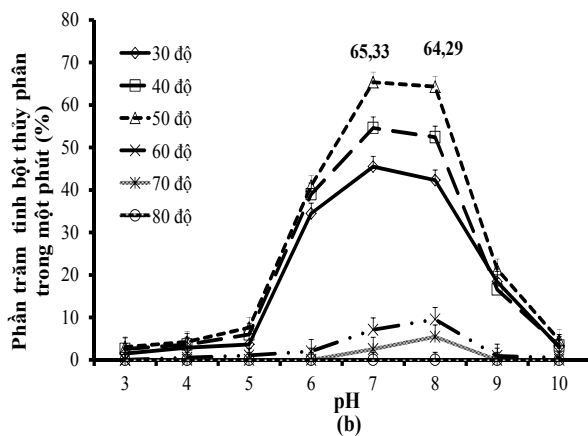
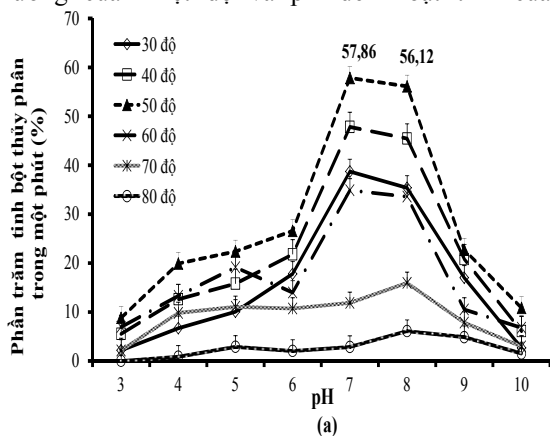
Phần lớn enzyme hoạt động mạnh nhất ở 40°C - 50°C. Nhiệt độ tối ưu của những enzyme khác nhau hoàn toàn khác nhau. Một số enzyme có nhiệt độ phản ứng tối ưu ở 60°C, một số khác lại có nhiệt độ tối ưu ở 70°C, thậm chí là 90°C. Nhiệt độ tối ưu của một enzyme phụ thuộc rất nhiều vào sự có mặt của các cơ chất, kim loại, pH và các chất bảo vệ. pH có phản ứng rất mạnh đến phản ứng của

enzyme. pH môi trường thường ảnh hưởng đến mức độ ion hóa cơ chất, đến enzyme và đặc biệt ảnh hưởng đến độ bền của enzyme. Nhiều enzyme hoạt động rất mạnh ở pH trung tính. Tuy nhiên, cũng có nhiều enzyme hoạt động ở pH acid yếu. pH tương ứng với tốc độ phản ứng của enzyme cao nhất gọi là pH tối ưu. Nhiệt độ và pH của môi trường ảnh hưởng lớn đến hoạt động xúc tác của enzyme vì nó ảnh hưởng đến mức độ ion hóa cơ chất, mức độ ion hóa enzyme, do đó ảnh hưởng đến sự tạo phức hợp enzyme - cơ chất (Nguyễn Đức Lượng và *ctv.*, 2004). Vì vậy, việc xác định nhiệt độ và pH tối ưu của enzyme là cần thiết để thực hiện các phản ứng đạt hiệu quả cao hơn. Hoạt động xúc tác của enzyme amylase được khảo sát ở 8 mức pH khác nhau (pH 3 đến pH 10) và 6 mức nhiệt độ (30°C - 80°C). Tương tự enzyme amylase, hoạt động xúc tác của enzyme protease được khảo sát ở 6 mức pH khác nhau (pH 5 đến pH 10) và 6 mức nhiệt độ (30°C - 80°C). Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt tính của

enzyme amylase và protease từ 3 phương pháp trích được thể hiện ở các Hình 2, 3, 4 và 5.

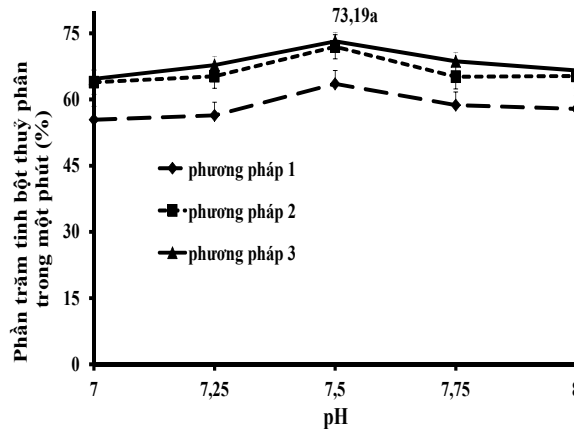
3.2.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt tính của enzyme amylase

Hoạt tính enzyme amylase thể hiện cao nhất ở điều kiện nhiệt độ là 50°C và trong vùng pH 7 đến pH 8 và khác biệt thống kê ý nghĩa ở mức 1% giữa các phương pháp. Ở điều kiện pH 7, phần trăm tinh bột bị thủy phân trong 1 phút ở 3 phương pháp lần lượt là 57,86% (phương pháp 1), 65,33% (phương pháp 2) và 66,67% (phương pháp 3). Khi tăng pH lớn hơn 7, hoạt tính của enzyme có khuynh hướng giảm đi. Khi tăng nhiệt độ cao hơn 50°C và pH > 8, hoạt tính amylase trong các mẫu giảm dần (Hình 2a, b và c). Ở mức pH thấp từ 3 - 5 và pH cao từ 9-10, enzyme amylase có hoạt tính yếu biểu hiện qua lượng tinh bột bị thủy phân rất ít (Bernfeld, 1951). Như vậy, hoạt tính enzyme amylase từ ba phương pháp trích hoạt động tối ưu trong điều kiện nhiệt độ là 50°C và pH 7 đến pH 8.



Hình 2: Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính amylase trích được từ tụy của gà

- Phương pháp 1: Ly trích enzyme bằng dung dịch đệm phosphate pH 7 rồi đông khô mẫu (a)
- Phương pháp 2: Sau khi trích enzyme, mẫu được kết tủa bằng dung dịch  $(NH_4)_2SO_4$  60% bão hòa (b)
- Phương pháp 3: Sau khi trích enzyme, mẫu được kết tủa bằng cồn 96% (c)



**Hình 3: Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính enzyme amylase của tụy**

- Phương pháp 1: Ly trích enzyme bằng dung dịch đệm phosphate pH 7 rồi đông khô mẫu
- Phương pháp 2: Sau khi trích enzyme, mẫu được kết tủa bằng dung dịch  $(NH_4)_2SO_4$  60% bão hòa
- Phương pháp 3: Sau khi trích enzyme, mẫu được kết tủa bằng cồn 96%

Để xác định pH tối ưu giữa các phương pháp ly trích, tiến hành chia nhỏ các mức pH, mỗi mức là 0,25. Phản ứng thủy phân hồ tinh bột của enzyme amylase được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ tối ưu là 50°C. Kết quả cho thấy, hoạt tính enzyme amylase thể hiện cao nhất ở pH 7,5 và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% theo phép thử Duncan so với các mức pH còn lại. Hàm lượng tinh bột bị thủy phân trong 1 phút lần lượt ở 3 phương pháp là 63,56% (phương pháp 1), 71,96% (phương pháp 2) và 73,19% (phương pháp 3) (Hình 3). Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu enzyme amylase của Buonocore *et al.* (1977) và Osman (1982) trên tuyến tụy gà.

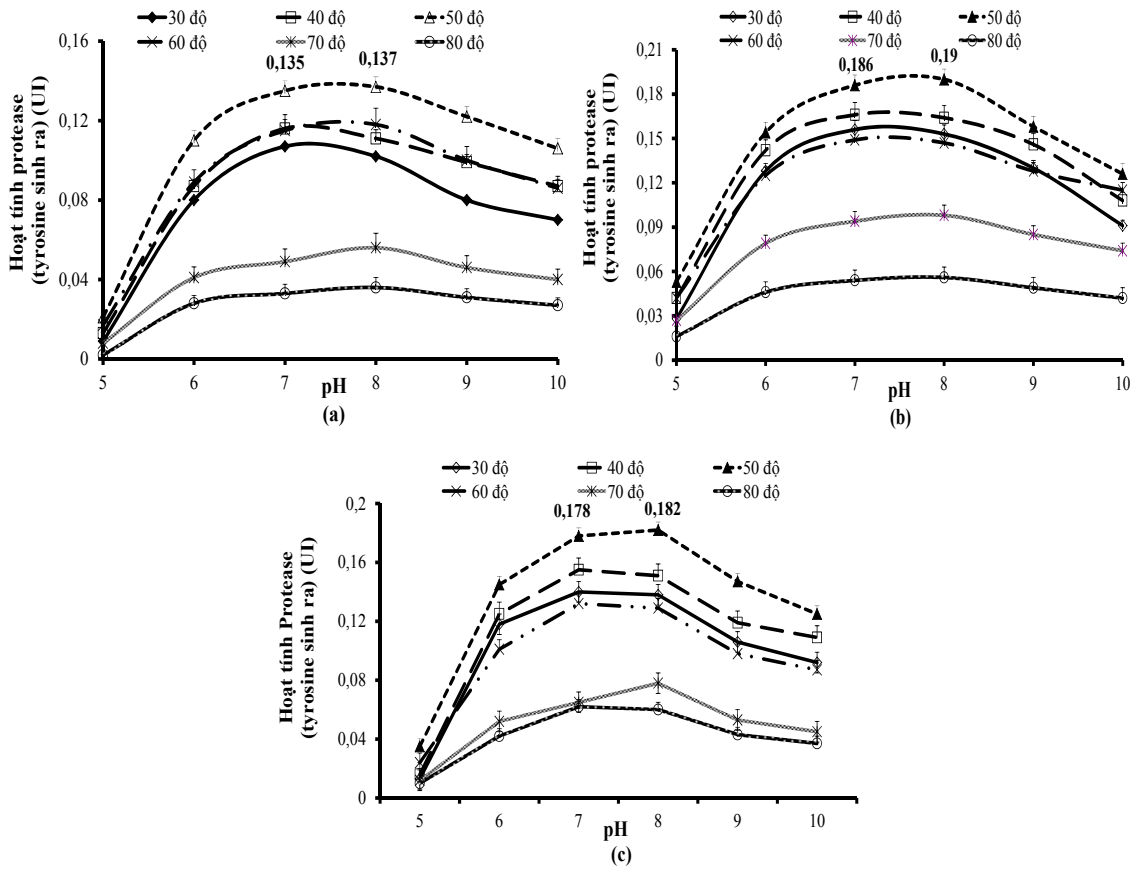
### 3.2.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt tính của enzyme protease

Enzyme protease cho hoạt tính cao nhất ở điều kiện nhiệt độ 50°C và trong vùng pH 7 đến pH 8. Sự khác biệt thống kê được ghi nhận ở mức ý nghĩa 1% giữa các phương pháp. Ở pH 7, hàm lượng tyrosine sinh ra ở 3 phương pháp lần lượt là 0,135 UI (phương pháp 1), 0,186 UI (phương pháp 2) và 0,178 UI (phương pháp 3). Trong khi đó, ở điều kiện pH 8 hoạt tính enzyme protease tăng hơn so với hoạt tính protease ở pH 7, hàm lượng tyrosine sinh ra ở 3 phương pháp lần lượt là 0,137

UI (phương pháp 1), 0,190 UI (phương pháp 2) và 0,182 UI (phương pháp 3). Khi gia tăng nhiệt độ hơn 50°C và pH cao hơn 8, hoạt tính enzyme protease ở ba phương pháp càng giảm (Hình 4a, b và c). Vậy enzyme protease từ tụy gà hoạt động tối ưu trong điều kiện nhiệt độ 50°C và pH 7 đến pH 8.

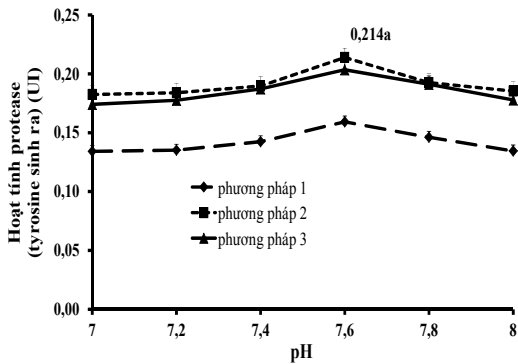
Để xác định pH tối ưu giữa các phương pháp trích, tiến hành chia nhỏ các mức pH từ pH 7 đến pH 8, mỗi mức pH là 0,2. Phản ứng thủy phân casein của enzyme protease được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ tối ưu là 50°C. Kết quả khảo sát mức pH tối ưu cho hoạt tính xúc tác của enzyme protease được thể hiện ở Hình 5. Kết quả cho thấy, hoạt tính enzyme protease thể hiện cao nhất ở pH 7,6 trong điều kiện nhiệt độ 50°C và khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mức pH ở mức ý nghĩa 1% theo phép thử LSD. Hàm lượng tyrosine sinh ra lần lượt ở 3 phương pháp là 0,150 UI (phương pháp 1), 0,204 UI (phương pháp 2) và 0,195 UI (phương pháp 3). Kết quả này cũng được ghi nhận tương tự khi nghiên cứu enzyme protease của Ishiura *et al.* (1978) trên gà.

Tóm lại, enzyme protease trích từ tuyến tụy gà của 3 phương pháp trích hoạt động tốt trong điều kiện nhiệt độ 50°C và pH 7,6.



**Hình 4: Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính protease trích được từ tụy gà**

- Phương pháp 1: Ly trích enzyme bằng dung dịch đệm phosphate pH 7 rồi đông khô mẫu (a)
- Phương pháp 2: Sau khi trích enzyme, mẫu được kết tủa bằng dung dịch  $(NH_4)_2SO_4$  60% bão hòa (b)
- Phương pháp 3: Sau khi trích enzyme, mẫu được kết tủa bằng cồn 96% (c)



**Hình 5: Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính protease của tụy**

- Phương pháp 1: Phương pháp ly trích enzyme bằng dung dịch đệm phosphate pH 7
- Phương pháp 2: Phương pháp ly trích enzyme bằng dung dịch  $(NH_4)_2SO_4$  60% bão hòa
- Phương pháp 3: Phương pháp ly trích enzyme bằng cồn 96%

Từ kết quả thí nghiệm 2 cho thấy, enzyme amylase và protease của tụy gà hoạt động tốt trong điều kiện pH từ trung tính đến hơi kiềm, nguyên nhân là do thành phần dịch tụy có nồng độ bicarbonate cao làm cho chúng có tính kiềm (Nguyễn Đình Giậu và *ctv.*, 2000; Nguyễn Thị Kim Đông và Nguyễn Văn Thu, 2009). Bên cạnh đó, enzyme protease gồm hai enzyme trypsin và chymotrypsin, hai enzyme này hoạt động tối ưu trong điều kiện pH kiềm (Nguyễn Đức Lượng *et al.*, 2004; Koutsopoulos *et al.*, 2007).

Như vậy, hỗn hợp enzyme amylase và protease trích từ các phương pháp khác nhau (trích bằng dung dịch đệm phosphate pH 7, kết tủa bằng muối  $(NH_4)_2SO_4$  và kết tủa bằng cồn 96%) của tụy gà cho hoạt động xúc tác cao nhất trong điều kiện nhiệt độ tối ưu đều ở 50°C và pH lần lượt là 7,5 đối với amylase và 7,6 đối với protease.

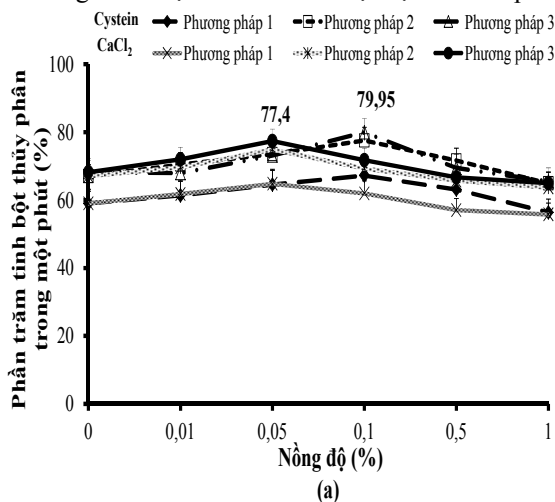


### 3.3 Ảnh hưởng của chất hoạt hóa lên hoạt tính của enzyme amylase và protease

Chất hoạt hóa là những chất có tác dụng làm tăng hoạt tính enzyme. Các chất hoạt hóa có bản chất hóa học rất khác nhau. Chúng có thể là những anion, các ion kim loại từ ô thứ 11 đến ô thứ 55 trong bảng tuần hoàn Mendeleev, chất hữu cơ có cấu trúc phức tạp ở nồng độ hoạt hóa. Chất hoạt hóa có tác dụng chuyển nhóm hydrogen hoặc phá vỡ các liên kết trong phân tử tiền enzyme hoặc phục hồi các nhóm chức năng trong trung tâm hoạt động của enzyme. Cysteine có khả năng hồi phục lại nhóm chức -SH của các enzyme thủy phân protein nên được coi là các chất hoạt hóa. Các cation kim loại có bán kính  $r = 0,34 - 1,65 \text{ \AA}$  ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ) và các anion  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  có tác dụng hoạt hóa enzyme do tham gia vào trung tâm hoạt động (Nguyễn Đức Lượng và *ctv.*, 2004). Kết quả phân tích ảnh hưởng của chất hoạt hóa lên hoạt tính enzyme amylase và protease được thể hiện trong Hình 6a và 6b.

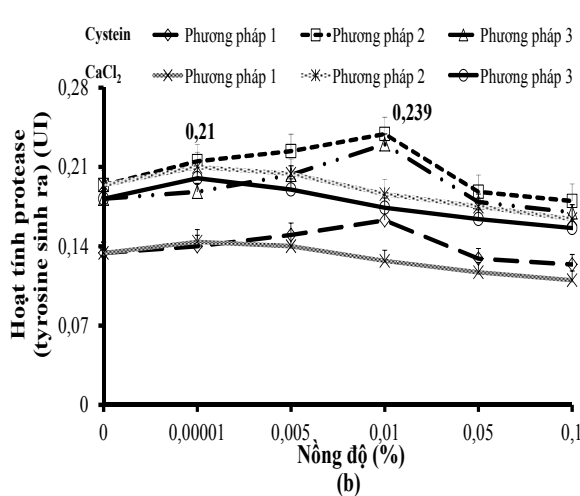
#### 3.3.1 Ảnh hưởng của chất hoạt hóa lên hoạt tính của enzyme amylase

Ảnh hưởng của chất hoạt hóa đến hoạt tính enzyme amylase trích từ tuyến tụy đã được khảo sát trong điều kiện tối ưu với nhiệt độ  $50^\circ\text{C}$  và pH



7,5. Chất hoạt hóa được sử dụng cho hoạt động xúc tác của enzyme amylase là NaCl và  $\text{CaCl}_2$  với nồng độ tương ứng là 0%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5% và 1%. Kết quả, chất hoạt hóa NaCl và  $\text{CaCl}_2$  đều làm tăng hoạt tính xúc tác của enzyme amylase (tăng 3,33% - 17,21% tinh bột bị thủy phân trong 1 phút) so với khi không thêm chất hoạt hóa. Hoạt tính enzyme amylase mạnh nhất ở nồng độ NaCl là 0,1% và  $\text{CaCl}_2$  là 0,05%. Kết quả tương đồng với kết quả nghiên cứu của enzyme amylase của tụy heo (Nguyễn Minh Chơn và *ctv.*, 2011a).

Chất hoạt hóa NaCl ở nồng độ 0,1% đã làm tăng hoạt tính enzyme amylase trích được từ 3 phương pháp. Hoạt tính amylase trích bằng phương pháp 1 có hàm lượng tinh bột bị thủy phân trong 1 phút là 59,04%, khi thêm 0,1% NaCl thì hàm lượng tinh bột bị thủy phân trong 1 phút đã tăng lên là 67,20%. Hoạt tính amylase trích bằng phương pháp 2 có hàm lượng tinh bột bị thủy phân trong 1 phút là 67,04%, khi thêm 0,1% NaCl thì hàm lượng tinh bột bị thủy phân trong 1 phút đã tăng lên là 77,54%. Hoạt tính amylase trích bằng phương pháp 3 có hàm lượng tinh bột bị thủy phân trong 1 phút là 68,21%, khi thêm 0,1% NaCl thì hàm lượng tinh bột bị thủy phân trong 1 phút đã tăng lên là 79,95%.



Hình 6: Ảnh hưởng của chất hoạt hóa lên hoạt tính enzyme amylase (a) và protease (b) của tụy gà

- Phương pháp 1: Phương pháp ly trích enzyme bằng dung dịch đệm phosphate pH 7
- Phương pháp 2: Phương pháp ly trích enzyme bằng dung dịch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60% bão hòa
- Phương pháp 3: Phương pháp ly trích enzyme bằng cồn 96%

Tương tự như chất hoạt hóa NaCl, chất hoạt hóa  $\text{CaCl}_2$  cũng làm tăng hoạt tính xúc tác của enzyme amylase nhưng thấp hơn so với chất hoạt hóa NaCl.  $\text{CaCl}_2$  ở nồng độ 0,05% làm tăng hoạt tính enzyme amylase trích được cao nhất ở cả 3

phương pháp. Hoạt tính amylase trích bằng phương pháp 1 có hàm lượng tinh bột bị thủy phân trong 1 phút là 59,04%, khi thêm 0,05%  $\text{CaCl}_2$  thì hàm lượng tinh bột bị thủy phân trong 1 phút đã tăng lên là 64,79%. Hoạt tính amylase trích bằng

phương pháp 2 có hàm lượng tinh bột bị thủy phân trong 1 phút là 67,04%, khi thêm 0,05%  $\text{CaCl}_2$  thì hàm lượng tinh bột bị thủy phân trong 1 phút đã tăng lên là 74,93%. Hoạt tính amylase trích bằng phương pháp 3 có hàm lượng tinh bột bị thủy phân trong 1 phút là 68,21%, khi thêm 0,05%  $\text{CaCl}_2$  thì hàm lượng tinh bột bị thủy phân trong 1 phút đã tăng lên là 77,40% (Hình 6a).

Khi tăng nồng độ của chất hoạt hóa NaCl (lớn hơn 0,1%) và  $\text{CaCl}_2$  (lớn hơn 0,05%) trong phản ứng xúc tác của enzyme amylase trích được thì hoạt tính enzyme amylase giảm thấp hơn so với khi không sử dụng chất hoạt hóa. Điều này chứng tỏ rằng có sự ức chế hoạt động của enzyme trong phản ứng (Trịnh Lê Hùng, 2005).

### 3.3.2 Ảnh hưởng của chất hoạt hóa lên hoạt tính của enzyme protease

Ảnh hưởng của chất hoạt hóa đến hoạt tính enzyme protease trích từ tuyến tụy đã được khảo sát trong điều kiện tối ưu với nhiệt độ 50°C và pH 7,6. Chất hoạt hóa protease là cysteine và  $\text{CaCl}_2$  đã được sử dụng với nồng độ tương ứng là: 0%, 0,00001%, 0,005%, 0,01%, 0,05% và 0,1%. Kết quả, chất hoạt hóa NaCl và  $\text{CaCl}_2$  đều làm tăng hoạt tính xúc tác của enzyme protease (tăng 2,98% - 25,45% lượng tyrosine sinh ra) so với khi không thêm chất hoạt hóa. Hoạt tính enzyme protease mạnh nhất ở nồng độ cysteine là 0,01% và  $\text{CaCl}_2$  là 0,00001%. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của enzyme protease của gan cá tra (Nguyễn Minh Chơn và *ctv.*, 2011b).

Chất hoạt hóa Cysteine ở nồng độ 0,01% đã làm tăng hoạt tính enzyme protease trích được từ 3 phương pháp. Hoạt tính protease trích bằng phương pháp 1 có hàm lượng tyrosine sinh ra là 0,134 UI, khi thêm 0,01% Cysteine thì hàm lượng tyrosine sinh ra đã tăng lên là 0,163 UI. Hoạt tính protease trích bằng phương pháp 2 có hàm lượng tyrosine sinh ra là 0,194 UI, khi thêm 0,01% Cysteine thì hàm lượng tyrosine sinh ra đã tăng lên là 0,239 UI. Hoạt tính protease trích bằng phương pháp 3 có hàm lượng tyrosine sinh ra là 0,182 UI, khi thêm 0,01% Cysteine thì hàm lượng tyrosine sinh ra đã tăng lên là 0,230 UI.

Tương tự như chất hoạt hóa Cysteine, chất hoạt hóa  $\text{CaCl}_2$  cũng làm tăng hoạt tính xúc tác của enzyme protease nhưng thấp hơn so với chất hoạt hóa Cysteine.  $\text{CaCl}_2$  ở nồng độ 0,00001% làm tăng hoạt tính enzyme protease trích được cao nhất ở cả 3 phương pháp. Hoạt tính protease trích bằng phương pháp 1 có hàm lượng tyrosine sinh ra là

0,134 UI, khi thêm 0,00001%  $\text{CaCl}_2$  thì hàm lượng tyrosine sinh ra đã tăng lên là 0,127 UI. Hoạt tính protease trích bằng phương pháp 2 có hàm lượng tinh bột bị thủy phân trong 1 phút là 0,194 UI, khi thêm 0,00001%  $\text{CaCl}_2$  thì hàm lượng tyrosine sinh ra đã tăng lên là 0,210 UI. Hoạt tính protease trích bằng phương pháp 3 có hàm lượng tyrosine sinh ra là 0,182 UI, khi thêm 0,00001%  $\text{CaCl}_2$  thì hàm lượng tyrosine sinh ra đã tăng lên là 0,200 UI (Hình 6b). Khi tăng nồng độ chất hoạt hóa Cysteine > 0,05% và  $\text{CaCl}_2$  > 0,01% thì hoạt tính enzyme protease giảm thấp hơn so với khi không sử dụng chất hoạt hóa. Điều này chứng tỏ rằng có sự ức chế hoạt động của enzyme trong phản ứng (Trịnh Lê Hùng, 2005).

### 3.4 Ảnh hưởng của thời gian tồn trữ lên hoạt tính của enzyme amylase và protease trích được

Sau khi tinh sạch, người ta thường tiến hành giai đoạn cuối cùng là tạo sản phẩm enzyme và bảo quản. Chế phẩm enzyme có thể được bảo quản ở dạng dung dịch, dạng huyền phù, dạng bột khô hoặc dạng viên nhỏ. Enzyme ở dạng dung dịch hay dạng huyền phù có nhược điểm là rất khó bảo quản. Do đó, người ta thường đưa chúng vào dung dịch các chất bảo quản. Mặt khác, khi sử dụng phải giữ ở điều kiện nhất định và không được bảo quản ở nhiệt độ cao. Enzyme ở dạng bột khô hoặc dạng viên nhỏ thường dễ bảo quản và thời gian bảo quản rất lâu. Người ta thường sử dụng máy đông khô chân không để tạo chế phẩm enzyme dạng bột (Nguyễn Đức Lượng và *ctv.*, 2004). Phương pháp bảo quản enzyme ảnh hưởng đến khả năng duy trì hoạt tính xúc tác của enzyme. Kết quả phân tích, ảnh hưởng của thời gian tồn trữ lên hoạt tính của enzyme amylase và protease từ hỗn hợp enzyme trích được thể hiện ở Bảng 2.

#### 3.4.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt tính của enzyme amylase

Sau 90 ngày bảo quản ở điều kiện nhiệt độ - 20°C, hoạt tính enzyme amylase của hỗn hợp enzyme trích được có giảm ở cả 3 phương pháp trích và có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% theo phép thử LSD. Hoạt tính amylase trích bằng phương pháp 1 (dung dịch đệm phosphate pH 7) có hàm lượng tinh bột thủy phân sau 1 phút là 20,53% so với hoạt tính enzyme amylase lúc đầu có hàm lượng tinh bột thủy phân là 42,76%. Hoạt tính amylase trích bằng phương pháp 2 (kết tủa bằng  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60% bão hòa) có hàm lượng tinh bột thủy phân sau 1 phút là 29,87% so với hoạt tính enzyme amylase lúc đầu là 52,11% lượng tinh bột thủy phân sau 1 phút. Hoạt tính amylase trích

bằng phương pháp 3 (kết tủa bằng cồn 96%) có hàm lượng tinh bột thủy phân là 29,26% sau 1 phút so với hoạt tính enzyme amylase lúc đầu là 52,72% tinh bột thủy phân sau 1 phút. Như vậy, hoạt tính

enzyme amylase của hỗn hợp enzyme trích được đều giảm khi tiến hành tồn trữ ở điều kiện nhiệt độ -20°C trong 90 ngày, nhưng hỗn hợp enzyme trích được vẫn duy trì hoạt động xúc tác (Bảng 2).

**Bảng 2: Ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến hoạt tính của amylase và protease của tụy gà**

Ngày trữ mẫu	Hoạt tính enzyme amylase (%)			Hoạt tính enzyme protease (UI)		
	Phương pháp 1	Phương pháp 2	Phương pháp 3	Phương pháp 1	Phương pháp 2	Phương pháp 3
0 ngày	42,76 <sup>a</sup>	52,11 <sup>a</sup>	52,72 <sup>a</sup>	0,107 <sup>a</sup>	0,136 <sup>a</sup>	0,140 <sup>a</sup>
30 ngày	37,02 <sup>b</sup>	42,38 <sup>b</sup>	42,87 <sup>b</sup>	0,084 <sup>b</sup>	0,130 <sup>b</sup>	0,112 <sup>b</sup>
60 ngày	27,00 <sup>c</sup>	35,21 <sup>c</sup>	37,23 <sup>c</sup>	0,064 <sup>c</sup>	0,108 <sup>c</sup>	0,091 <sup>c</sup>
90 ngày	20,53 <sup>d</sup>	29,87 <sup>d</sup>	29,06 <sup>d</sup>	0,054 <sup>d</sup>	0,090 <sup>d</sup>	0,077 <sup>d</sup>
F	**	**	**	**	**	**
CV (%)	1,17	0,86	1,01	2,58	1,68	1,63

Ghi chú: \*\*: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. Trong cùng một cột, các số trung bình có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa theo phép thử LSD

- Phương pháp 1: Phương pháp ly trích enzyme bằng dung dịch đệm phosphate pH 7

- Phương pháp 2: Phương pháp ly trích enzyme bằng dung dịch (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60% bão hòa

- Phương pháp 3: Phương pháp ly trích enzyme bằng cồn 96%

**3.4.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt tính của enzyme protease**

Tương tự như việc bảo quản enzyme amylase, enzyme protease từ hỗn hợp enzyme cũng được tồn trữ ở điều kiện nhiệt độ -20°C trong 90 ngày. Sau thời gian 90 ngày bảo quản, hoạt tính của enzyme protease có giảm đi ở cả 3 phương pháp trích. Sự khác biệt về mặt thống kê ghi nhận được ở mức ý nghĩa 1% theo phép thử LSD. Hoạt tính protease trích bằng phương pháp 1 (trích bằng dung dịch đệm phosphate pH 7) có hàm lượng tyrosine sinh ra là 0,054 UI so với hoạt tính enzyme protease lúc đầu (0,107 UI). Hoạt tính protease trích bằng phương pháp 2 (có kết tủa bằng muối (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60% bão hòa) có hàm lượng tyrosine sinh ra là 0,090 UI so với hoạt tính enzyme protease lúc đầu với hàm lượng tyrosine sinh ra là 0,136 UI. Hoạt tính protease trích bằng phương pháp 3 (kết tủa bằng cồn 96%) có hàm lượng tyrosine sinh ra là 0,077 UI so với hoạt tính enzyme protease lúc đầu với hàm lượng tyrosine sinh ra là 0,140 UI. Như vậy, hoạt tính enzyme protease của hỗn hợp enzyme trích được đều giảm khi tiến hành tồn trữ ở điều kiện nhiệt độ -20°C trong 90 ngày, nhưng hỗn hợp enzyme trích vẫn duy trì hoạt động xúc tác được (Bảng 2).

loại muối rồi đông khô chân không đã cho hiệu quả ly trích enzyme tốt. Enzyme amylase của tụy gà hoạt động tốt nhất ở nhiệt độ 50°C với pH 7,5. Chất hoạt hóa được thêm vào là NaCl 0,1% hoặc CaCl<sub>2</sub> 0,05% đều làm tăng hoạt tính enzyme amylase. Enzyme protease của tụy gà hoạt động tốt nhất ở nhiệt độ 50°C với pH 7,6. Chất hoạt hóa được thêm vào là cysteine 0,01% hoặc CaCl<sub>2</sub> 0,00001% đều làm tăng hoạt tính enzyme protease. Sau 90 ngày bảo quản ở nhiệt độ -20°C, hỗn hợp enzyme amylase và protease trích được đã có giảm hoạt tính nhưng vẫn duy trì hoạt động xúc tác tốt. Có thể nghiên cứu thêm phương pháp tinh sạch và bảo quản enzyme để tạo ra sản phẩm càng có chất lượng và thời gian sử dụng được lâu bền hơn.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Trịnh Lê Hùng, 2005. *Cơ sở hóa sinh*. Nxb Giáo Dục.
2. Bernfeld, P., 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis. In: " *Advances in enzymology*" (ed Nord FF), Interscience publication inc, New York, pp. 379-424.
3. Buonocore, V., R. Deponte, F. Gramenzi, T. Petrucci, E. Poerio and V. Silano, 1977. Purification and properties of α-Amylase from chicken (*Gallus gallus* L.) pancreas. *Molecular and Cellular biochemistry*, Volume 17, number 1: 11-16.
4. Desseaux, V., F. Payan, E. H. Ajandouz, B. Svensson, R. Haser and G. Marchis-Mouren, 1991. Effect of limited proteolysis in the 8th loop of the barrel and of

**4 KẾT LUẬN**

Tụy gà là nguồn nguyên liệu giàu enzyme amylase và protease (gồm trypsin và chymotrypsin). Phương pháp trích enzyme bằng dung dịch đệm phosphate pH 7 và tủa bằng (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60% bão hòa kết hợp với thâm tích để

- antibodies on porcine pancreas amylase activity. *Biochimica et biophysica acta*, Volume 1080, number 3: 237-44.
5. Dương Thanh Liêm, 2003. *Chăn nuôi gia cầm*, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.
  6. Ensminger, M. E., 1992. *Poultry Science*, pp 469.
  7. Harlow, E., and D. Lane, 1988. *Comonly Used Techniques in Molecular Cloning*. In Sambrook J. and Russell D.W. *Molecular Cloning 3<sup>rd</sup>*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
  8. Isiura, S., H. Murofushi, K. Suzuki and K. Imahori, 1978. Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. *J Biochem*, Vol 84, number 1: 225-230.
  9. Koutsopoulos, S., K. Patzsch, W. Bosker and W. Norde. 2007. Adsorption of Trypsin on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces. *Langmuir* Volume 23: 2000.
  10. Nguyễn Đình Giậu, Nguyễn Chi Mai và Trần Thị Việt Hồng, 2000. *Sinh lý học người và động vật*. Nxb Đại học Quốc Gia TP. HCM.
  11. Nguyễn Đức Lượng và Cao Cường, 2003. Thí nghiệm công nghệ Sinh học tập 1: Thí nghiệm hóa sinh học. Nxb Đại học Quốc Gia TP.HCM.
  12. Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết, Lê Thị Thủy Tiên và Huỳnh Ngọc Oanh, 2004. *Công nghệ enzyme*. Nxb Đại học Quốc Gia TP. HCM.
  13. Nguyễn Minh Chon, Huỳnh Văn Trung và Cao Thị Mỹ Hội, 2011b. Ly trích enzyme từ gan cá tra. Hội Nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc Phía Nam lần 2, 76.
  14. Nguyễn Minh Chon, Huỳnh Văn Trung và Danh Cẩm Ngọc, 2011a. Ly trích enzyme từ tụy heo. Hội Nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc Phía Nam lần 2, 77.
  15. Nguyễn Thị Kim Đông và Nguyễn Văn Thu, 2009. *Sinh lý gia súc - gia cầm*. Nxb Nông nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh.
  16. Osman, M.A., 1982. Amylase in chicken intestine and pancreas. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.73B: 571-574.
  17. Phạm Thị Trân Châu và Phan Tuấn Nghĩa. 2007. *Công nghệ sinh học tập 3, enzyme và ứng dụng*. Nxb Giáo Dục.
  18. Rukhliadeva, A.P., and M.G. Goriacheva, 1982. Immobilization of Mold and Bacterial Amylases on Silica Carriers. *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 24, number 8: 1765-1772.