

**VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN VIỆT NAM**

**ĐẠI HỌC SƯ PHẠM THÁI NGUYÊN**

**\*\*\*\*\***

**NGUYỄN LƯƠNG THOẠI**

**NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT TỔ HỢP ENZYME PHÂN GIẢI  
PROTEIN TỪ GAN TỤY CỦA CUA BIỂN**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Mã ngành: 60. 42. 30**

**HÀ NỘI – 2010**

**VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN VIỆT NAM**  
**ĐẠI HỌC SƯ PHẠM THÁI NGUYÊN**

**\*\*\*\*\***

**NGUYỄN LƯƠNG THOẠI**

**NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT TỔ HỢP ENZYME PHÂN GIẢI  
PROTEIN TỪ GAN TỤY CỦA CUA BIỂN**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Mã ngành: 60. 42. 30**

**Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. Nguyễn Hoài Châu**

**HÀ NỘI – 2010**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **PGS.TS Nguyễn Hoài Châu** – Viện trưởng Viện Công nghệ Môi trường – Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hướng dẫn, quan tâm và tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành khóa luận.

Tôi xin chân thành cảm ơn tập thể cán bộ Phòng Công nghệ thân Môi trường – Viện Công nghệ Môi trường đặc biệt là **PGS.TSKH. Ngô Quốc Bưu** đã tận tình giúp đỡ tôi hoàn thành khóa luận này.

Tôi xin chân thành cảm ơn **TS. Nguyễn Duy Nhứt** – Trung tâm ứng dụng Khoa học & Công nghệ Nha Trang đã hướng dẫn tận tình và truyền đạt những kiến thức quý báu cho tôi.

Tôi cũng xin bày tỏ sự cảm ơn các thầy cô và các cán bộ của cơ sở Đào tạo sau Đại học - Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật – Viện Khoa học và Công nghệ Việt nam.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình và bạn bè đã luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

**Tác giả luận văn**

*Nguyễn Lương Thoại*

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của chúng tôi. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác tại Việt Nam.

**Tác giả luận văn**

*Nguyễn Lương Thoại*

## CÁC CHỮ VIẾT TẮT

<b>APS</b>	Ammonium persulphate
<b>Tris.Base</b>	Tris (hydroxy methyl) amiomethane (HOCH <sub>3</sub> )CNH <sub>2</sub>
<b>TEMED</b>	Trichloroacetic acid
<b>kb</b>	kilo base
<b>kDa</b>	kilo Dalton
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>U</b>	Unit
<b>ADN</b>	Acid Deoxyribonucleic
<b>EDTA</b>	Ethylene diamine tetraacetic acid
<b>TCA</b>	Trichloroacetic acid
<b>OD</b>	Optical density
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecylSulphate polyacrylamide gel Electrophorei
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulphate
<b>DEP</b>	Diethoxylphosphoryl
<b>DFP</b>	Di-isopropylfluorophosphate
<b>3,4-DCI</b>	3,4-Dichloroisocoumarin
<b>PMSF</b>	Phenylmethysulfonyl fluoride
<b>TLCK</b>	Tosyl-L-lysine Chloromethyl Ketone
<b>PCMB</b>	P-Chloromercuribenzoate
<b>v/p</b>	vòng/phút
<b>v/v</b>	Volume/volume

## DANH MỤC CÁC BẢNG

- Bảng 3.1.** Kết quả thử hoạt tính protease từ mẫu Nhà máy chế biến hải sản
- Bảng 3.2.** Kết quả thử hoạt tính dịch chiết chạy qua màng lọc 50kDa
- Bảng 3.3.** Kết quả thử hoạt tính với casein sau khi ủ với casein
- Bảng 3.4.** Kết quả thử hoạt tính protease với mẫu mua ghe
- Bảng 3.5.** Ảnh hưởng của dung dịch đệm đến hoạt tính của enzyme
- Bảng 3.6.** Kết quả thử hoạt tính protease ở tỉ lệ cồn 30%; 40%
- Bảng 3.7.** Kết quả thử hoạt tính protease ở tỉ lệ cồn 50%
- Bảng 3.8.** Kết quả thử hoạt tính protease ở tỉ lệ cồn 60%;70% và 80%
- Bảng 3.9.** Kết quả thử hoạt tính protease ở tỉ lệ cồn 90%
- Bảng 3.10.** Hoạt tính và hiệu suất thu hồi ở các tỉ lệ cồn khác nhau
- Bảng 3.11.** Kết quả thử hoạt tính ở các tốc độ li tâm khác nhau.
- Bảng 3.12.** Kết quả thử hoạt qua lọc màng (10kDa;50kDa).
- Bảng 3.13.** Kết quả thử hoạt qua lọc màng (50kDa;100kDa).
- Bảng 3.14.** Kết quả thử hoạt tính theo các phân đoạn  $(NH_4)_2SO_4$
- Bảng 3.15.** So sánh giữa các phương pháp kết tủa thu hồi enzyme
- Bảng 3.16.** Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính của enzyme
- Bảng 3.17.** Ảnh hưởng đồng thời của nhiệt độ và pH lên hoạt tính của enzyme
- Bảng 3.18.** Hàm lượng protease thu được so sánh với mẫu của Nga
- Bảng 3.19.** Kết quả mẫu đem chạy điện di

## DANH MỤC CÁC HÌNH

*Hình 1.1. Phản ứng thủy phân liên kết peptide*

*Hình 1.2. Mô hình enzyme protease thủy phân*

*Hình 1.3. Cấu trúc không gian enzyme protease*

*Hình 1.4. Sơ đồ phân loại protease*

*Hình 1.5. Sơ đồ cơ chế xúc tác trung tâm hoạt động của enzyme*

*Hình 1.6. Cơ chế xúc tác của cysteine protease.*

*Hình 1.7. Cơ chế hoạt động của Aspartic protease*

*Hình 1.8. Mô hình phân tử enzyme protease*

*Hình 1.9. Nội tạng của biển*

*Hình 1.10. Sự phân bố của cua vua đỏ (vùng màu vàng)*

*Hình 1.11. Loài cua vua (king crab) *Paralithodes camtschaticus**

*Hình 2. Đường chuẩn Tyrosine*

*Hình 3.1. Ảnh hưởng của tỉ lệ cồn tới enzyme protease.*

*Hình 3.2. Ảnh hưởng của tốc độ máy lọc màng tới enzyme protease*

*Hình 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ  $(NH_4)_2SO_4$  lên hoạt tính của protease*

*Hình 3.4. Ảnh hưởng của độ pH lên hoạt tính của enzyme protease*

*Hình 3.5. So sánh giữa các phương pháp kết tủa thu hồi enzyme*

*Hình 3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt tính của enzyme*

*Hình 3.7. Điện di đồ sau khi rửa bằng  $(NH_4)_2SO_4$  và cồn 70%*

## MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ.....</b>	<b>3</b>
<b>CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....</b>	<b>3</b>
1.1. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU ENZYME PROTEASE .....	3
1.1.1. Tình hình nghiên cứu và ứng dụng trên thế giới.....	3
1.1.2. Tình hình nghiên cứu và ứng dụng trong nước.....	4
1.2. ENZYME PHÂN GIẢI PROTEIN - PROTEASE.....	5
1.3. PHÂN LOẠI .....	7
1.3.1. Exopeptidase.....	8
1.3.2. Endopeptidase .....	9
1.4. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG TỚI HOẠT TÍNH PROTEASE .....	10
1.5. CƠ CHẾ XÚC TÁC PHẢN ỨNG.....	11
1.5.1. <i>Serine protease</i> .....	12
1.5.2. <i>Metallo protease</i> .....	12
1.5.3. <i>Cysteine protease</i> .....	13
1.5.4. <i>Aspartic protease</i> .....	14
1.6. CHẤT ỨC CHẾ PROTEASE.....	15
1.7. NGUỒN THU NHẬN ENZYME PROTEASE .....	18
1.7.1. Enzyme protease từ động vật .....	18
1.7.2. Enzyme protease từ thực vật .....	18
1.7.3. Enzyme protease từ vi sinh vật... ..	19
1.7.3.1. Vi khuẩn.....	19
1.7.3.2. <i>Nấm</i> .....	20
1.7.3.3. <i>Xạ khuẩn</i> .....	21
1.7.3.4. <i>Virus</i> .....	21
1.8. TỔ HỢP ENZYME HEPATOPANCREAS (HP) TỪ GAN TỤY CỦA CỦA BIÊN .....	22



1.8.1. Sản phẩm thu được từ gan tụy của biển.....	22
1.8.2. Ứng dụng trong y học.....	24
1.8.3. Giới thiệu về loài của nghiên cứu tại Nga.....	25
<b>1.9. ỨNG DỤNG CỦA PROTEASE.....</b>	<b>26</b>
1.9.1. Trong công nghiệp chế biến thực phẩm.....	27
1.9.2. Trong chế biến thủy sản .....	27
1.9.3. Trong công nghiệp chế biến sữa .....	28
1.9.4. Trong công nghiệp sản xuất bia .....	28
1.9.5. Trong công nghiệp da.....	28
1.9.6. Trong công nghiệp dệt.....	29
1.9.7. Trong công nghiệp y – dược .....	29
<b>CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1. NGUYÊN LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ.....</b>	<b>31</b>
2.1.1. Nguyên liệu .....	31
2.1.2. Hoá chất.....	31
2.1.3. Thiết bị .....	32
<b>2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>32</b>
2.2.1. Xác định hoạt tính tổ hợp enzyme hepatopancreas theo phương pháp Anson cải tiến, 1972.....	33
2.2.2. Xác định hàm lượng tổ hợp enzyme hepatopancreas bằng phương pháp Lowry cải tiến.....	35
2.2.3. Phương pháp định tính hoạt tính của tổ hợp enzyme hepatopancreas bằng cơ chất casein .....	36
2.2.4. Phương pháp tách chiết tổ hợp enzyme hepatopancreas .....	37
2.2.5. Phương pháp tinh sạch .....	37

2.2.5.1. Tinh sạch tổ hợp enzyme hepatopancreas bằng dung dịch $(NH_4)_2SO_4$ .....	38
2.2.5.2. Tinh sạch tổ hợp enzyme hepatopancreas bằng phương pháp lọc màng.....	39
2.2.5.3. Tinh sạch tổ hợp enzyme hepatopancreas bằng cồn theo các tỷ lệ khác nhau.....	40
2.2.6. Khảo sát ảnh hưởng của dung dịch đệm đến hoạt tính của tổ hợp enzyme hepatopancreas.....	40
2.2.7. Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ ly tâm đến khả năng tinh sạch tổ hợp enzyme hepatopancreas.....	41
2.2.8. Khảo sát ảnh hưởng của pH tới hoạt tính tổ hợp enzyme hepatopancreas.....	41
2.2.9. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt tính tổ hợp enzyme hepatopancreas .....	42
2.2.10. Điện di protein trên gel polyacrylamide xác định khối lượng tổ hợp enzyme.....	42
2.2.11. Phương pháp sấy đông khô dịch chiết enzyme .....	44
3.1. Khảo sát mẫu nội tạng của biển thu nhận từ 2 nguồn thu nhận khác nhau .....	45
3.2. Tinh sạch tổ hợp enzyme hepatopancreas.....	48
3.2.1. Tinh sạch tổ hợp enzyme hepatopancreas bằng cồn theo các tỷ lệ khác nhau .....	48
3.2.2. Tinh sạch tổ hợp enzyme hepatopancreas bằng phương pháp lọc màng .....	52
3.2.3. Tách chiết tổ hợp enzyme hepatopancreas từ gan tụy của biển dùng $(NH_4)_2SO_4$ .....	54