

SO SÁNH MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA CHẾ PHẨM ENZYME LIPASE TỪ *CANDIDA RUGOSA* VÀ *PORCINE PANCREAS*

Trần Thị Bé Lan¹, Nguyễn Minh Nam², Tạ Thị Thanh Thúy³ và Phan Ngọc Hòa³

ABSTRACT

In this study, some characteristics of free Candida rugosa and Porcine pancreas lipase were studied by the biocatalyst performance in aqueous (hydrolysis) media. Firstly, two enzyme lipases were compared in term of molecular weight (MW) and boundary conditions such as pH, temperature, level reaction, pH and thermal stability, the influence of metal ion and active energy (Ea) following the olive oil hydrolysis. The new optimum values of the two enzymes were then established. The results showed that the activity of the biocatalysis of lipase from Candida rugosa was better than that from Porcine pancreas. New optimum values of Candida rugosa enzyme found were: MW of lipase from Candida rugosa was about 60 kilodalton, the phosphate buffer pH was of 7.0, the temperature was of 40°C. Under these conditions, the batch was repeated in order to determine the pH stability after 60 minutes. The results showed that enzyme activity was still of 79.6% (1023.8 U/mg protein.min), half-life time ($t_{1/2}$) was found to be 210 (min), deactivation constant (k_d) was 3.3×10^{-3} (min^{-1}), after 60 minutes thermal stability of enzyme activity was still of 84% (940.48 U/mg protein.min) and Ea was found to be 15.176 (kJ/mol). Similarly, the results from Porcine pancreas enzyme were: MW of lipase from Porcine pancreas was about 50 kilodalton, the borate buffer pH was of 8.5, the temperature was of 40°C. The batch under these conditions was repeated in order to determine the pH stability after 30 minutes. The results showed that enzyme activity was still of 100% (5,88 U/mg protein.min), $t_{1/2}$ was found to be 148 (min), k_d is 4.7×10^{-3} (min^{-1}), after 60 minutes thermal stability of enzyme activity was still of 71.4% (4,2 U/mg protein.min) and Ea was found to be 72.156 (kJ/mol). From the results of this study, it was concluded that the two enzymes were influenced by Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Al^{3+} ; and the hydrolysis reaction was found to be at level one.

Keywords: Hydrolysis, olive oil, lipase enzymes, *Candida rugosa*, *Porcine pancreas*

Title: Comparison on some characteristics of lipase enzymes: *Candida rugosa* and *Porcine pancreas*

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, một vài tính chất của Enzyme lipase Candida rugosa và Porcine pancreas dạng tự do được nghiên cứu thông qua sự xúc tác sinh học trong môi trường nước (sự thủy phân). Trước tiên, hai chế phẩm enzyme được xác định và so sánh về trọng lượng phân tử (MW) và các điều kiện như pH, nhiệt độ, bậc phản ứng, độ bền pH, độ bền nhiệt độ theo thời gian, ảnh hưởng của ion kim loại và năng lượng hoạt hóa (Ea) của phản ứng thủy phân dầu olive. Từ đó, điều kiện tối ưu mới cho hai chế phẩm enzyme này được thiết lập. Kết quả cho thấy hoạt tính xúc tác Candida rugosa tốt hơn của Porcine pancreas. Các giá trị tối ưu mới của Candida rugosa tìm được là: MW xấp xỉ 60 kilodalton, hệ đệm phosphate pH là 7,0; nhiệt độ là 40°C. Ở các điều kiện này, các phản

¹ Trường Đại học Cần Thơ

² Đại học Nông Lâm TP HCM

³ Đại học Bách Khoa TP HCM

ứng được lặp lại nhiều lần để xác định độ bền pH sau 60 phút. Kết quả cho thấy hoạt tính của enzyme còn lại là 79,6% (1023,8 U/mg protein.phút), thời gian bán hủy ($t_{1/2}$) tìm được là 210 (phút), hằng số ức chế k_a là $3,3 \times 10^{-3}$ (phút⁻¹), sau 60 phút độ bền nhiệt độ thể hiện hoạt tính của enzyme còn 84% (940,48 U/mg protein.phút) và E_a tìm được là 15,176 (kJ/mol). Tương tự, kết quả khi sử dụng enzyme *Porcine pancreas* là: MW xấp xỉ 50 kilodalton, hệ đệm borate pH là 8,5; nhiệt độ là 40°C. Lặp lại các lần phản ứng cũng ở các điều kiện trên để xác định độ bền pH sau 30 phút. Kết quả cho thấy hoạt tính của enzyme này còn lại là 100% (5,88 U/mg protein.phút), ($t_{1/2}$) tìm được là 148 (phút), hằng số ức chế k_a là $4,7 \times 10^{-3}$ (phút⁻¹),) sau 60 phút độ bền nhiệt độ thể hiện hoạt tính của enzyme này còn 71,4% (4,2 U/mg protein.phút) và E_a tìm được là 15,176 (kJ/mol). Từ kết quả nghiên cứu này, kết luận được rút ra là cả hai enzyme đều bị ảnh hưởng bởi các ion Ca^{2+} , Mg^{2+} , và Al^{3+} ; và phản ứng thủy phân dầu olive xúc tác *Candida rugosa* và *Porcine pancreas* là bậc một.

Từ khóa: Thủy phân, dầu olive, enzyme lipase, *Candida rugosa*, *Porcine pancreas*

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Lipase (EC 3.1.1.3) (Nguyễn Thị Hương Nhân, 2009) là các enzyme đóng vai trò xúc tác sinh học cho phản ứng thủy phân triglyceride tạo thành các tri-, di-, monoglyceride, glycerol và các axit béo tự do. Đây là enzyme được ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp như: thực phẩm, hoá học, mỹ phẩm,... nhờ khả năng xúc tác tác thủy phân triglyceride hoạt động trên bề mặt phân cách pha dầu nước. Tuy nhiên, để sử dụng hiệu quả lipase cho từng mục đích cụ thể thì việc xác định một số tính chất đặc trưng liên quan đến hoạt tính của từng enzyme lipase thông qua quá trình thủy phân cơ chất chuẩn là rất cần thiết.

Mục đích chính của nghiên cứu này là tìm hiểu sơ lược động học về quy luật ảnh hưởng và tác động của các yếu tố như pH, nhiệt độ, bậc phản ứng, độ bền theo thời gian, ion kim loại và năng lượng hoạt hóa của phản ứng thủy phân dầu olive với xúc tác của chế phẩm enzyme lipase bằng phương pháp chuẩn độ thông qua xác định hoạt tính của enzyme. Hai enzyme lipase được lựa chọn cho nghiên cứu này là lipase được thu nhận từ *Candida rugosa* và *Porcine pancreas* dạng tự do.

2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu – hóa chất

Enzyme lipase từ *Candida rugosa* Type VII (≥ 700 unit/mg solid) ký hiệu L1754 (LCR). Enzyme lipase từ *Porcine pancreas*, Type II, ký hiệu L3126 (LPP). Cả hai enzyme đều do hãng Sigma-Aldrich (Mỹ) cung cấp.

Dầu olive được nhập khẩu từ Italia, được đóng chai tại Việt Nam bởi Công ty Trách nhiệm hữu hạn Dầu Thực vật Cái Lân, Hiệp Phước, thành phố Hồ Chí Minh. Dầu olive có các đặc tính sau: Độ acid: $\leq 0,8\%$, chất béo no: 15%, chất béo không no: 85%).

Một số hóa chất do hãng Merck (Darmstadt, Germany) cung cấp.

2.2 Chuẩn bị nhũ tương dầu olive

Lấy 93 mL dầu olive + 73 mL nước cất + 7 g gum Arabic. Sau đó đánh tan bằng máy đồng hóa trong 10 đến 15 phút để tạo nhũ tương. Thể nhũ tương được sử

dung khi nó không bị phân thành 2 lớp sau khi bảo quản trong 1 giờ và ổn định trong 2 ngày ở nhiệt độ từ 5 đến 10°C.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

Hoạt tính của enzyme được xác định bằng phương pháp chuẩn độ lượng axit béo sinh ra do thủy phân bằng NaOH 0,1 N. Các số liệu được tính toán, xử lý bằng phần mềm phân tích ANOVA và được trình bày dưới dạng bảng biểu và biểu đồ trên phần mềm Microsoft Excel.

2.3.1 Thí nghiệm xác định khối lượng phân tử

Bằng kỹ thuật SDS-PAGE, giúp đánh giá kết quả độ tinh sạch và khoảng khối lượng phân tử của chế phẩm enzyme dựa vào thang chuẩn 4 đến 20% tris-Glycine.

2.3.2 Thí nghiệm xác định hàm lượng protein

Protein được xác định bằng phương pháp Bradford (Đặng Thị Thu *et al.*, 2004 và Julio *et al.*, 2007), sử dụng bovine serum albumin (BSA) làm chất chuẩn. Khi thuốc thử Coomassie Brilliant Blue (CBB) tạo phức màu xanh dương với protein thì hấp thu cực đại ở bước sóng 595 (nm). Độ hấp thu này có liên hệ một cách trực tiếp với nồng độ protein. Từ đó có thể xác định được hàm lượng protein của mẫu enzyme dựa vào đường chuẩn.

2.3.3 Thí nghiệm xác định điểm đẳng điện tích (IP)

Điểm đẳng điện là tại một pH nhất định enzyme bị tủa cực đại bởi tác nhân tủa; nghĩa là enzyme được trung hòa về điện tích. Dựa vào đó, IP của enzyme tìm được bằng cách đo độ đục (OD) ở bước sóng 620 (nm) của dung dịch enzyme khi kết tủa với ethanol (Đặng Thị Thu *et al.*, 2004).

2.3.4 Thí nghiệm thủy phân xác định các điều kiện tối ưu (Đặng Thị Thu *et al.*, 2004 và Julio *et al.*, 2007)

Trong khảo nghiệm này, axit béo sinh ra bởi dầu olive đã nhũ hóa bị phản ứng thủy phân khi xúc tác LCR hoặc LPP tự do (Soares *et al.*, 1999) và các điều kiện pH, nhiệt độ, thời gian cụ thể cho các thử nghiệm xác định yếu tố cụ thể được đo trực tiếp sau khi vô hoạt enzyme với 3 (mL) ethanol 99,5° bằng chuẩn độ acid-bazơ, sử dụng NaOH 0,1 N; chất chỉ thị là phenolphthalein 0,1%. Khi đó, hoạt tính (HT) và hoạt tính riêng (HTR) của lipase được tính theo công thức:

$$HT = [(a-b) \cdot 1000 \cdot 0,1] \text{ (U/mL)}$$

Trong đó; a: $V_{NaOH\ 0,1\ N}$ chuẩn độ ở mẫu có enzyme (mL);

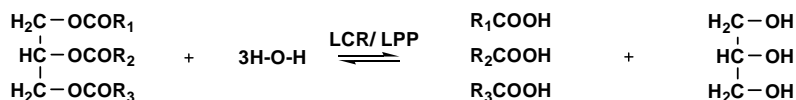
b: $V_{NaOH\ 0,1\ N}$ chuẩn độ ở mẫu trắng (mL).

$$HTR = \sum \Delta VHT/P$$

Trong đó: $\sum \Delta VHT$: Tổng số đơn vị hoạt tính enzyme/g;

P: Hàm lượng protein (mg/g).

Phản ứng thủy phân tổng quát như sau:



Hỗn hợp phản ứng gồm: Đối với LCR: 6 g đệm phosphate 1/15 M với pH 7,0; 1 g dung dịch LCR (0,00304 g/mL); 3 g dầu olive đã nhũ hóa. Đối với LPP: 6 g đệm borate 0,025 N với pH 8,5; 1 g dung dịch LPP (0,00032 g/mL); 3 g dầu olive đã nhũ hóa.

Khi khảo sát yếu tố điều kiện nào thì chỉ thay đổi yếu tố đó trong khoảng nhất định và giữ nguyên giá trị các yếu tố khác của mỗi enzyme. Tính kết quả để tìm ra điều kiện tối ưu cho hoạt động phân giải lipid của lipase ở mỗi điều kiện cụ thể.

Giá trị pH khảo sát là: LCR (5,5 đến 8,0) và LPP (6,5 đến 9,0) mỗi giá trị cách nhau 0,5; đồng thời, sử dụng cho khảo sát độ bền theo thời gian.

Giá trị nhiệt độ khảo sát là: LCR và LPP (30 đến 60°C) mỗi giá trị cách nhau 0,5°C; đồng thời, sử dụng cho khảo sát độ bền theo thời gian.

Khi đó, thời gian bán hủy ($t_{1/2}$) và hệ số ức chế (k_d) được tính theo công thức:

$$A_t = A_0 \cdot e^{-k_d t}$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_d$$

Trong đó: A_0 : hoạt tính thủy phân ban đầu;

A_t : hoạt tính thủy phân ở thời điểm t;

t: thời gian thủy phân.

Khảo sát bậc phản ứng là: Thay đổi lượng nhũ dầu olive gấp 1, 2 và 4 lần cho khảo sát bậc riêng theo dầu (3, 6 và 8 g), cố định lượng nước 2 g và ngược lại khi khảo sát bậc theo nước cho cả xúc tác LCR và LPP, bậc chung là tổng bậc riêng.

0,5 (mL) ion Ca^{2+} , Al^{3+} , Mg^{2+} dùng ở dạng muối clorua 0,1 M cho khảo sát ảnh hưởng của ion kim loại.

Năng lượng hoạt hóa (E_a) được tính theo phương trình Arrhenius:

$$\ln k = - (E_a / RT) + \ln A$$

Khi đó, $E_a = -R \times \text{tg} \alpha$ (α là góc tạo bởi đường $1000/T$ (°K) - $\ln A$), $R = 8,314$ (J/K.mol) và hằng số tốc độ phản ứng k được xác định theo phương trình động học của phản ứng bậc 1:

$$[R]_t = [R]_0 e^{-kt}$$

Trong đó:

R_t : Nồng độ cơ chất còn lại sau thời gian t;

R_0 : Nồng độ cơ chất ban đầu;

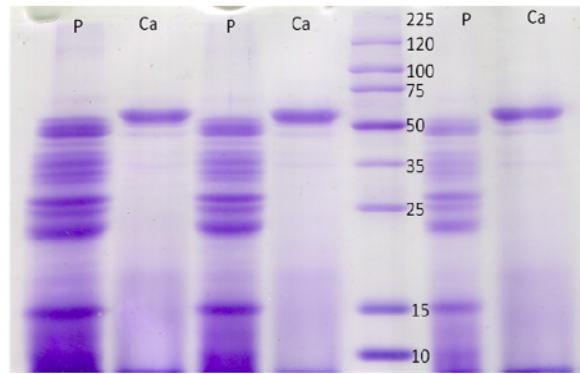
k: Hằng số tốc độ phản ứng;

t: Thời gian phản ứng (phút).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả xác định khối lượng phân tử của 2 enzyme

Chế phẩm enzyme thường có lẫn tạp nên khối lượng phân tử khó xác định bằng kỹ thuật SDS-PAGE. Kết quả chạy điện di được thể hiện trên hình 1



LPP3 LCR3 LPP2 LCR2 TC LPP1 LCR1
Hình 1: Kết quả chạy điện di trên SDS-PAGE

Trong đó (các ký hiệu trên Hình 1):

LCR1, LCR2 và LCR3 lần lượt là mẫu LCR cho ba lần chạy điện di song song;

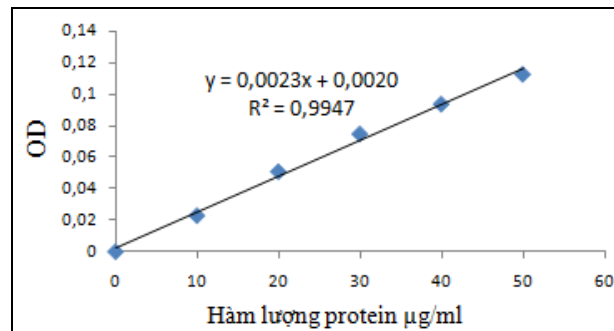
LPP1, LPP2 và LPP3 lần lượt là mẫu LPP cho ba lần chạy điện di song song;

TC là thang chuẩn.

Từ hình 1 ta nhận thấy LCR có các vạch: 1 vạch đậm có kích thước khoảng 60 kDa và 2 vạch rất mờ có kích thước 35 và 50 kDa. LPP có các vạch kích thước khoảng 15, 23, 25, 27, 34, 36, 50 kDa. Theo tài liệu (Jyoti *et al.*, 2006) thì MWLCR ≈ 62 kDa cho cả lipase A và lipase C. Như vậy, LCR có MWLCR ≈ 60 kDa vì là vạch đậm nhất và cho thấy chế phẩm tinh sạch. Kết hợp với các tài liệu (Barbara *et al.*, 1994 và Ines *et al.*, 2004) (cho rằng LPP có MWLPP ≈ 50-52 kDa) và đối chiếu với kết quả trên hình 1 thấy có 1 vạch đậm trong khoảng trên 35 kDa. Như vậy, MW_{LPP} ≈ 50 kDa, các vạch còn lại cho thấy chế phẩm chưa tinh sạch.

3.2 Kết quả xác định tính hàm lượng protein của enzyme

Đường chuẩn và hàm lượng protein của BSA xây dựng và kết quả được thể hiện trên hình 2.



Hình 2: Đồ thị đường chuẩn protein theo Bradford

Nồng độ enzyme được pha trong khoảng nồng độ của đường chuẩn. Từ phương trình đường chuẩn suy ra được nồng độ của các enzyme nhờ quan hệ giữa nồng độ và mật độ quang (OD). Từ đó tính được % (w/w) của 2 enzyme là: LCR = 4,25%, thấp hơn so với LPP = 44,26%.

3.3 Kết quả xác định IP

Tủa enzyme trong ethanol 96°, kiểm tra độ đục bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 620 nm, mẫu nào có độ đục cao nhất tức là pH tại điểm đo chính là điểm đẳng điện của enzyme. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1: Kết quả đo độ hấp thu của LCR và LPP tại 620nm

pH _{LCR}	OD _{LCR}	pH _{LPP}	OD _{LPP}
6,5	0,120 ± 0,0007 ^{ab}	3,2	0,233 ± 0,0028 ^{ab}
7,0	0,118 ± 0,0007 ^b	3,8	0,255 ± 0,0014 ^{bc}
7,5	0,125 ± 0,0007 ^a	4,4	0,301 ± 0,0494^c
8,0	0,141 ± 0,0007^c	5,0	0,242 ± 0,0205 ^{ab}
8,5	0,131 ± 0,0057 ^d	5,6	0,221 ± 0,0077 ^{ab}
9,0	0,111 ± 0,0014 ^c	6,2	0,210 ± 0,0035 ^{ab}
		6,8	0,204 ± 0,0021 ^a

*Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Từ bảng 1, ta thấy đối với LCR pH 8,0 có độ hấp thu cao nhất. Vậy IP của LCR là 8,0. Đối với LPP thì tại pH 4,4 cho kết quả hấp thu cao nhất; vậy IP của LPP là 4,4. Với cùng phương pháp xác định điểm đẳng điện, kết quả của nhóm tác giả Đại học Bách khoa Hà Nội cho thấy lipase từ *Candida rugosa* có điểm đẳng điện là 7,5 (Đặng Thị Thu *et al.*, 2004).⁰

3.4 Kết quả xác định các điều kiện tối ưu

3.4.1 Xác định hoạt tính ban đầu

Chỉ số axit của dầu olive xác định được là: 2,45 (mg KOH/g) \approx 1,23%, cao hơn so với nhà sản xuất in trên bao bì (\leq 0,8%).

Hoạt tính (HT) và hoạt tính riêng (HTR) ban đầu của cả 2 enzyme tính được nhờ đo độ tự phân hủy của nhũ dầu olive trong hệ đệm đa năng pH7,2 (LCR) và pH7,7 (LPP) ở 37°C trên máy khuấy từ gia nhiệt. Kết quả lần lượt như sau: HT_{LCR} = 1177,1 (U/mg enzyme), HTR_{LCR} = 52153,8 (U/mg protein) luôn cao hơn so với HT_{LPP} = 134,2 (U/mg enzyme), HTR_{LPP} = 384,9 (U/mg protein). Khi so sánh ta thấy hoạt tính LCR cao gấp gần 10 lần LPP, còn hoạt tính riêng thì cao gấp 152 lần so với LPP. Có thể giải thích điều này là do LPP thuộc nhóm lipase đặc trưng ở vị trí 1, 3 còn LCR thì không. Vì vậy, khi quá trình thủy phân xảy ra, LCR có thể cắt đứt liên kết ester ở bất kỳ vị trí nào trên triglyceride, còn LPP thì chỉ có thể cắt ở vị trí 1 hoặc 3. Do đó, sự xúc tác của LPP sẽ chậm hơn so với LCR.

3.4.2 Xác định pH tối ưu

Giữ nguyên giá trị nhiệt độ bằng 37°C và hàm lượng cơ chất, chọn hệ đệm và thay đổi giá trị pH dựa vào IP. Kết quả pH tối ưu cho hoạt động phân giải lipid của lipase khảo sát được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: Ảnh hưởng của pH tới hoạt tính của 2 enzyme lipase

Lipase từ <i>Candida rugosa</i>			Lipase từ <i>Porcine Pancreas</i>		
pH	Hoạt tính (U/mg enzyme)	HT (%)	pH	Hoạt tính (U/mg enzyme)	HT (%)
5,5	1157,2 ± 80,26 ^b	73,6	6,5	41,1 ± 0,85 ^a	17
6,0	1462,3 ± 16,76 ^{cd}	93	7,0	98,5 ± 1,69 ^b	41
6,5	1478,0 ± 10,61 ^{cd}	94	7,5	111,8 ± 2,33 ^c	47
7,0	1572,3 ± 39,38^d	100	8,0	131,6 ± 7,21 ^d	55
7,5	1415,1 ± 20,93 ^c	90	8,5	240,1 ± 7,28^e	100
8,0	864,78 ± 62,65 ^a	55	9,0	108,6 ± 4,17 ^{bc}	45

*Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Theo bảng 2, LCR hoạt động tốt ở pH7,0 (1572,3 U/mg enzyme, tương ứng 100% hoạt tính), nên pH 7,0 là tối ưu. Ở các giá trị pH khác, hoạt tính dao động từ 73% đến 94%. Còn LPP thì hoạt động tốt nhất ở pH8,5 (đạt 240,1 U/mg enzyme, tương ứng 100%), nên pH 7,0 là tối ưu. So với LCR thì hoạt tính của LPP thấp hơn 6,5 lần, và khi thay đổi pH thì hoạt tính giảm rất mạnh 17 đến 55%, điều này cũng cho thấy LPP có dãy pH hoạt động hẹp hơn so với LCR và LPP là một lipase ưa kiềm.

3.4.3 Xác định nhiệt độ tối ưu

Giữ nguyên giá trị pH tối ưu vừa tìm được của mỗi enzyme và hàm lượng cơ chất, thay đổi giá trị nhiệt độ từ 30°C đến 60°C, mỗi giá trị cách nhau 5°C. Kết quả pH tối ưu cho hoạt động phân giải lipid của lipase khảo sát được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt tính LCR và LPP

t°C	Lipase từ <i>Candida rugosa</i>		Lipase từ <i>Porcine pancreas</i>	
	Hoạt tính (U/mg enzyme)	Hoạt tính (%)	Hoạt tính (U/mg enzyme)	Hoạt tính (%)
30	1210,7 ± 14,43 ^a	64,7	13,16 ± 1,34 ^{ad}	7,7
35	1478,0 ± 13,86 ^b	79,0	148,1 ± 7,57 ^b	86,5
40	1871,1 ± 14,92^c	100	171,1 ± 11,10^c	100
45	1666,7 ± 11,95 ^d	89,1	134,9 ± 0,49 ^b	78,8
50	1415,1 ± 17,25 ^e	75,6	16,5 ± 0,92 ^d	9,6
60	707,6 ± 12,23 ^f	37,8	1,6 ± 0,07 ^a	1,0

*Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Theo bảng 3, hoạt tính của 2 enzyme đạt cực đại cùng ở một nhiệt độ 40°C (hoạt tính của LCR đạt 1871,1 U/mg enzyme, hoạt tính của LPP đạt 171,1 U/mg enzyme). Nhìn chung, hoạt tính của LPP giảm mạnh khi thay đổi nhiệt độ, vì vậy, LPP hoạt động ở dãy nhiệt độ hẹp hơn so với LCR.

3.4.4 Xác định bậc phản ứng

Bậc riêng theo nhũ dầu và nước, bậc chung tổng quát được khảo sát dựa vào biến thiên số mol hay nồng độ mol/lít của acid béo tạo thành theo thời gian (20 phút) ở pH tối ưu của mỗi enzyme và 40°C. Kết quả xác định bậc phản ứng như trong bảng 4.

Bảng 4: Kết quả khảo sát bậc riêng phần và bậc chung

Enzyme	LCR				LPP			
	n ₁	m ₁	n ₂	m ₂	n ₁	m ₁	n ₂	m ₂
Bậc riêng	n ₁	m ₁	n ₂	m ₂	n ₁	m ₁	n ₂	m ₂
Dựa vào Δmol/phút	0,300	1,158	0,419	1,146	0,328	1,210	0,440	1,030
Làm tròn	≈ 0	≈ 1	≈ 0	≈ 1	≈ 0	≈ 1	≈ 0	≈ 1
Dựa vào ΔM/phút	-0,0217	0,9353	0,0155	0,8538	0,0056	0,9879	0,0364	0,7375
Làm tròn	≈ 0	≈ 1	≈ 0	≈ 1	≈ 0	≈ 1	≈ 0	≈ 1
Bậc chung	n ₁ + m ₁ = n ₂ + m ₂ = 1				n ₁ + m ₁ = n ₂ + m ₂ = 1			

*Ghi chú: n₁, m₁ là bậc khi tăng hàm lượng dầu và nước gấp 2 lần; n₂, m₂ là khi tăng hàm lượng dầu và nước gấp 4 lần.

Theo bảng cho thấy phản ứng thủy phân dầu olive xúc tác bởi LPP và LCR dùng làm phản ứng đặc trưng cho phương pháp nghiên cứu các tính chất của enzyme lipase là phản ứng bậc 1.

3.4.5 Xác định độ bền pH theo thời gian

Khảo sát tính bền của LCR trong các giá trị pH từ 6,5 đến 8,0 sử dụng đệm phosphate, LPP là các giá trị pH từ 7,5 đến 9,0 với đệm borate. Với mỗi giá trị pH sau những khoảng thời gian xác định (1/2, 1, 2, 3, 4 và 5 h) của quá trình thủy phân thì tiến hành đo lượng chất tạo thành, xác định hoạt tính tại từng thời điểm đó, xác định giá trị k_d, và tính t_{1/2} như đã đề cập. Kết quả được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5: Thời gian bán hủy và hệ số ức chế của LCR và LPP tại các pH khác nhau

pH	LCR		pH	LPP	
	t _{1/2} (phút)	k _d (phút ⁻¹)		t _{1/2} (phút)	k _d (phút ⁻¹)
6,5	217	3,2.10 ⁻³	7,5	165	4,2.10 ⁻³
7,0	210	3,3.10 ⁻³	8,0	154	4,5.10 ⁻³
7,5	169	4,1.10 ⁻³	8,5	148	4,7.10 ⁻³
8,0	151	4,6.10 ⁻³	9,0	408	1,7.10 ⁻³

Qua kết quả ở bảng 5 cho thấy giá trị hằng số ức chế k_d tỉ lệ với pH và tỉ lệ nghịch với $t_{1/2}$ (trừ pH 9,0 của LPP) cho 2 lipase. Đối với LCR tại pH 7,0 (tối ưu) $t_{1/2}$ tương đương với tại pH 6,5 ($\approx 3,5$ h). Nhìn chung, ở pH 6,5-7,5 LCR hoạt động tương đương nhau và $t_{1/2}$ hơn 2,5 h; LCR thể hiện rõ tính bền tại pH 7,0 và 6,5; lúc này $t_{1/2}$ là 3,5 h. Đối với LPP tại giá trị tối ưu pH 8,5 $t_{1/2}$ là 148 phút ($\approx 2,5$ h) thấp hơn 1 giờ so với LCR cũng tại giá trị tối ưu; Do đó, LCR bền với pH hơn LPP. LCR hoạt động tốt và bền ở vùng trung tính và acid yếu còn LPP thì tốt trong môi trường kiềm.

3.4.6 Xác định độ bền nhiệt độ theo thời gian

Thực hiện phản ứng thủy phân cơ chất dầu olive đã nhũ hóa, trong từng giá trị nhiệt độ khảo sát (35°C, 40°C, 45°C, 50°C), tiến hành xác định hoạt tính enzyme những khoảng thời gian xác định (1/2, 1, 2, 3 và 4 h). Giá trị hằng số ức chế k_d và $t_{1/2}$ tính được cho kết quả như trong bảng 6.

Bảng 6: Thời gian bán hủy và hệ số ức chế của LCR và LPP ở nhiệt độ khác nhau

t(°C)	LCR		LPP	
	$t_{1/2}$ (phút)	k_d (phút ⁻¹)	$t_{1/2}$ (phút)	k_d (phút ⁻¹)
35	216,6	$3,2 \cdot 10^{-3}$	161,2	$4,3 \cdot 10^{-3}$
40	203,8	$3,4 \cdot 10^{-3}$	147,4	$4,7 \cdot 10^{-3}$
45	157,5	$4,4 \cdot 10^{-3}$	144,4	$4,8 \cdot 10^{-3}$
50	161,2	$4,3 \cdot 10^{-3}$	141,4	$4,9 \cdot 10^{-3}$

Qua bảng 6 cho thấy nhiệt độ tỉ lệ với k_d và tỉ lệ nghịch với $t_{1/2}$ (trừ 50°C đối với LCR), tại nhiệt độ tối ưu 40°C $t_{1/2}$ của LCR là 203,8 phút ($\approx 2,4$ h) và LPP là 147,4 phút ($\approx 2,5$ h), cho thấy LCR bền hơn LPP ở điều kiện khảo sát. Và khi nhiệt độ càng tăng thì độ bền càng giảm.

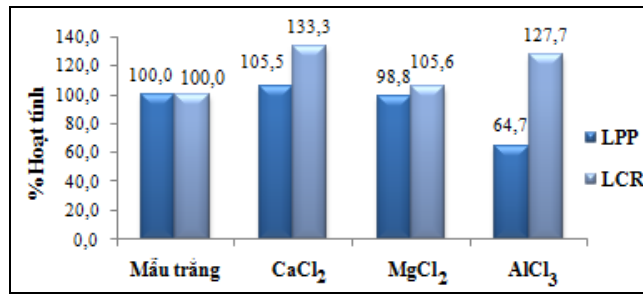
3.4.7 Khảo sát ảnh hưởng của ion kim loại

Ion kim loại là một trong những yếu tố tác động khá rõ lên hoạt tính của enzyme, thực hiện khảo sát với các ion Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} và đối chứng ở điều kiện tối ưu cho kết quả như bảng 7 và được thể hiện trên hình 3.

Bảng 7: Ảnh hưởng của ion kim loại lên hoạt tính của 2 enzyme

Ion kim loại (0,1M)	LCR		LPP	
	Hoạt tính (U/mg enzyme)	Hoạt tính %	Hoạt tính (U/mg enzyme)	Hoạt tính %
Mẫu đối chứng	$1887,5 \pm 3,2^a$	100	$171,1 \pm 8,75^a$	100
Ca^{2+}	$1990,6 \pm 4,9^b$	105,5	$227,9 \pm 2,45^b$	133,2
Mg^{2+}	$1865,6 \pm 13,2^c$	98,9	$180,6 \pm 6,7^a$	105,6
Al^{3+}	$1221,9 \pm 6,8^d$	64,9	$218,4 \pm 3,4^b$	127,7

*Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA ($\alpha = 0,05$).



Hình 3: Ảnh hưởng của ion kim loại lên %hoạt tính LCR và LPP

Qua bảng 7 và hình 3 cho thấy Ca²⁺ làm tăng hoạt tính cho cả LCR và LPP, Mg²⁺ và Al³⁺ làm giảm hoạt tính của LCR nhưng làm tăng hoạt tính đối với LPP trong thời gian 1 h ở pH và nhiệt độ tối ưu.

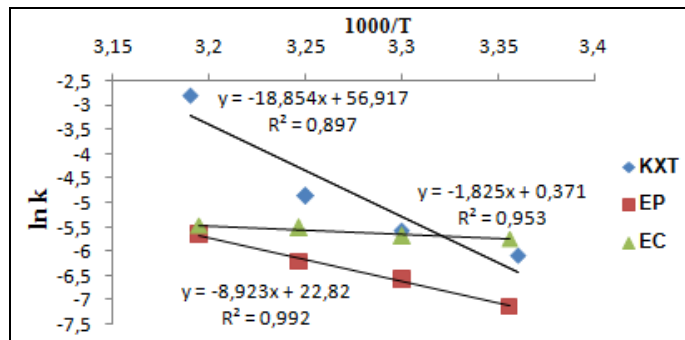
3.4.8 Khảo sát năng lượng hoạt hóa Ea

Năng lượng hoạt hóa là năng lượng tối thiểu (cao hơn động năng) mà phân tử cần có khi va chạm để phản ứng có thể xảy ra. Khi phản ứng có chất xúc tác tốc độ phản ứng tăng và năng lượng hoạt hóa giảm. Khảo sát không xúc tác và xúc tác các lipase khác nhau sẽ cho mức độ cắt các liên kết ester trong triglyceride khác nhau ở cùng nhiệt độ 25, 30, 35 và 40°C, thời gian 5p đến 40p (LCR và LPP) và 1h đến 4h (KXT). Kết quả thu được được thể hiện trong bảng 8 và hình 4.

Bảng 8: Hằng số tốc độ phản ứng của LCR và LPP ở các nhiệt độ khác nhau

t(°C)	Hằng số tốc độ phản ứng (k)		
	KXT	LCR	LPP
25	2,3.10 ⁻³	3,2.10 ⁻³	0,8.10 ⁻³
30	3,8.10 ⁻³	3,4.10 ⁻³	1,4.10 ⁻³
35	7,7.10 ⁻³	4,0.10 ⁻³	2,0.10 ⁻³
40	60,8.10 ⁻³	4,2.10 ⁻³	3,5.10 ⁻³

*Ghi chú:KXT là phản ứng thủy phân không có chất xúc tác.



Hình 4: Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của lnk theo 1000/T

Từ đồ thị xác định được $E_{a_{KXT}} = 162,503$ (kJ/mol), $E_{a_{LCR}} = 15,176$ (kJ/mol), $E_{a_{LPP}} = 72,156$ (kJ/mol) với hệ số tương quan tương ứng $R^2 = 0,953$ và $R^2 = 0,992$. Như vậy, $E_{a_{KXT}}$ cao hơn 10 lần $E_{a_{LCR}}$ và 2,3 lần $E_{a_{LPP}}$; và $E_{a_{LPP}}$ cao hơn khoảng 5 lần so với $E_{a_{LCR}}$. Điều này chỉ ra rằng khi tham gia thủy phân cơ chất dầu olive, LCR xúc tác quá trình tạo ra sản phẩm nhanh hơn LPP nhiều lần (trong cùng một điều kiện phản ứng) do chế phẩm lipase từ *Candida rugosa* tinh sạch hơn chế phẩm lipase từ *Porcine pancreas* nên hoạt tính xúc tác của LCR mạnh hơn LPP.

4 KẾT LUẬN

Từ kết quả thu được của bài nghiên cứu này đã tìm được một số tính chất cho điều kiện hoạt động tối ưu của chế phẩm LCR và LPP. So sánh cho thấy chế phẩm LCR hoạt động tốt hơn LPP. *Kết luận cụ thể được rút ra là cả hai enzyme đều bị ảnh hưởng bởi các ion Ca^{2+} , Mg^{2+} , và Al^{3+} ; và phản ứng thủy phân dầu olive xúc tác Candida rugosa và Porcine pancreas là bậc một.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barbara A. van Kuiken and W. David Behnke. 1994. *The activation of porcine pancreatic lipase by cis-unsaturated fatty acids*, Elsevier Science B.V, 148-160.
- Đặng Thị Thu, Ngô Tiến Hiền, Quyền Đình Thi, Phùng Thị Thủy, Hoàng Lan, Đỗ Biên Cương, Thiều Linh Thủy và Nguyễn Thị Sánh. 2004. *Nghiên cứu công nghệ sản xuất một số loại dầu béo bằng lipaza*, đề tài nhánh của nghiên cứu cấp nhà nước mã số: KC 04-07, Viện CN Thực Phẩm, 301, Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, HN.
- Ines Ben Rejeb, Jeannette Ben Hamida and Mohamed Gargouri. 2004. *Coupled-enzyme system for the determination of lipase activity*, Kluwer Academic Publishers.
- Julio C. Santos, Gisele F. M. Nunes, Ana B. R. Moreira, Victor H. Perez and Heizir F. de Castro. 2007. *Characterization of Candida rugosa Lipase Immobilized on Poly(N-methylolacrylamide) and Its Application in Butyl Butyrate Synthesis*, Engineering School of Lorena, University of São Paulo, Lorena, Brazil., Chem. Eng. Technol., 30, 1255–1261.
- Jyoti Vakhlu and Avneet Kour. 2006. *Yeasts lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning*, Electronic Journal of Biotechnology ISSN, 0717-3458.
- Nguyễn Thị Hương Nhân. 2009. *Khảo sát hoạt tính lipase thu nhận từ Aspergillus niger trước và sau khi cố định trên natriaginate và chitosan*, Luận văn tốt nghiệp, Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Nông Lâm TP. HCM.
- Soares, M. M. C. N.; Silva, R. and Gomes, E. 1999. *Screening of bacterial strains for pectinolytic activity characterization of the Pgase produced by Bacillus species*, Rev. Microbiol., 30, 229-303.