



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002325

(51)⁷ **C12Q 1/30**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00449

(22) 06/11/2018

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/01/2019 370A

(73) Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)
Số 334 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) Đinh Nho Thái (VN); Nguyễn Thị Hồng Loan (VN).

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT ENZYM CATALAZA TỪ GAN BÒ**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm enzym catalaza từ gan bò và chế phẩm chứa enzym catalaza thu được từ quy trình này. Trong đó quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước a) tạo hỗn dịch gan bò; b) loại bỏ protein tạp nhiễm; c) thu phân đoạn có hoạt tính catalaza; d) tinh sạch enzym catalaza; và e) thu chế phẩm enzym catalaza. Quy trình theo giải pháp hữu ích sử dụng kỹ thuật kết tủa phân đoạn theo nồng độ axeton và thẩm tách kết hợp sắc ký để loại bỏ tạp chất cho phép thu được enzym catalaza giữ được hoạt tính. Ngoài ra, giải pháp còn đề cập đến chế phẩm chứa enzym catalaza tinh sạch có hoạt độ từ 6.000-8.000 U/ml ổn định trong điều kiện môi trường.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, công nghệ enzym và protein, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất enzym catalaza từ gan bò để ứng dụng tạo chế phẩm sử dụng cho việc chống ôxy hóa cho thực phẩm và công nghiệp.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Enzym catalaza ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ oxidoreductaza; EC 1.11.1.6) có chức năng phân giải hydrogen peroxit (H_2O_2) thành nước và oxy, đây là một trong những enzym chống oxy hoá đóng vai trò quan trọng trong việc loại bỏ các gốc oxy hoá của tế bào. Các nghiên cứu đã cho thấy, enzym catalaza có nhiều ứng dụng trong y học như ức chế sự phá vỡ tế bào thần kinh, chết tế bào theo chương trình, chống viêm, lão hoá và kháng khối u. Nồng độ của catalaza cùng với một số enzym chống oxy hoá khác còn được xem như chỉ số để đánh giá các nhóm oxy hoạt động (reactive oxygen species: ROS) đã được sản sinh ra trong quá trình phát sinh bệnh ở người.

Enzym catalaza là một loại protein bao gồm bốn chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi polypeptit này có hơn 500 axit amin. Enzym này chứa bốn porphyrin heme (sắt), nhóm này cho phép các enzym xúc tác để phản ứng với H_2O_2 . Độ pH tối ưu để xúc tác của catalaza ở người là khoảng 7. Tuy nhiên, enzym này không bền, dễ bị tác động bởi các yếu tố ngoại cảnh và khó tinh sạch bằng các phương pháp tinh sạch thông thường.

Đã có nhiều phương pháp sản xuất enzym catalaza bằng cách chiết từ động vật và thực vật, ví dụ chiết từ cây phèn đen, táo, cây đầu muông ăn hoặc từ gan của động vật như dê, chó, bò và từ một số vi khuẩn. Phần lớn các phương pháp sản xuất này thường chiết và kết tủa catalaza chọn lọc trong môi trường $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kết hợp với các phương pháp sắc ký như lọc gel, trao đổi ion để thu catalaza tinh sạch, tuy nhiên kết quả cho thấy enzym được sản xuất bằng phương pháp này có độ tinh sạch chưa cao, còn nhiều tạp nhiễm ảnh hưởng đến hoạt tính enzym thu được, vì vậy cần thiết phải tìm ra quy trình để tách chiết và tinh sạch tốt hơn.

US 2834713 đã mô tả phương pháp chiết enzym catalaza từ gan động vật để ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm, trong đó gan động vật được nghiền, chiết trong các dung môi chứa nước. Theo đó gan được chiết trong etanol 70% ở -20°C , dịch được khuấy tại -5°C trong 2 giờ rồi huyền phù hóa trong nước đá ở 1°C . Tiếp đó ly tâm để thu phần dịch, quá trình loại bỏ protein tạp nhiễm được thực hiện

bằng các dung môi như natri axetat 0,075 mM, axit axetic 1N và trải qua các quá trình kết tinh, ly tâm phức tạp để thu được enzym có độ tinh sạch 83-95% với hiệu suất thu hồi enzym thấp, chỉ khoảng 0,04%.

US 2992167 đã mô tả phương pháp chiết enzym catalaza từ gan động vật, trong đó phương pháp chiết gan bò bằng các chất nhóm rượu như rượu butyl, isobutyl sau đó bằng cloroform trong khoảng pH từ 6-7. Tuy nhiên, phương pháp này cho hiệu suất thấp và còn nhiều tạp nhiễm.

CN 102559626A đã mô tả phương pháp chiết enzym catalaza từ gan bò Tây Tạng, trong đó gan bò được nghiền nhuyễn và chiết bằng nước khử ion theo tỷ lệ 1:6, pH khoảng 5,3-6, áp suất 0,08-0,09 Mpa ở nhiệt độ 30°C, tiếp đó ly tâm ở tốc độ 3.000 vòng/phút, sau đó sử dụng sắc ký loại trừ kích thước, thu các phân đoạn có kích thước khoảng 200 kDa, sau khi làm khô, thu được enzym catalaza. Tuy nhiên, phương pháp này thu enzym có hoạt tính không cao do được tiến hành ở nhiệt độ cao và sử dụng sắc ký loại trừ kích thước nên hiệu suất thu được không cao.

Tài liệu “Nghiên cứu tinh sạch và xác định một số tính chất của catalase từ *Bacillus subtilis* PY79” của Phạm Thu Hương và cộng sự đã mô tả phương pháp chiết catalaza từ vi khuẩn, trong đó enzym được kết tủa sơ bộ bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa, sau khi ủ, tiến hành ly tâm và chiết trên cột Q-sepharosa, thẩm tích trong đệm CH_3COONa 20mM, pH=4,8, tiếp đến cho lên cột CM-sepharosa để thu catalaza. Phương pháp này đã sử dụng kỹ thuật thẩm tách kết hợp với ly tâm để thu enzym catalaza tinh sạch. Tuy nhiên, phương pháp này cho thấy hoạt tính của enzym bị ảnh hưởng bởi các chất như NaN_3 , NaCl , FeCl_3 , FeSO_4 còn trong quá trình chiết. Kết quả thu được enzym catalaza có hoạt độ riêng khoảng 30.000 U/mg và enzym thu được không ổn định trong điều kiện bảo quản.

Do đó, cần có quy trình có khả năng sản xuất được chế phẩm enzym catalaza khả dụng, có độ tinh sạch, ổn định và có hoạt tính cao có thể ứng dụng để tạo chế phẩm sử dụng cho việc chống oxy hóa cho thực phẩm và công nghiệp.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là nhằm giải quyết các tồn tại nêu trên. Theo đó, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm enzym catalaza từ gan bò dùng chống oxy hóa cho thực phẩm, dược phẩm và công nghiệp và chế phẩm chứa enzym catalaza tinh sạch, ổn định trong điều kiện môi trường.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm enzym catalaza từ gan bò, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo hỗn dịch gan bò đồng nhất bằng cách thu nhận gan bò rồi cắt nhỏ, sau đó bổ sung dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,0 theo tỷ lệ gan bò/dung dịch đệm là 1/1,5 (trọng lượng/thể tích), sau đó nghiền nhỏ gan bò đến khi thu được hỗn dịch gan bò đồng nhất;

b) loại bỏ protein tạp nhiễm bằng cách ly tâm hỗn dịch gan bò với tốc độ 13.000 vòng/phút trong thời gian 30 phút ở 4°C thu dịch trong, tiếp đó bổ sung axeton 25%, và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C để loại bỏ protein tạp nhiễm kết tủa, sau đó bổ sung axeton 70% thu và hòa tan phần kết tủa bằng dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,0 rồi thẩm tách loại bỏ axeton thu phần kết tủa;

c) thu phân đoạn có hoạt tính catalaza bằng cách hòa tan phần kết tủa trong dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,5 rồi chuyển lên cột sắc ký trao đổi anion được nhồi gel DEAE-sepharosa, sau khi cân bằng với dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,5, rửa giải bằng gradien dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,5 với nồng độ NaCl từ 0 đến 0,3 M thu các phân đoạn có hoạt tính catalaza trên cơ sở xác định điện di trên gel polyacrylamit và hoạt tính phân giải cơ chất H₂O₂;

d) tinh sạch enzym catalaza bằng cách cô đặc các phân đoạn có hoạt tính catalaza và thẩm tách qua đệm trong dung dịch đệm natri axetat 10 mM, pH=4,5, phần dịch lọc sau đó được chuyển lên cột sắc ký được nhồi gel CM-sepharosa đã được cân bằng với dung dịch đệm natri axetat 10mM, pH=4,5 với gradien NaCl từ 0 đến 0,7 M thu phân đoạn chứa enzym catalaza đã được tinh sạch trên cơ sở kết quả điện di trên gel polyacrylamit và hoạt tính phân giải cơ chất H₂O₂; và

e) thu chế phẩm enzym catalaza bằng cách thẩm tách phân đoạn chứa hoạt tính enzym catalaza đã được tinh sạch trong dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,0 qua đệm, sau đó cô đặc enzym catalaza đến khi hoạt tính của enzym trong khoảng từ 6.000 - 8.000 U/ml, bổ sung 1 mM dithiothreitol và 5% glyxerol để thu chế phẩm enzym catalaza.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó quá trình thẩm tách phân đoạn chứa enzym catalaza được thực hiện với thể tích dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,0 gấp 50-100 lần thể tích phân đoạn chứa enzym catalaza.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm enzym thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó chế phẩm này bao gồm các thành phần như sau:

Enzym catalaza	6.000 - 8.000 U/ml
Dithiothreitol	1 mM
Glycerol	5%
Kali phosphat	10 mM, pH=7,0

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Ảnh chụp kết quả điện di SDS-PAGE các phân đoạn tinh sạch qua cột DEAE-sepharosa và CM sepharosa: 1. Thang chuẩn protein; 2. Dịch chiết gan bò sau khi sắc ký cột DEAE-sepharosa; 3. Phân đoạn có hoạt tính catalaza rửa giải từ cột DEAE-sepharosa và lên cột CM-sepharosa; 4. Phân đoạn catalaza tinh sạch từ CM-sepharosa.

Hình 2. Ảnh chụp kết quả sau khi thẩm tách các phân đoạn tinh sạch qua cột DEAE-sepharosa và CM sepharosa: 1. Thang chuẩn protein; 2. Dịch chiết gan bò sau khi sắc ký cột DEAE-sepharosa; 3. Phân đoạn có hoạt tính catalaza rửa giải từ cột DEAE-sepharosa và lên cột CM-sepharosa; 4. Phân đoạn catalaza tinh sạch từ CM-sepharosa. So sánh giữa kết quả ở phân đoạn 4 cho thấy enzym catalaza có tính đặc hiệu và tinh sạch hơn so với phân đoạn 3.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích nhằm làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm enzym catalaza từ gan bò và chế phẩm enzym catalaza thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm enzym catalaza từ gan bò, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) tạo hỗn hợp dịch gan bò; b) loại bỏ protein tạp nhiễm; c) thu phân đoạn có hoạt tính catalaza; d) tinh sạch enzym catalaza; và e) thu chế phẩm enzym catalaza.

Trong bước tạo hỗn dịch gan bò đồng nhất, gan bò tươi được thu nhận rồi cắt nhỏ. Theo đó, gan được cắt nhỏ đến kích thước khoảng 3x3 cm rồi bổ sung dung dịch

đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,0 theo tỷ lệ gan bò/dung dịch đệm là 1/1,5 (trọng lượng/thể tích). Sau khi nghiền nhỏ gan bò thu được hỗn dịch gan bò đồng nhất.

Trong bước loại bỏ protein tạp nhiễm, tiến hành ly tâm hỗn dịch gan bò thu được ở trên với tốc độ 13.000 vòng/phút trong thời gian 30 phút ở 4°C. Sau khi loại bỏ phần cặn lắng, thu dịch trong và bổ sung dung dịch axeton 25% và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C để loại bỏ protein tạp nhiễm kết tủa, thu dịch nổi. Sau đó bổ sung axeton 70% vào dịch nổi, thu và hòa tan phần kết tủa bằng dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,0 rồi thẩm tách loại bỏ axeton. Theo đó, bằng cách sử dụng dung dịch axeton với nồng độ khác nhau để loại bỏ protein tạp nhiễm, các protein có kích thước lớn hơn và nhỏ hơn kích thước của enzym catalaza sẽ được loại bỏ phần lớn, phân đoạn có hoạt tính catalaza thu được sẽ dễ dàng tinh sạch với hiệu suất cao.

Trong bước thu phân đoạn có hoạt tính catalaza, tiến hành hòa tan phần kết tủa thu được sau khi thẩm tách trong dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,5. Tiếp đó chuyển lên cột sắc ký được nhồi gel DEAE-sepharosa. Sau khi cân bằng với dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,5, rửa giải bằng gradien dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,5 với nồng độ NaCl từ 0 đến 0,3 M. Theo đó các phân đoạn có hoạt tính được thu hồi trên cơ sở phân giải cơ chất H₂O₂ và kết quả điện di trên gel polyacrylamit có SDS.

Trong bước tinh sạch enzym catalaza bằng cột sắc ký trao đổi cation, tiến hành cô đặc các phân đoạn có hoạt tính catalaza thu được ở trên và thẩm tách qua đệm trong dung dịch đệm natri axetat 10 mM, pH=4,5. Theo một phương án ưu tiên, quá trình thẩm tách phân đoạn chứa enzym catalaza này được thực hiện với thể tích dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,0 gấp 50-100 lần thể tích phân đoạn chứa enzym catalaza.

Sau khi tiến hành sắc ký trao đổi anion DEAE-sepharosa, phần dịch lọc được chuyển lên cột sắc ký được nhồi gel CM-sepharosa đã được cân bằng với dung dịch đệm natri axetat 10mM, pH=4,5. Tiến hành rửa giải với gradien NaCl từ 0 đến 0,7 M thu phân đoạn chứa enzym catalaza được tinh sạch sơ bộ trên cơ sở phân giải cơ chất H₂O₂ và kết quả điện di trên gel polyacrylamit có SDS.

Trong bước thu chế phẩm enzym catalaza, tiến hành thẩm tách phân đoạn chứa enzym catalaza thu được ở trên bằng dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,0 qua đệm. Sau khi cô đặc thu được enzym catalaza tinh sạch. Tiếp đó chuẩn độ enzym

trong dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,0 đến khoảng từ 6.000 - 8.000 U/ml. Để ổn định enzym, bổ sung 1mM dithiothreitol và 5% glyxerol để thu chế phẩm enzym catalaza được ổn định.

Theo một khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm enzym thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó chế phẩm này bao gồm các thành phần như sau:

Enzym catalaza	6.000 - 8.000 U/ml
Dithiothreitol	1 mM
Glycerol	5%
Kali phosphat	10 mM, pH=7,0

Chế phẩm enzym catalaza theo giải pháp hữu ích có thể được sử dụng trong các ứng dụng liên quan đến y học, thực phẩm hoặc các phương pháp hóa sinh liên quan đến phản ứng xúc tác phân giải preoxit.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Sản xuất chế phẩm enzym catalaza từ gan bò

Cắt nhỏ 65 g gan bò tươi thành các viên nhỏ 3cm x 3cm, tiếp đó bổ sung 100 ml dung dịch đệm bao gồm kali phosphat 20 mM, pH 7,5 và nghiền nhỏ gan bằng máy xay sinh tố đến khi đồng nhất. Xay 5 lần, mỗi lần 30 giây; đảm bảo mẫu được giữ ở nhiệt độ 4°C. Sau đó tiến hành ly tâm hỗn hợp đồng nhất 13.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C. Sau khi loại bỏ kết tủa, thu được 105 ml dịch nổi.

Bổ sung 35 ml axeton 100% vào dịch nổi để đạt nồng độ cuối cùng 25%, giữ ở 4°C trong vòng 1-2 giờ và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 20 phút, 4°C, loại bỏ kết tủa thu được 100 ml dịch nổi.

Tiếp đó bổ sung 150 ml axeton 100% để nồng độ cuối cùng đạt 70%, giữ ở 4°C trong vòng 2 giờ để kết tủa protein tạp. Sau đó ly tâm 13.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C, loại bỏ phần dịch, thu phần tủa protein có catalaza.

Hoà phần kết tủa tan hoàn toàn trong 150 ml đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,5 để loại bỏ một số loại axit amin và protein không mong muốn và thẩm tích dịch kết tủa hòa tan trong 1 lít kali phosphat 20 mM, pH=7,5. Thay dung dịch 3 lần, mỗi lần 2 giờ, lần cuối để qua đêm nhằm loại bỏ axeton. Màng thẩm tích sử dụng là màng xenlulozơ.

Kết quả từ 65 g gan bò đã thu nhận được tổng số 2,086 g protein của phân đoạn có catalaza với nồng độ 14,9 mg/ml. Protein tổng số có hoạt tính phân giải H_2O_2 với hoạt độ riêng 2030,9 U/mg.

Tiếp đó, chuyển phần dịch này lên cột DEAE-sepharoza đã được nhồi với thể tích 130 ml trên cột XK 26/40 và cân bằng với đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,5. Toàn bộ quá trình tinh sạch được tiến hành trên máy AKTAprime (GE). Tốc độ dòng chảy ở tất cả các bước cân bằng, rửa và rửa chiết đều là 2 ml/phút; trừ bước gắn mẫu, tốc độ là 1 ml/phút. Sau bước gắn 130 ml dung dịch gan bò lên cột, các protein gắn không đặc hiệu hoặc không gắn với cột sẽ được rửa đến khi độ hấp thụ của mẫu tại bước sóng $A_{280} \text{ nm} < 0,05$. Các protein gắn trên cột được rửa chiết bằng 1,5 l gradien của dung dịch kali phosphat 20 mM, pH=7,5 với nồng độ NaCl từ 0 đến 0,3 M. Tiến hành điện di SDS-PAGE và xác định hoạt tính tất cả các phân đoạn gắn và không cột DEAE-sepharoza. Kết quả điện di SDS-PAGE các phân đoạn tinh sạch qua cột DEAE-sepharoza được thể hiện trên Hình 1, trong đó (1) thang chuẩn protein; (2) dịch chiết gan bò sau khi sắc ký cột DEAE-sepharoza; (3) phân đoạn có hoạt tính catalaza rửa giải từ cột DEAE-sepharoza và lên cột CM-sepharoza; (4) phân đoạn catalaza tinh sạch từ CM-sepharoza.

Các phân đoạn được kiểm tra hoạt tính phân giải cơ chất H_2O_2 và điện di trên gel polyacrylamit có SDS, thu các phân đoạn có hoạt tính catalaza và băng protein 60 kDa của catalaza (các phân đoạn từ 10 đến 147) với tổng thể tích 700 ml. Nồng độ protein 0,6 mg/ml. Tiếp đó cô đặc mẫu 5 lần bằng hệ thống máy lọc tiếp tuyến AKTA flux (GE, Hoa Kỳ). Sau đó thẩm tích qua đêm trong đệm natri axetat 10 mM, pH=4,5 thu được 150 ml dịch lọc.

Phần dịch lọc này được chuyển lên lên cột XK 16/20 có 30 ml gel CM-sepharoza đã được cân bằng với đệm đệm natri axetat 10 mM, pH=4,5. Tiếp đó rửa giải bằng 360 ml đệm natri axetat 10 mM, pH=4,5 với gradien NaCl từ 0 đến 0,7 M. Tiến hành điện di trên gel polyacrylamit có SDS và xác định hoạt tính phân giải cơ chất H_2O_2 của tất cả các phân đoạn thu được. Kết quả điện di SDS-PAGE các phân đoạn sau khi thẩm tách qua cột DEAE-sepharoza được thể hiện trên Hình 2, trong đó (1) thang chuẩn protein; (2) dịch chiết gan bò sau khi sắc ký cột DEAE-sepharoza; (3) phân đoạn có hoạt tính catalaza rửa giải từ cột DEAE-sepharoza và lên cột CM-sepharoza; 4. Phân

đoạn catalaza tinh sạch từ CM-sepharoza. So sánh giữ kết quả ở phân đoạn (4) cho thấy enzym catalaza có tính đặc hiệu và tinh sạch hơn so với phân đoạn (3).

Các phân đoạn có hoạt tính catalaza (từ 49 đến 72) được thu lại, cô đặc mẫu 5 lần bằng hệ thống máy lọc tiếp tuyến AKTA flux (GE, Hoa Kỳ), sau đó thẩm tích qua đêm trong đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,0. Kết quả thu được 35,4 mg enzym catalaza. Kết quả xác định bằng phương pháp điện di trên gel SSD-PAGE, kiểm tra phân đoạn có kích thước 60kDa cho thấy sản phẩm thu được gồm enzym catalaza có độ tinh sạch 95%. Hoạt độ riêng được xác định trên cơ sở phân giải H_2O_2 bằng phương pháp chuẩn là 79,277 U/mg protein. Sau khi chuẩn độ enzym đến khoảng 6.000 - 8.000 U/ml, bổ sung 1mM dithiothreitol và 5% glyxerol để thu chế phẩm enzym catalaza, chế phẩm này được bảo quản ở nhiệt độ $-20^{\circ}C$ cho đến khi sử dụng.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất chế phẩm chứa enzym catalaza theo giải pháp hữu ích cho phép tạo được chế phẩm enzym tinh sạch có hoạt độ ổn định. Bằng kỹ thuật kết tủa với nồng độ axeton khác nhau, cho phép loại bỏ được các protein tạp nhiễm ảnh hưởng đến hoạt độ enzym. Ngoài ra, bằng kỹ thuật sắc ký cột, cho phép loại bỏ các thành phần tạp nhiễm. Do đó, độ tinh sạch của enzym thu được từ gan bò tăng lên tới 60 lần, hoạt độ riêng lên tới 79,277 U/mg.

Quy trình sản xuất chế phẩm enzym catalaza từ gan bò cho phép tạo ra được chế phẩm enzym ổn định, có hoạt độ cao, an toàn và có đặc tính sinh khả dụng, có thể ứng dụng trong các thử nghiệm liên quan đến y học, phân tích, thực phẩm và các lĩnh vực có liên quan đến phản ứng xúc tác phân giải H_2O_2 .

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm enzyme catalaza từ gan bò, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo hỗn dịch gan bò đồng nhất bằng cách thu nhận gan bò rồi cắt nhỏ, sau đó bổ sung dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,0 theo tỷ lệ gan bò/dung dịch đệm là 1/1,5 (trọng lượng/thể tích), sau đó nghiền nhỏ gan bò đến khi thu được hỗn dịch gan bò đồng nhất;

b) loại bỏ protein tạp nhiễm bằng cách ly tâm hỗn dịch gan bò với tốc độ 13.000 vòng/phút trong thời gian 30 phút ở 4°C thu dịch trong, tiếp đó bổ sung axeton 25%, và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C để loại bỏ protein tạp nhiễm kết tủa, sau đó bổ sung axeton 70% thu và hòa tan phần kết tủa bằng dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,0 rồi thẩm tách loại bỏ axeton thu phần kết tủa;

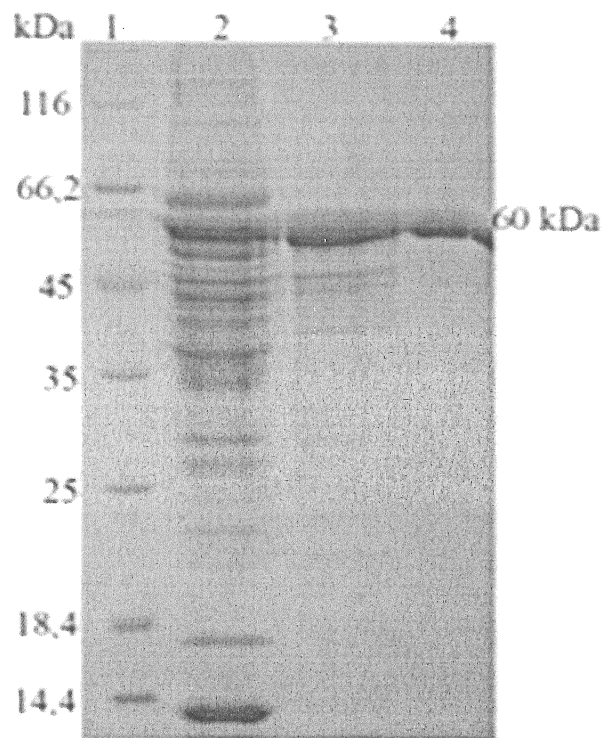
c) thu phân đoạn có hoạt tính catalaza bằng cách hòa tan phần kết tủa trong dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,5 rồi chuyển lên cột sắc ký trao đổi anion được nhồi gel DEAE-sepharosa, sau khi cân bằng với dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,5, rửa giải bằng gradien dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,5 với nồng độ NaCl từ 0 đến 0,3 M thu các phân đoạn có hoạt tính catalaza trên cơ sở xác định điện di trên gel polyacrylamit và hoạt tính phân giải cơ chất H_2O_2 ;

d) tinh sạch enzyme catalaza bằng cách cô đặc các phân đoạn có hoạt tính catalaza và thẩm tách qua đệm trong dung dịch đệm natri axetat 10 mM, pH=4,5, phần dịch lọc sau đó được chuyển lên cột sắc ký được nhồi gel CM-sepharosa đã được cân bằng với dung dịch đệm natri axetat 10mM, pH=4,5 với gradien NaCl từ 0 đến 0,7 M thu phân đoạn chứa enzyme catalaza đã được tinh sạch trên cơ sở kết quả điện di trên gel polyacrylamit và hoạt tính phân giải cơ chất H_2O_2 ; và

e) thu chế phẩm enzyme catalaza bằng cách thẩm tách phân đoạn chứa hoạt tính enzyme catalaza đã được tinh sạch trong dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,0 qua đệm, sau đó cô đặc enzyme catalaza đến khi hoạt tính của enzyme trong khoảng từ 6.000 - 8.000 U/ml, bổ sung 1 mM dithiothreitol và 5% glyxerol để thu chế phẩm enzyme catalaza.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quá trình thẩm tách phân đoạn chứa enzyme catalaza được thực hiện với thể tích dung dịch đệm kali phosphat 20 mM, pH=7,0 gấp 50-100 lần thể tích phân đoạn chứa enzyme catalaza.

HÌNH 1



HÌNH 2

