

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

BÁO CÁO TỔNG KẾT KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

Đề tài

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ ENZYM TRONG
CHẾ BIẾN MỘT SỐ NÔNG SẢN THỰC PHẨM
MÃ SỐ: KC 04-07**

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

Đề tài nhánh

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN, SINH TỔNG HỢP
ENZYM COLAGENAZA VÀ ỨNG DỤNG TRONG THỰC PHẨM**
Chủ nhiệm đề tài nhánh cấp nhà nước: TS. Tô Kim Anh

Hà Nội, 10 – 2004

Bản quyền:

Đơn xin sao chép toàn bộ hoặc từng phần tài liệu này phải gửi đến Viện trưởng Viện Công nghiệp Thực phẩm, trừ trong trường hợp sử dụng với mục đích nghiên cứu

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

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

Đề tài cấp Nhà nước

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

MÃ SỐ: KC 04-07

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

Đề tài nhánh cấp Nhà nước

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN, SINH TỔNG HỢP
ENZYM COLAGENAZA VÀ ỨNG DỤNG TRONG THỰC PHẨM**

Chủ nhiệm đề tài nhánh cấp nhà nước: TS. Tô Kim Anh

Hà Nội, 10 – 2004

Bản thảo viết xong tháng 7 – 2004

***Tài liệu này được chuấn bị trên cơ sở kết quả thực hiện đề tài cấp
Nhà nước, Mã số: KC 04-07***

DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI THỰC HIỆN

TS. Tô Kim Anh Đại học Bách khoa Hà Nội

TS. Quảng Lệ Hà Đại học Bách khoa Hà Nội

Nguyễn thị Thanh Tâm Đại học Bách khoa Hà Nội

KS. Nguyễn Thanh Hà Đại học Bách khoa Hà Nội

KS. Trần Khánh Lộc Đại học Bách khoa Hà Nội

KS. Mai Kiều Linh Đại học Bách khoa Hà Nội

TÓM TẮT NỘI DUNG ĐỀ TÀI

1. Mục đích đề tài

Mục đích của đề tài là tuyển chọn nguồn collagenaza an toàn từ vi sinh vật, thu nhận và tìm hiểu các đặc tính của enzym; Tìm hiểu khả năng sử dụng enzym này trong thực tế sản xuất.

2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp vi sinh vật:

- Phương pháp vòng thủy phân phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng phân giải collagen
- Các kỹ thuật nuôi và đánh giá cạnh tranh vi khuẩn

Phương pháp hoá sinh:

- Xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Lowry;
- Xác định hoạt độ enzym
- Xác định hàm lượng nhóm $-NH_2$ tự do bằng phương pháp Ninhydrin của Rosen
- Điện di trên gel polyacrylamit theo phương pháp của Laemmli; Sắc ký lọc gel trên sephadex -G75 theo phương pháp của Andrew
- Các kỹ thuật tinh chế enzym bằng cách sử dụng phối hợp các biện pháp siêu lọc sắc ký trao đổi ion và sắc ký lọc gel. Kiểm tra sản phẩm trên SDS-PAGE kiểm tra khả năng gây dị ứng của sản phẩm phân giải (phản ứng ELISA)

Phương pháp khác:

Các phương pháp công nghệ sản xuất bittet, xúc xích thịt bò cấp thấp, sản xuất nước mắm.

3. Kết quả đạt được

1. Đã phân lập và lựa chọn được chủng vi khuẩn không sinh độc tố *Bacillus subtilis* FS2 được phân lập từ chượp cá và chủng hoạt động nhất trong bộ sưu tập.

2. Hoàn thiện 1 quy trình thu nhận chế phẩm enzym với môi trường nhân giống, môi trường tổng hợp enzym, thời gian tối thích thu nhận enzym với cơ chất là genlatin-polypepton-gkucose (0,3%-0,75%-1%), NaCl 1%, 35-37 °C, pH7,4 enzym thu nhận oqr giữa pha cân bằng (28h).
3. Đề xuất 01 quy trình công nghệ thu nhận chế phẩm enzym tinh khiết. Hoàn thiện 02 quy trình thu nhận en zym kỹ thuật. Các quy trình này cho phép thu hồi enzym với hiệu suất 50-59%.
4. Đã xác định được các đặc tính cơ bản của co;agenaza của *B. subtilis* FS2; Điều kiện tối ưu cho phản ứng enzym : 50°C, pH 9; enzym bền ở nhiệt độ cao (mất 15% và 35 % hoạt độ ở 60°C và 65°C), bền trong vùng pH 5-10; KLPT của enzym: 125kDa, bao gồm hai dưới-đơn vị có KLPT mỗi phần 60 kDa; cơ chất đặc hiệu: collagen và gelatin.
5. Chế phẩm enzym được làm ổn định với các chất bổ sung và ổn định khác nhau, dưới dạng các chế phẩm kỹ thuật cho các mục đích sử dụng khác nhau: Tinh bột biến tính, Ca^{+2} , Chitosan... Chế phẩm được thử nghiệm ổn định hoạt tính trong thời gian bảo quản.
6. Khảo sát tính an toàn của chế phẩm cho thấy chế phẩm đạt tiêu chuẩn an toàn.
7. Đã nghiên cứu thăm dò khả năng sử dụng collagenaza từ *B. Subtilis* FS2 để làm giảm tính gây dị ứng của một số protein thực phẩm làm cơ sở tạo ra các sản phẩm không dị ứng.
8. Sử dụng collagenaza làm tăng chất lượng thịt chứa nhiều collagen, nâng cao giá trị gia tăng cho sản phẩm. Collagenaza được chứng minh tính đặc hiệu trong làm mềm thịt.
9. Nghiện cứu thăm dò khả năng sử dụng collagenaza trong sản xuất nước mắm cho thấy enzym thủy phân da cá chỉ sau một ngày nuôi cấy cùng FS2. Hàm lượng axit amin trong chượp cá tăng 25% khi bổ sung enzym trong chượp. Kết quả này cho phép nâng cao hiệu suất thu hồi và rút ngắn thời gian lọc nước mắm.

10. Thử nghiệm sản xuất một số sản phẩm: Chế phẩm enzym kỹ thuật, gia vị chứa collagenaza, xúc xích và bít tết từ thịt bò chứa nhiều collagen.

Mục lục

MỞ ĐẦU	8
NỘI DUNG BÁO CÁO	9
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU COLAGENAZA	10
1.1. Khái niệm về collagenaza	10
1.2. Tình hình nghiên cứu collagenaza trên thế giới	10
1.2.1. Tìm kiếm nguồn collagenaza	10
1.2.2. Khả năng tổng hợp collagenaza	12
1.2.3. Một số tính chất cơ bản của các collagenaza đã được phát hiện	12
1.3. Nghiên cứu về collagenaza ở Việt Nam	14
1.4. Khả năng sử dụng collagenaza	14
1.4.1. Sử dụng collagenaza trong nghiên cứu collagen	14
1.4.2. Sử dụng collagenaza trong công nghiệp thực phẩm	14
1.4.3. Sử dụng collagenaza trong y tế- dược- mỹ phẩm	17
Chương II. Lựa chọn đối tượng và vấn đề nghiên cứu	19
2.1. Đối tượng nghiên cứu	19
2.2. Vấn đề nghiên cứu	20
Chương III. Phương pháp nghiên cứu	21
3.1. Vật liệu, thiết bị	21
3.1.1. Vật liệu Hoá chất	21
3.1.2. Thiết bị	22
3.2. Phương pháp nghiên cứu	22
3.2.1. Các phương pháp vi sinh vật	22
3.2.2. Các phương pháp hoá sinh	23
3.2.3. Nghiên cứu ứng dụng	24
CHƯƠNG IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	27
4.1. Phân lập tuyển chọn và định tên vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp collagenaza	27

4.1.1. Phân lập hệ vi khuẩn tổng hợp collagenaza	27
4.1.2. Định tên Vi khuẩn	28
4.2. Nghiên cứu quy trình sinh tổng hợp collagenaza từ <i>B. subtilis</i> FS-2	28
4.2.1. ảnh hưởng của cơ chất lên sự sinh trưởng của vi khuẩn	28
4.2.2. Nghiên cứu tổng hợp cảm ứng collagenaza bằng <i>B. subtilis</i> FS-2	29
4.2.3. ảnh hưởng của NaCl	32
4.3. Động thái tạo thành collagenaza	34
4.4. Nghiên cứu quy trình thu hồi và tinh chế enzym	35
4.4.1. Quy trình thu nhận chế phẩm enzym tinh khiết	35
4.4.2. Quy trình thu nhận chế phẩm enzym kỹ thuật	39
4.5. Nghiên cứu tính chất của collagenaza	42
4.5.1. Khối lượng phân tử	42
4.5.2. ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính và tính ổn nhiệt của enzym	42
4.5.3. ảnh hưởng của pH lên hoạt độ và tính ổn định pH của enzym	44
4.5.4. Tính đặc hiệu cơ chất	45
4.6. Nghiên cứu ứng dụng	47
4.6.1. Kiểm định tính an toàn của chế phẩm enzym	47
4.6.2. Nghiên cứu ổn định enzym	47
4.6.3. Thử nghiệm khả năng phân giải collagen và làm mềm thịt	49
4.6.4. Thử nghiệm khả năng phân giải collagen da cá của enzym và FS 2	52
4.6.5. Khả năng sử dụng collagenaza trong phân giải một số protein dị ứng	53
4.6.6. Thử nghiệm sản xuất một số sản phẩm thử nghiệm	54
Chương V. Đánh giá kết quả	56
5.1. Độ tin cậy của kết quả	56
5.2. Tính ổn định của công nghệ	56
5.3. kết quả đào tạo	56
5.4. Đánh giá toàn diện	56
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	57
TÀI LIỆU THAM KHẢO	60
PHẦN PHỤ LỤC	65

MỞ ĐẦU

Trong hệ thống protein động vật, collagen. Hàm lượng collagen trong cơ thể động vật rất lớn, chiếm hơn 30% thành phần các protein khung mạng của cơ thể và là cơ chất bền, khó phân giải nhất trong số các protein. Collagenaza là enzym duy nhất có khả năng phân giải collagen khi cơ chất này ở trạng thái nguyên thủy. Việc tìm kiếm và sản xuất Collagenaza trở nên vô cùng hấp dẫn, đặc biệt là trong những năm gần đây khi mà ngành công nghiệp có vị trí quan trọng

Cho tới nay, nhiều vi sinh vật, chủ yếu là vi khuẩn được phát hiện là có khả năng tổng hợp Collagenaza. Các nhà nghiên cứu đã phân lập được từ đất, nước biển và một số nguồn khác một số vi khuẩn có khả năng tổng hợp Collagenaza. Tuy nhiên, đa số các vi sinh vật sinh Collagenaza đã được phát hiện lại là các vi sinh vật gây bệnh hoặc sinh độc tố (*Clostridium*, *Vibrio* hay *Pseudomonas*). Điều này làm cho việc sử dụng Collagenaza bị hạn chế hoặc các chế phẩm enzym nhất thiết phải hoàn toàn tinh khiết, vấn đề trở ngại chủ yếu cho sự ra đời chế phẩm enzym. Việc tìm kiếm nguồn Collagenaza an toàn và khai thác sử dụng chúng là rất có ý nghĩa về mặt khoa học và ứng dụng.

Trong quá trình nghiên cứu thăm dò, chúng tôi đã phân tách từ các thực phẩm lên men truyền thống thu nhập ở Việt Nam và các nước lân cận một tập hợp các vi khuẩn có khả năng tổng hợp Collagenaza. Vấn đề nghiên cứu được đặt ra trong khuôn khổ đề tài KC 04-07 là:

"Nghiên cứu phân lập tuyển chọn và sinh tổng hợp enzym Collagenaza và ứng dụng trong thực phẩm"

NỘI DUNG BÁO CÁO

CHƯƠNG I:

TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU COLAGENASE

1.1 Khái niệm về collagenase

Collagenase là enzym có khả năng thủy phân liên kết peptit dạng poly – L- prolin đặc trưng trong vùng xoắn của collagen ở trạng thái tự nhiên của cơ chất.

Các proteaza có thể thủy phân hạn chế collagen tự nhiên nhưng chỉ tại phần cuối của chuỗi xoắn có α ở ngoài vùng xoắn đặc trưng của collagen, không có khả năng tấn công các liên kết ở trong vùng xoắn của collagen không biến tính.

1.2. Tìm kiếm nguồn collagenase

Collagenase từ Eucaryotae có khả năng phân cắt hạn chế và đặc biệt các sợi collagen. Năm 1962, lần đầu tiên các nhà nghiên cứu đã thành công trong công việc tổng hợp collagenase từ canh trường nuôi cấy của nòng nọc không chưa huyết thanh. Kể từ điểm mốc này, nhiều nghiên cứu sau đó thu

được các collagenase từ các vi sinh vật biển [44], từ các động vật lưỡng cư, côn trùng và các động vật có vú cũng như khẳng định tác dụng ức chế của huyết thanh lên sự tổng hợp collagenase đối với các mô của động vật nhân chuẩn mà Gross là người đầu tiên phát hiện ra. Hầu hết các collagenase từ các mô khác nhau của người đều có đặc tính gần tương tự nhau và cùng tồn tại ở dạng tiền enzym. Collagenase ở một số cơ của người là các enzym kim loại. Từ năm 1981, collagenase từ da người đã được tinh chế và xác định các đặc tính, và đến năm 1986, cấu trúc bậc nhất của enzym này đã được xác định [53]. Các nghiên cứu collagenase từ da người còn được tiến hành xa hơn với mục đích xác định các nhân gây tổng hợp cảm ứng collagenase in situ nhằm tăng cường quá trình đổi mới các mô bị thương.

Phát hiện mới đây nhất về nguồn enzym collagenase của mô thực vật từ quả kiwi. Theo tác giả, enzym này được coi như một tác nhân mới bên cạnh tác dụng của các proteaza khác được sử dụng trong quá trình làm mềm thịt.

Collagenase của *Clostridium histolyticum* là đại diện collagenase và vi sinh vật. Vì thế, ngoài tên gọi collagenase vi sinh vật, chúng còn có các tên gọi khác như *Clostridium histolyticum* collagenase, Clostridipeptidaza A, collagenase A hay collagenase I [40], [41].

Các phát hiện khởi đầu về collagenase của vi sinh vật thuộc về Mashmann khi ông lần đầu tiên phát hiện ra collagenase của *Clostridium histolyticum* vào năm 1937. Tiếp theo quan sát này, khoảng 20 năm sau đó, các nghiên cứu về collagenase lần lượt được ông bố. Bidwell và Heinigen, MacLennan và cộng sự và Debellis và các cộng sự đã công bố các công trình nghiên cứu rất có ý nghĩa về các chế phẩm collagenase của họ mà sau này được biết đến với tên gọi Clostridiopeptidaza A, Clostridipeptidaza B, cũng được William và cộng sự thông báo trong bài viết của họ. Cả enzym trên sau này được gọi là collagenase A collagenase B và trở thành các collagenase đầu tiên được biết đến dưới dạng thương phẩm. Các nghiên cứu

về collagenase của *C. histolyticum* được tiếp tục bởi nhiều tác giả khác nhau như Gallop và cộng sự [49], Gilles và cộng sự [52], Yoshida và các tác giả khác. Cho tới năm 1962 và nhiều năm sau đó, hầu hết các nghiên cứu tập trung vào tính chất collagenase của *C. histolyticum* [31].

Vào những năm sau này, việc phát hiện các collagenase và các vi sinh vật khác cũng được công bố. Điển hình là nghiên cứu về collagenase của một loại vi khuẩn *Vibrio B – 30* và của *Achromobacter iophagus* [52].

Welton và Woods đã phân lập được từ da động vật sống một vi khuẩn hiếu khí, chịu muối, có khả năng tổng hợp collagenase, định tên là *Achromobacter iophagus*, sau này được xác định lại là *Vibrio alginolyticus* chemovar *iophagus*. Sau đó, Keil và các cộng sự đã tinh chế được canh trường *A. iophagus* một collagenase có tính chất tương tự như của *C. histolyticum* nhưng có ái lực đối với collagenase tự nhiên và các peptide tổng hợp cao hơn các enzym nhóm Clotridium đã được công bố.

Ngoài các collagenase điển hình vừa dẫn ra trên đây, còn có thể tìm thấy các công bố về collagenase của một số vi sinh vật khác như *Pseudomonas marinoglutinosa*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus alvei* DC –1, *Bacillus cereus*, *Streptomyces* sp [38], *Cytophaga* sp . L43 –1. Hầu hết các vi khuẩn kể trên được phân lập từ tất, một số từ hệ vi sinh vật biển và từ da động vật chưa thuộc.

1.2.2. Khả năng tổng hợp collagenase.

Phần lớn các collagenase được nghiên cứu thuộc vào enzym ngoại bào. Năm 1975, việc phát hiện khả năng cảm ứng collagenase ngoại bào ở *Vibrio alginolyticus* đã làm cho chủng vi khuẩn này có sự hấp dẫn đặc biệt. Một năm sau đó, Keil và các cộng sự đã khẳng định khả năng tổng hợp cảm ứng collagenase và proteaza ở *Vibrio alginolyticus* bởi các chất có KLPT cao của các enzym này. Hai năm sau, collagenase từ *Vibrio B- 3-* cũng được chứng minh là enzym được tổng hợp cảm ứng bởi collagen và các

sản phẩm thủy phân của cơ chất này. Như vậy khả năng thu nhận collagenase từ sinh vật có thể điều kiện được với nguyên tắc tổng hợp cảm ứng.

1.2.3. Một số tính chất cơ bản của các collagenase đã được phát hiện.

Kích thước và cấu trúc phân tử enzym

Nhìn chung, các collagenase là những protein có KLPT lớn và có cấu trúc phân tử không giống nhau. Những năm về sau này, phương pháp xác định kích thước phân tử của enzym chủ yếu là phương pháp điện di trên gel polyacrylamit khi có mặt SDS và/ hoặc phương pháp lọc gel được tiến hành với enzym ở trạng thái tinh khiết.

Phân tử collagenase có thể được tạo nên các dưới - đơn vị. Collagenase A với KLPT 100 kDa được phát hiện là bao gồm 4 dưới - đơn vị không có hoạt tính enzym với tổng lượng mỗi phần là 25 kDa [102], Vibrio B- 30 bao gồm hai dưới - đơn vị có KLPT không giống nhau 24kDa và 28kDa. Một số collagenase vi sinh vật cũn như collagenase của mô tồn tại dưới dạng isozim như phức hợp collagenase của *C.histoliticum*: α -collagenase (68kDa), β -collagenase (115kDa), γ - collagenase (79kDa), δ -collagenase (100kDa), ε -collagenase (110kDa), ξ -collagenase (125kDa) [31]; từ *A.alginolyticus* có ba dạng isozim có KLPT khác nhau là 110kDa, 90 kDa và 70 kDa, từ *Vibrio alginolyticus* chemovar *iophagus* có ba collagenase với KLPT lần lượt là 110,90 và 70 kDa. Trong canh trường của *Streptomyces* sp. người ta cũng phân tách được hai dạng isozim có trọng lượng gần nhau là 90 kDa và 90kDa – 110kDa [38].

Độ bền của enzym.

Đa số các enzym đã được công bố có pH hoạt động ở khoảng trung tính hoặc hơi kiềm (pH 7 –8). Tuy thế, khả năng hoạt động của chúng cũng

không vượt quá mức pH trung tính. Colagenase từ *B.alvei* DC- 1 được phát hiện là hoạt động trong vùng pH axit yếu cho tới trung tính (4m5 – 7). Đây là enzym đầu tiên trong số các colagenase đã biết có khả năng hoạt động trong vùng axit yếu. Nhiệt độ hoạt động thích hợp của các colagenase thường là dưới 40⁰C [42], [4]. Các enzym này hầu như bị giảm phần lớn hoạt tính khi tăng nhiệt độ lên trên 45⁰C [21], [43]. Đặc biệt trong trường hợp của colagenase từ *Vibrio* B- 30, enzym này bị mất tới 94% hoạt tính khi tăng nhiệt độ tới 45⁰C.

Tính đặc hiệu của enzym .

Hầu hết các colagenase có tính đặc hiệu cao đối với collagen. Đa phần các enzym tách được không kèm theo hoạt tính với casein hoặc hemoglobin [21], trừ trường hợp enzym từ *Pseudomonas* sp ., hai hoạt tính colagenase và caseinaza luôn đi kèm.

Colagenase từ vi khuẩn có khả năng phân cắt tích cực hơn so với các enzym của mô. Clostridiopeptidaza A có thể tác dụng tại 200 điểm trên một chuỗi xoắn α trong khi colagenase của nòng nọc cóc chỉ có khả năng phân cắt chuỗi xoắn tại một điểm duy nhất.

Colagenase của *C.histolyticum* có khả năng mở chuỗi xoắn α ở liên kết X – Glycin trong trình tự Xả hội Gly-Pro- Y, tương tự như colagenase của *Vibro alginolyticus* chemovar iophagus. Tương tự, colagenase từ *Vibrio* B- 3- phân cắt collagen theo cùng một trình tự như colagenase từ *C.histolyticum*. Tuy nhiên enzym này có khả năng phân cắt các loại collagen khác nhau tốt hơn các enzym từ *C.histolyticum*.

1.3. Nghiên cứu về colagenase ở Việt Nam

Ở Việt Nam, có rất ít nghiên cứu về collagenase. Đã có một vài thử nghiệm sử dụng collagenase trong điều trị bỏng từ collagenase thương phẩm tại Viện bỏng quốc gia mà chưa có nghiên cứu nào về khả năng thu nhận collagenase. Công trình nghiên cứu này là công trình nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam về collagenase.

1.4. Khả năng sử dụng collagenase.

Các khả năng collagenase dựa trên đặc tính hiệu cao của enzym khi nó chỉ phân cắt các liên kết petít nhất định có trong collagen mà không làm ảnh hưởng tới các prôtein khác. Các phế phẩm collagenase có thể được sử dụng hoặc ở dạng tinh khiết hoặc ở dạng chế phẩm không hoàn toàn tinh khiết hay có chứa các hoạt tính proteaza khác khi mục tiêu là phân giải một phần cơ chất collagen và protein nói chung. Tuy nhiên, do không ở dạng chế phẩm tinh khiết, đòi hỏi các collagenase này phải không chứa các chất có độc tính và đạt đủ mức độ an toàn cho việc sử dụng, đặc biệt là khi sử dụng cho thực phẩm.

1.4.1. Sử dụng collagenase trong nghiên cứu collagen.

Collagenase được dùng để phân tách collagen thành các chuỗi xoắn α phục vụ cho nghiên cứu quá trình hình thành cấu trúc xoắn của collagen. Bên cạnh các nghiên cứu về cấu trúc phân tử collagen, collagenase còn được dùng trong việc xác định collagen cho phép khẳng định bản chất collagen của protein được tổng hợp.

1.4.2. Sử dụng collagenase trong công nghiệp thực phẩm.

Làm mềm thịt.

Cấu trúc phân tử của collagen và tương tác của nó với các cấu tử khác của mô liên kết là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến đặc tính cấu trúc của thịt và sản phẩm thịt[26]. Số các liên kết chéo trong collagen tăng lên cùng với tuổi của động vật, và vì thế làm tăng độ cứng của thịt [8]. Một trong những biện pháp làm tăng độ mềm của thịt là phân giải cấu trúc xoắn

colagen, làm duỗi mạch protein để đạt được cấu trúc và độ mềm mong muốn và không kèm theo sự phân giải các sợi miozin.

Từ trước tới nay, các enzym chủ yếu được sử dụng để làm mềm thịt là papain, bromelain, ficin, trong đó papain được coi là enzym hiệu quả nhất trong số các enzym do có khả năng tác động lên các vùng xoắn đầu mạch trong phân tử colagen [32]. Tác dụng cơ bản của các enzym này là thủy phân không đặc biệt các protein, và chủ yếu là actin và miozin. Vì thế, việc sử dụng các enzym này hoặc không có mấy tác dụng trong cải thiện thịt chứa nhiều colagen, hoặc ngược lại, có thể gây ra hiện tượng phân giải quá mức cấu trúc của thịt và tạo ra thịt có chất lượng xấu. Rất nhiều cải tiến công nghệ đã được áp dụng để cải thiện chất lượng thịt sau làm mềm bằng các enzym này. Mặc dù vậy, cấu trúc của thịt nhận được sau quá trình làm mềm vẫn không đạt yêu cầu về mặt cấu trúc; hoặc quá cứng, hoặc quá làm mềm, làm giảm chất lượng cảm quan của thịt. Hương vị của thịt bị biến đổi, đôi khi bị biến đổi đến mức không chấp nhận được. Ngoài ra, cũng do không có khả năng tác động lên colagen khi sử dụng các chế phẩm proteaza này nên khả năng cải thiện chất lượng thịt thấp cấp (chứa nhiều colagen) bằng các enzym này là rất thấp. Khả năng sử dụng collagenase trong việc làm mềm và nâng cao chất lượng thịt đã được thử nghiệm và công bố trong một số công trình gần đây [34], [46]. Enzym này đặc biệt hiệu quả trong trường hợp nâng cao khả năng khai thác và tận dụng thịt có nhiều colagen như thịt bò cấp thấp. Việc khai thác thịt bò cấp thấp có sử dụng collagenase cho phép sử dụng loại thịt bò này để sản xuất ngay cả các sản phẩm cao cấp như xúc xích hoặc bít tết, nâng cao giá trị gia tăng của nguyên liệu.

Ngày nay, cùng với sự gia tăng dân số, nhu cầu về số lượng và chất lượng thực phẩm (trong đó có thịt các loại) ngày càng lớn. Theo báo cáo Balmey, thị phần thịt gia cầm đã được nâng cao chất lượng (value – added poultry) ở Mỹ năm 1995 chiếm 20% trong tổng số thịt gia cầm bán ra. Balmey dự đoán con số này sẽ là 75% vào cuối năm 2000. Trong khi đó,

những minh chứng của CSO về giá trị xuất khẩu của thịt bò ở Ailen năm 1999 cho thấy tỉ lệ này xấp xỉ 5% [88]. Thịt bò là loại thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao và được tiêu thụ mạnh ở nhiều nước, đặc biệt là ở các nước phương tây. Để nâng cao hơn nữa các mức tiêu thụ loại thịt này cần có công nghệ làm mềm thịt, tạo ra các sản phẩm thịt cấu trúc được nâng cao chất lượng từ loại thịt bò cấp thấp (low – value beef).

Biến hình protein.

Trong công nghệ thực phẩm, các proteaza được dùng để biến hình protein nhằm cải biến một số tính chất dinh dưỡng hoặc chức năng của chúng. Vai trò của enzym ở đây chủ yếu là thực hiện phản ứng thuỷ phân từng phần, làm biến đổi cấu trúc protein. Collagenase là một trong số các proteaza được dùng với mục đích biến đổi cấu trúc protein để đạt được hiệu quả mong muốn [46]. Khi bị thuỷ phân một phần, các tính chất chức năng và cảm quan của protein có thể được cải thiện như khả năng giữ nước, khả năng nhũ tương hoá, độ bền tạo nhũ, tạo bọt, độ dai...

Sử dụng collagenase làm giảm tính gây dị ứng của một số protein thực phẩm.

Các trường hợp dị ứng thực phẩm thực sự phổ biến trong vòng 15 năm trở lại đây. Các báo cáo về hiện tượng này cho thấy số lượng người phải chịu đựng sự dị ứng do thực phẩm gây nên tăng dần lên trên quy mô toàn cầu [48]. Dị ứng thực phẩm được ẩm ứng ở trẻ em, lên tới 1,5% đối với trẻ nhỏ dưới 3 tuổi hoặc trẻ em nói chung: đặc biệt đối với trẻ em mới sinh, các trường hợp cảm ứng dị ứng thực phẩm lên tới 5%. Số liệu về dị ứng thực phẩm ở các nước đang phát triển và đặc biệt là Việt Nam rất hạn chế có thể do nguyên nhân thiếu các phương tiện chuẩn đoán hoặc chỉ đơn giản là không chú ý đến các tình trạng liên quan tới bệnh lý khác như dị ngoài, nhiễm trùng đường thở....

Mặc dù tính chất của các protein gây dị ứng còn chưa được xác định đầy đủ nhưng nói chung các protein gây dị ứng có KLPT khoảng 10-70kDa, có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch (cảm ứng sự sản sinh IgE đặc hiệu chất dị ứng). Các protein này khá bền với nhiệt trong quá trình nấu, chế biến và ít bị phân giải bởi các proteaza. Trong nhiều trường hợp, các chất gây dị ứng được xác định là các protein cụ thể. Theo khảo sát, sữa bò, trứng, bột mỳ, bột gạo và cá là các thực phẩm gây dị ứng thường gặp nhất [23], [48]. Protein của gạo có KLKPT 14-16kDa được phát triển là các protein gây dị ứng.

Nhóm tác giả Watanabe [113, 114, 115] đã đề cập tới khả năng tạo ra các sản phẩm không gây dị ứng khi xử lý protein gây dị ứng của một mỳ với collagenase cho thấy chúng có tính chất công nghệ thích hợp hơn là khi xử lý với các proteaza thông thường khác do các enzym này phân giải quá mức protein. Nghiên cứu này đã mở đường cho ý tưởng sử dụng collagenase như là một công cụ tiềm năng trong việc tác động lên cấu trúc protein và làm giảm khả năng gây dị ứng của các protein dạng này mà vẫn giữ được các tính chất công nghệ cần thiết của chúng.

1.4.3. Sử dụng collagenase trong y tế – dược – mỹ phẩm.

Do khả năng phân cắt đặc hiệu collagen, collagenase được dùng như một công cụ hữu hiệu để phân tách các thành phần cấu trúc trong mô liên kết. Collagenase còn được sử dụng như là một công cụ hiệu quả trong việc phân tách tế bào trong mạng lưới mô liên kết. Ngoài ra, collagenase có thể được sử dụng trong nghiên cứu các tiến trình của một số bệnh và cơ chế làm lành vết thương. Việc sử dụng collagenase có thể dưới dạng thuốc bôi hoặc các băng vết thương hoặc trong điều trị bỏng.

Mới đây, năm 1998, vai trò xúc tác và hướng đích của collagenase trong việc ngăn chặn sự phát triển các khối u do khả năng phân cắt các trình tự hexapeptit melphalan Pro- Gln – Gly – Ile – Met – Gly tạo thành tripeptit

melaphan Ile – Mel – Gly có độc tính tế bào cao đã được phát hiện. Điều đó có được xem như một khả năng hứa hẹn cho sản xuất các chế phẩm thuốc có hoạt tính collagenase cao để ngăn ngừa khối u.

Collagenase và các sản phẩm polyme thủy phân của chúng cũng được sử dụng trong y tế điều chế da thay thế, chỉ phẫu thuật, các vỏ viên thuốc hay được sử dụng trong công nghiệp hoá chất, sản xuất vật liệu tráng ảnh....

Bên cạnh các khả năng sử dụng collagenase cho các mục đích trên, collagenase là một enzym tiềm năng trong nhiều lĩnh vực khác như công nghiệp da, công nghiệp mỹ phẩm trong sản xuất các kem tẩy da chết.

CHƯƠNG II

LỰA CHỌN ĐỐI TƯỢNG VÀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu.

Thu nhận collagenase từ vi sinh vật một cách có điều khiển với sự tích lũy cao có thể thực hiện được bằng một công nghệ đơn giản hơn so với việc thu enzym từ các nguồn khác như tế bào động vật hay thực vật. Thêm vào đó, các enzym từ vi sinh vật có khoảng hoạt động rộng hơn với khả năng phân cắt mạnh hơn so với các enzym khác. Chính vì lý do trên, nguồn gen collagenase từ vi sinh vật đang được các nhà nghiên cứu quan tâm.

Theo Sicrat – aunstrup và cộng sự, một đặc tính cơ bản và rất quan trọng để một chủng vi sinh vật được chọn cho sản xuất công nghiệp là chủng vi sinh vật này không được là các vi sinh vật gây bệnh cũng như không sản sinh độc tố. Đối với các chế phẩm enzym dùng cho thực phẩm, chủng vi sinh vật được chọn cho sản xuất enzym cần phải có tính chất “thực phẩm, có nghĩa là chủng vi sinh vật nên thuộc vào các chủng được coi là an

toàn đã biết, (G.R.A.S- Generaly Recongized As Safa) [9], nếu không chỉ được phép sử dụng các chế phẩm hoàn toàn tinh khiết và cần thiết phải có các thử nghiệm để tính trong một thời gian dài.

Đa phần các collagenase vi sinh vật đã được phát hiện các enzym của các vi khuẩn phân lập từ đất, rất nhiều trong số đó là các vi khuẩn chứa độc tố như trong trường hợp *C.histolyticum*, *P.marinolutinosa* và *Pseudomonas* sp. Các nghiên cứu kiểm tìm các nguồn gen enzym an toàn, có hoạt tính collagenase cao với các đặc tính quý báu cho đến nay vẫn đang là mục tiêu của các nhà nghiên cứu.

Vì các lý do trên, đề tài sẽ tập trung vào phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật an toàn có khả năng tổng hợp collagenase cho mục tiêu sản xuất công nghiệp và khai thác việc sử dụng chế phẩm này trong thực phẩm và các lĩnh vực liên quan tới collagen.

Để có thể thu nhận được các vi sinh vật tổng hợp collagenase an toàn, nguồn phân lập vi sinh vật được lựa chọn cần:

- Chứa collagen
- Chứa tập hợp vi sinh vật vốn được coi là an toàn cho thực phẩm.

Nguồn vi sinh vật được lựa chọn thoả mãn các yêu cầu trên là các sản phẩm lên men truyền thống chứa collagenase.

2.2. Vấn đề nghiên cứu.

Để đáp ứng được mục tiêu nghiên cứu đặt ra, đề tài đã tập trung giải quyết các vấn đề cụ thể sau:

1. Phân lập và tuyển chọn hệ vi khuẩn tổng hợp collagenase từ nguồn đã chọn. Định tên vi sinh vật và lựa chọn chủng an toàn.
2. Nghiên cứu quy trình tổng hợp enzym từ chủng lựa chọn: các điều kiện môi trường sinh trưởng, sinh tổng hợp enzym, chất cảm ứng cho tổng hợp enzym, động thái tổng hợp enzym.

3. Nghiên cứu quy trình thu hồi enzym dạng tinh khiết và kỹ thuật. Tập trung nghiên cứu quy trình thu hồi enzym kỹ thuật cho mục đích sử dụng trong thực phẩm.
4. Nghiên cứu ổn định và bảo quản chế phẩm enzym
5. Nghiên cứu thăm dò khả năng sử dụng enzym: Khử protein dị ứng, nâng cao chất lượng thịt bò cấp thấp, hỗ trợ trong sản xuất nước mắm.
6. Nghiên cứu phát triển sản phẩm: Chế phẩm enzym, gia vị ướp thịt chứa collagenase.

CHƯƠNG III:

PHƯƠNG P HÁP NGHIÊN CỨU

3.1 Vật liệu, thiết bị

31.1. Vật liệu, hoá chất

Nguồn vi sinh vật: Các mẫu thực phẩm lên men truyền thống được mua từ các chợ ở Hà Nội và các cơ sở sản xuất ở Việt Nam (nem chua, tương, chao, chượp cá) Myama (Wethachin) và Lào (padek). Các mẫu sau khi thu nhận được giữ trong môi trường thạch NA hoặc bảo quản trong tủ lạnh sâu ở nhiệt độ -85°C cho tới khi sử dụng

Các chủng vi sinh vật chuẩn: *Bacillus subtilis* IFO 3022 và *Escherichia coli* IFO3301.

Hoá chất: Toàn bộ hoá chất sử dụng cho phân tích là ở dạng tinh khiết dùng cho phân tích, được mua từ các hãng Nacalai Tesque và Wako, Nhật bản., collagen dạng I của Sigma, Mỹ. Các protein chuẩn của Pharmacia – Biotech, Thụy điển (kDa: phosphorylase b thỏ 94; albumin huyết thanh bò 67; ovalbumin lòng trắng trứng 43; carbonic anhydrase erythrocyt bò 30; chất

ức chế trypsin đậu tương 20,1; α - lactalbumin sữa bò 14,4; cytochrom c 12,4; α - chymotrypsinogen 25; γ - globulin bò 150).

Các môi trường dinh dưỡng:

- Môi trường sơ bộ phân loại vi sinh vật : PEES, TATAC, LBS, Potato dextrose, TS, DHL, NA.

- Môi trường phân lập: Môi trường Hisano I (môi trường I)

- Môi trường tổng hợp enzym: Môi trường Hisano II (môi trường II)

- Môi trường dùng cho thí nghiệm cảm ứng: Môi trường tối thiểu ((môi trường III)

Các kit định tên vi khuẩn : API 50 CH, API 50 CHB và API 50 CHL của

Biomerieux, Pháp

- Thiết bị siêu lọc Millipore 500ml với các màng lọc YM 3 YM 10 và YM 50 của Centriplus, Amicom, Mỹ:

- Thiết bị lên men 3 lít, Pharmacia Thụy Điển:

- Quang phổ kế Hitachi 200- 20, Nhật bản

- Hệ thống sắc ký

- Bộ điện di mini – gel Hoefer, Mỹ

- Các thiết bị nghiên cứu thông dụng khác

3.2. Phương pháp nghiên cứu.

3.2.1. Các phương pháp vi sinh vật

Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng phân giải collagen.

Các vi sinh vật trong các mẫu thực phẩm lên men được nuôi tích lũy lần lượt trên môi trường I. Sử dụng phương pháp vòng thủy phân trên môi trường thạch I để sơ bộ lựa chọn các chủng có khả năng tổng hợp collagenase. Kiểm tra khả năng tổng hợp collagenase của các chủng thu được với cơ chất là collagen không tan. Mọi canh trường được thực hiện ở nhiệt độ $31 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Kỹ thuật định tên vi khuẩn.

Sử dụng phương pháp chuẩn đoán nhanh cho định tên vi khuẩn của Logan và Berkeley. Sử dụng các kit định tên vi khuẩn để định tên vi khuẩn. Đọc kết quả sau 24 giờ và 48 giờ nuôi trên các kit định tên. Sử dụng phần mềm máy tính ATB Plus dựa theo khoá phân loại Bergey để nhận được kết quả định tên vi sinh vật [33].

Thí nghiệm kiểm tra khả năng cảm ứng sự tổng hợp collagenase.

Nuôi chủng vi khuẩn trong các bình tam giác 300ml trên máy lắc ngang ổn nhiệt $32 \pm 3^{\circ}\text{C}$, mỗi bình chứa 100ml môi trường nhân giống với cơ chất gelatin 0,3% trong 6 giờ (OD_{660} đạt 1,2). Ly tâm thu và rửa tế bào ba lần với môi trường III ở 13000v/phút trong 15 phút. Tạo dịch huyền tế bào với thể tích ban đầu trong môi trường III không có hoặc có chứa các cơ chất kiểm tra độc lập hoặc kết hợp ở các nồng độ kiểm tra khác nhau. Các cơ chất kiểm tra bao gồm: collagen, casein, gelatin, polypepton và DTP collagen. Định kỳ lấy mẫu theo dõi sự phát triển sinh khối của vi khuẩn và khả năng tổng hợp enzym thông qua đo giá trị OD_{660} và xác định hoạt độ collagenase.

Kỹ thuật nuôi và đánh giá canh trường.

Vi khuẩn được nuôi trong các bình tam giác đáy có mẫu lắc dung tích 300ml chứa 100ml môi trường trên máy lắc ổn nhiệt có thể điều khiển tốc độ lắc ngang hoặc trong thiết bị lên men 3 lít chứa 1 lít môi trường, có hệ thống ổn định nhiệt độ và pH. Định kỳ lấy mẫu và đánh giá sự phát triển của vi khuẩn thông qua giá trị OD_{660} . Hoạt độ collagenase sẽ được xác định với cơ chất collagen không tan.

3.2.2. Các phương pháp hoá sinh.

Xác định hàm lượng protein

Sử dụng phương pháp Lowry với protein chuẩn là albumin của huyết thanh bò

Xác định hoạt độ enzyme: ủ 10mg collagen không tan trong 10 phút ở 30°C trong 0,8ml dung dịch đệm Tris – HCl 50mM pH 7,5 chứa 4mM CaCl₂. Phản ứng enzyme được thực hiện trên máy lắc ổn nhiệt ở 30°C khi cho 0,2ml enzyme vào hỗn hợp kể trên. Tiến hành phản ứng trong 30 phút và dừng phản ứng bằng 1ml dung dịch axit axetic 0,1M lạnh. Phản ứng kiểm chứng được thực hiện theo cách tương tự khi không có mặt cơ chất. Hàm lượng nhóm α -NH₂ giải phóng được xác định bằng phương pháp Ninhydrin của Rosen. Hoạt độ collagenase chung được tính bằng số μ mol leucin tương đương giải phóng trong 1 phút đối với 1 ml dịch enzyme. Hoạt độ collagenase riêng phần biểu diễn bằng số μ mol leucin tương đương giải phóng trong 1 phút đối với 1mg protein.

Điện di trên gel polyacrylamit

SDS – PAGE: Điện di phân tách protein biến tính được thực hiện theo phương pháp của Laemmli trên minigel 10 x 10cm với nồng độ gel phân giải là polyacrylamit 12,5% hoặc gradient polyacrylamit 5-20% , gel cô đặc 5%. Kết thúc điện di, bản gel được chuyển sang thiết bị chuyển protein hoặc được nhuộm với dung dịch Coomassie brilliant blue R- 250 1% qua đêm và tẩy màu bằng hỗn hợp dung môi metanol và axetic.

PAGE: Tiến hành điện di trên gel polyacrylamit cho protein nguyên dạng với nồng độ gel phân giải 7,5% và gel cô đặc 3%. Các bước tiến hành như đối với SDS – PAGE khi không sử dụng SDS.

Thu nhận enzyme: enzyme được thu hồi hoặc bằng siêu lọc, hoặc bằng kết tủa với các dung môi hữu cơ lạnh (axeton hoặc etylic) ở các nồng độ khác nhau. Kết tủa được thu lại bằng cách ly tâm hoặc lọc chân không. Hòa tan kết tủa với một lượng tối thiểu dung dịch đệm Tris – HCl 50mM chứa 4mM CaCl₂. Sau đó ly tâm bỏ cặn, dịch trong được đem sấy khô trên máy sấy chân không hoặc đem sấy đông khô. Kiểm tra hoạt độ collagenase qua từng bước để đánh giá hiệu suất thu hồi enzyme (hiệu suất thu hồi

enzym được tính bằng tỷ lệ phần trăm hoạt độ enzym tổng số thu hồi so với tổng hoạt độ của dịch enzym thô ban đầu).

Xác định khối lượng phân tử của enzym

KLPT của enzym được xác định bằng kỹ thuật lọc gel trên Sephadex – G75 (2 x 85 cách mạng) [24]. Các protein chuẩn là cytochrom c huyết thanh ngựa (12n4kDa), α -chymotripsinogen A (25 kDa), ovalbumin (43 Kda), albumin huyết thanh bò (67kDa) và γ - globulin của bò (150 kDa). Song song, KLPT của enzym biến tính được xác định trên SDS – PAGE 15%. Thiết lập đồ thị biểu diễn quan hệ tuyến tính giữa KLPT của các protein và các giá trị thể tích rửa hoặc R_f tương ứng của các protein phát hiện trên cột lọc gel hoặc trên bản gel và xác định KLPT của collagenase [93].

3.2.3. Nghiên cứu ứng dụng

Kiểm nghiệm tính an toàn của chế phẩm enzym collagenase

Tính an toàn của chế phẩm enzym collagenase từ B. Subtilis FS – 2 được kiểm nghiệm theo phương pháp thường quy trên động vật thử nghiệm chuột lang trắng và chột nhắt.

Nghiên cứu ổn định hoạt tính enzym : enzym được nghiên cứu ổn định hoạt tính với các chất bổ sung như tinh bột biến tính, ion, canxi, glycerol PPVP, chitosan và muối. Chế phẩm được theo dõi ở nhiệt độ lạnh hoặc nhiệt độ thường. Kiểm tra định kỳ hoạt độ enzym và so sánh hoạt độ tài thời điểm trước bảo quản.

Thử nghiệm hoạt tính phân giải protein gây dị ứng.

Xử lý gliadin và α_s - casein với collagenase [54]. Dung dịch cơ chất 1% trong đệm photphat natri 0,1 M, pH 7 được lọc qua màng lọc 0,45 μ m rồi trộn với dung dịch enzym tinh khiết. Một hỗn hợp tương tự khi thay dung dịch enzym bằng dung dịch đệm được dùng làm mẫu đối chứng. Các hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 24 giờ máy lắc ngang. Cơ chất và sản phẩm

phản ứng được phân tách trên SDS – PAGE 12,5% và được gửi đi thử nghiệm với huyết thanh của bệnh nhân dị ứng với gliadin và α_s -casein trong phản ứng ELISA.

Nghiên cứu khả năng phân giải collagen, myofibrin, gân bò và thịt bò cấp thấp bằng chế phẩm enzym nghiên cứu.

Ủ các mẫu protein nghiên cứu với enzym, sau các khoảng thời gian khác nhau, điện di phân tách sản phẩm. Phân tích hàm lượng –NH₂ giải phóng các mẫu thí nghiệm bằng phương pháp Ninhydrin.

Sản xuất sản phẩm thử nghiệm (xúc xích bút tét)

Thịt bò cấp thấp được loại bỏ gân, mỡ, màng bám dính. Sau đó, thịt được xay nhỏ vừa phải để qua đêm ở –20°C. Hôm sau để thịt ở 4 giờ. Sau thời gian này thịt được dùng để làm sản phẩm. Sản phẩm có xử lý enzym bao gồm các thành phần : Thịt bò, NaCl, Na₅P₃O₁₀ A(Có tác dụng làm tăng độ kết dính của thịt), Collagenaza (100: 0,75: 0,5: 0,4). Hỗn hợp được trộn đều và để nhiệt độ thường 1 giờ. Sau đó, định lượng, định hình, đóng gói chân không và bảo quản sản phẩm ở 20°C. Sản phẩm kiểm chứng được làm tương tự nhưng được xử lý với collagenase. Phân tích hàm lượng nhóm amin được giải phóng do tác dụng của collagenase và đánh giá cảm quan sản phẩm.

Nghiên cứu sử dụng collagenase trong sản xuất nước mắm

Chượp cá được mua ở cơ sở sản xuất nước mắm Cát Hải, tháng 7/2003, ủ tại PTN trong các chậu thủy tinh có dẫn dịch. Thăm dò khả năng phân giải da cá của collagenase và FA-2. Quan sát độ thay đổi da cá, biến đổi hàm lượng axit amin. Sau 4 tháng ủ chượp, bổ sung chế phẩm enzym với liều lượng khác nhau, đánh giá lượng dịch thu được và tốc độ chảy của dịch so với đối chứng không bổ sung enzym. Đánh giá độ nát như/

độ ngẫu của chượp của mẫu thí nghiệm và đối chứng. So sánh các thí nghiệm với collagenase và đối chứng.

Tất cả các thí nghiệm trong nghiên cứu được lập lại ít nhất hai lần.

CHƯƠNG IV

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

4.1 Phân lập, tuyển chọn và định tên vi khuẩn khả năng tổng hợp collagenase

4.1.1. Phân lập hệ vi khuẩn tổng hợp collagenase.

Mẫu thực phẩm lên men truyền thống thu thập được bao gồm 26 mẫu từ các nước trong khu vực Đông Nam Á: 13 mẫu thịt lên men (nem chua, Việt Nam wethachin, Myama), 6 mẫu chượp cá lên men (nước mắm, Việt Nam ; padek, Lào), 3 mẫu chao (Trung Quốc), 2 mẫu mắm tôm, 2 mẫu tương Việt Nam.

Có 11/26 mẫu dương tính cho phép nhận được các khuẩn lạc có vòng thủy phân (xem bảng A1, phụ lục A). Từ các mẫu này, thu được tổng cộng 53 khuẩn lạc có tạo vòng thủy phân trong vòng 24-48 giờ nuôi trên đĩa thạch – clagen. Chỉ có 8/53 chủng thể hiện hoạt tính collagenase. Các khuẩn lạc tạo vòng thủy phân còn lại có thể chứa các vi khuẩn có hoạt tính gelatinaza.

////

4.1.2. Định tên vi khuẩn

FS-2 (hình 1b) là trực khuẩn mảnh, dài 3 μm , có tính chất nhuộm Gram thay đổi theo tuổi của canh trường là vi khuẩn Gram dương khi nuôi 24 giờ trên môi trường NA và chuyển sang Gram âm khi canh trường già.

FS-2 được định tên bằng kit định tên API 50CH, API 50 CHB và API 50 CHL. Kết quả khảo sát các đặc tính hình thái và phân loại của FS-2 xác định FS 2 là *Bacillus subtilis* với độ phù hợp của các thử nghiệm là 99,9% sau 48 giờ kiểm tra. Kết quả định tên được trình bày trong bảng A3, phụ lục A.

FS-2 được xác định là *Bacillus subtilis* và có khả năng tổng hợp collagenase được biết chắc chắn là an toàn kể cả cho việc ứng dụng trong thực phẩm.

4. 2 Nghiên cứu quy trình sinh tổng hợp collagenase từ *B.subtilis* FS - 2

Do các hiểu biết chung về *Bacillus* đã trình bày trong phần tổng quan tài liệu, trong nghiên cứu của mình, chúng tôi lựa chọn nghiên cứu sâu một số các yếu tố quan trọng quyết định tới việc tổng hợp collagenase như nguồn nitơ và khả năng cảm ứng sự tổng hợp enzym nhờ các cấu tử môi trường cũng như tìm hiểu bản chất sự tổng hợp cảm ứng enzym. Các điều kiện nuôi cấy khác như pH môi trường được chọn cố định ở giá trị pH trung tính, không kiểm soát pH cho các thí nghiệm trên máy lắc và có kiểm soát pH khi nuôi trong bình lên men. Tốc độ thông khí được thỏa mãn tối đa bằng cách nuôi trên máy lắc ngang trong các bình lên men có mấu lắc hoặc không khí với tốc độ 7 lít không khí / phút lên nuôi trong bình lên men dung tích 3 lít với dung tích sử dụng là một lít, nồng độ ôxy hoà tan đạt 75% nồng độ bão hoà.

4.2.1. Ảnh hưởng của cơ chất lên sự sinh trưởng của vi khuẩn

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các chất (hình 2) cho thấy không có sự khác biệt lớn nào về khả năng phát triển của *B.subtilis* FS - 2 trên các môi trường chứa các cơ chất khác nhau so sánh chúng với sự phát triển của FS - 2 trên môi trường NA, môi trường được coi là thích hợp cho sự phát triển của *B.subtilis* nói chung. Như vậy, một trong các cơ chất nghiên cứu collagen, casein, gelatin cùng với glucoza 1% đều có thể dùng để chuẩn bị canh trường nhân giống cho các thí nghiệm tiếp theo. Để rút ngắn pha thích ứng. *B.subtilis* FS - 2 được hoạt hoá trước trong cùng môi trường. Canh trường nuôi 6 giờ trong điều kiện như vậy trên cơ chất gelatin 0,3% - glucoza 1% được chọn làm canh trường giống cho các thí nghiệm sau này.

/////

4.2.2. Nghiên cứu tổng hợp cảm ứng collagenase bằng *B.subtilis* FS-2

Cơ chất collagen

Kết quả kiểm tra cho thấy canh trường chứa collagen tích lũy enzyme với hoạt độ cao (đạt 0,126 U/ml) trong khi canh trường FS-2 trên NA chỉ tổng hợp được một lượng collagenase không đáng kể (0,012U/ml, tương đương với 1% hoạt độ enzyme so với canh trường chứa collagen). Theo tiêu chuẩn quy ước của Karstrom [4], “*một enzyme được gọi là cảm ứng nếu như sự hình thành nó được tăng lên ít nhất là 5 lần khi thêm đối chất đặc hiệu vào môi trường*”. Theo quan niệm đó, trong thí nghiệm này, FS - 2 là vi khuẩn tổng hợp collagenase theo cơ chế cảm ứng với collagen.

./////

Hình 3: Sự tổng hợp collagenase phụ thuộc vào collagen

* OD của canh trường chứa collagen: * OD của canh trường NA;

* Hoạt độ collagenase của canh trường chứa collagen; * hoạt độ collagenase của canh trường chứa collagen.

Hình 4. ảnh hưởng của cơ chất lên sự tổng hợp collagenase

- □- , OD - casein -+-, OD - đối chứng -♦-, collagenase - gelatin

- //-, OD - collagen - ■-, collagenase - casein-◆-, collagenase - đối
chứng.

-O-, OD - polypepton - ◆-, collagenase - collagen-

- //, OD -genlatin - ●-, collagenase polypepton

Thử nghiệm với các cơ chất khác

Để khẳng định lại nhận xét trên, các thí nghiệm được thực hiện với các cơ chất thử nghiệm bao gồm casein, gelatin, collagen, polypen như đã trình bày trong phần phương pháp.

Kết quả thử nghiệm được trình bày trong hình 4. Sự tổng hợp collagenase trong các canh trường được phát hiện ở giờ thứ hai sau khi đưa các tế bào vi khuẩn tiếp xúc với cơ chất. Canh trường *B. subtilis* FA-2 trong điều kiện thí nghiệm có khả năng tổng hợp enzym cao nhất khi có mặt cơ chất là collagen, gần gấp hai lần so với khi có mặt gelatin, casein và polypepton. Trong canh trường đối chứng, hoạt độ enzym chỉ đạt cỡ 1% so với canh trường collagen.

“Một enzym được coi là cảm ứng nếu khi chuyển sinh khối vi sinh vật phát triển trước trên môi trường không có đối chất đặc hiệu sang dung dịch đệm có đối chất đặc hiệu thì tổng hợp enzym không phải là bắt đầu ngay mà phải sau một thời gian tính bằng giờ. Điều này cần thiết để chứng minh tác động của đối chất như một chất cảm ứng kích bộ máy tổng hợp enzym của tế bào và phải sau một khoảng thời gian đủ dài như vậy enzym mới được hình thành de novo”[4]. Khả năng cảm ứng sự sinh tổng hợp enzym của các cơ chất nghiên cứu, xếp theo thứ tự giảm dần, là collagen, gelatin, polypepton và cuối cùng là casein.

Ảnh hưởng của nồng độ polypepton

Tóm tắt: FS- 2 được nuôi trong bình tam giác 300ml có chứa 100ml môi trường II, được cấy 5% canh trường giống 6 giờ nuôi trên môi trường giống gelatin 0,3%. Các bình thí nghiệm được bổ sung gelatin 0,3% và polypepton ở các nồng độ khác nhau. 0%, 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1% , 2,5%

và 5%. Các canh trường được nuôi trên máy lắc ở $32 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của các nồng độ polypepton khác nhau đến sự tổng hợp enzym khi có mặt cơ chất gelatin được trình bày ở hình 5. Kết quả cho thấy polypepton cùng với gelatin đóng vai trò chất cảm ứng sinh tổng hợp collagenase ở *B. subtilis* FS – 2 nhưng chỉ ở một giới hạn nồng độ, trong điều kiện thí nghiệm này là 0,75%. Vượt quá giá trị này, polypepton có tác dụng như chất kìm hãm enzym. Kết quả này tương tự như trường hợp kìm hãm hoạt tính collagenase của *Vibrio alginolyticus* bởi pepton ở các nồng độ 0,25% - 2,5% trong thời gian đầu, tuy rằng tác dụng kìm hãm này bị loại bỏ nếu tiếp tục ủ enzym với pepton trong một thời gian dài.

/////

4.2.3. ảnh hưởng của NaCl.

B. subtilis FA- 2 được nuôi hiếu khí song song trên hai canh trường giống chứa 0,3% gelatin, một trong hai canh trường có bổ sung NaCl 1%. Sau 6 giờ nuôi hiếu khí, các tế bào được ly tâm, rửa 4 lần với nước cất và tạo dịch huyền phù ở thể tích ban đầu trong môi trường chứa 0,3% gelatin – 0,75% polypepton. Tiến hành tổng hợp enzym từ hai dịch huyền phù tế bào thu được kể trên. Kết quả thử nghiệm được trình bày trên hình 6.

Hình 7 cho thấy khi có mặt NaCl trong canh trường, sự tích lũy enzym sớm hơn so với canh trường không có mặt NaCl (tương ứng là 18 giờ và 24 giờ). Sự có mặt của NaCl ở nồng độ 1% thích hợp về cả hai khía cạnh: tích lũy enzym sớm hơn và hoạt độ enzym cao hơn.

Từ các kết quả thu được, canh trường giống cho FS2 được nuôi hiếu khí 6 giờ trên cơ chất gelatin 0,3 %- glucoza 1%. Môi trường glucoza 1% chứa hỗn hợp cơ chất cảm ứng gelatin 0,3 % - polypepton 0,7% và NaCl 1% có thể sử dụng làm môi trường tổng hợp collagenase nhờ *B. subtilis* FS- 2

4.3. Động thái tạo thành collagenase

B. subtilis FS- 2 được nuôi hiếu khí 6 giờ ở $32 \pm 2^{\circ}$ trong bình tam giác 300ml trên máy lắc ngang, mỗi bình chứa 100ml môi trường nhân giống có thành phần (g/l): glucoza 1%, K_2HPO_4 : 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,1;

Citrate. 2H₂O: 0,5; Cao nấm men: 1; Gelatin: 3; pH: 7,4 một lít canh trường *B. subtilis* FS- 2 được cấy từ 50 ml canh trường giống (6 giờ nuôi hiếu khí máy lắc trong môi trường gelatin 0,3%) và được nuôi trong thiết bị lên men có kiểm soát chế độ nuôi: pH 7,4 ± 0,2; nhiệt độ 23⁰C ± 0,2 ; thông khí 7 lít không khí /phút trên môi trường (g/l): glucoza 1%, K₂HPO₄: 7; CaCl₂ : 0,1; KH₂PH₄ .: 2; Gelatin: 3; MgSO₄. 7 H₂O: 0,1; Polypepton: 7,5; Citrate. 2H₂O: 0,5; NaCl: 10 Cao nấm men: 1; pH: 7,4..Nồng độ oxy trong dịch lên men đạt 5,7mg/ml. Dịch lên men được lấy mẫu định kỳ sau 3 giờ lên men, đo giá trị OD tại 660 nm theo dõi sự sinh trưởng của vi khuẩn, xác định nồng độ potetin và hoạt độ enzym trong dịch ly tâm. Kết quả phân tích được trình bày trong hình 9.

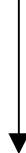
4.4. Nghiên cứu quy trình thu hồi và tinh chế enzym

4.4.1 Quy trình thu nhận chế phẩm enzym tinh khiết

Collagenase từ canh trường *B. subtilis* FS- 2 được tinh chế theo quy trình nhiều bước liên tiếp mô tả trên hình 10.

Kết quả phân tích Collagenase được trình bày trong các phụ lục B. Độ tinh khiết của Collagenase tinh chế được kiểm tra bằng điện di trên PAGE 15%. Điện di đồ của Collagenase thu nhận theo quy trình 1 cho thấy enzym thu được là một protein thuần nhất .

Dinh lên men *B. subtilis* FA- 2



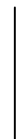
Ly tâm



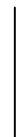
Siêu lọc –YM – 10



DEAE Sepharose CL – 6B



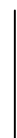
CM – Cellulose



Butyl – Toyoearl 650M



Sephadex G – 75



Đồng khô

Bằng cách liên tiếp phân tách qua các bước tinh chế như đã mô tả ở trên, Collagenase được tinh chế và phân tích hoàn toàn khỏi các protein. Enzym thu được không thể hiện hoạt tính caseinaza. Kết quả làm sạch enzym và hiệu suất thu hồi của từng bước tinh chế enzym được tóm tắt và trình bày trong bảng 2.

Bảng 2: Mức độ làm sạch và hiệu suất thu hồi chế phẩm collagenase tinh khiết từ *B. subtilis* FS - 2.

TT	Các bước tinh chế	Thể tích (ml)	Protein tổng cộng	Hoạt độ collagenase				Hoạt độ caseinaza	
				Tổng công (U)	Riêng phần(U/mgPr)	Mức độ làm sạch(lần)	Hiệu suất thu hồi (%)	Tổng công (U)	Riêng phần(U/mgPr)
1	Dịch nuôi cấy	950	2228,00	96,90	0,043	1	100	107,35	0,047
2	Siêu lọc	37	162,80	33,30	0,201	4,8	34,4	27,38	0,15
3	DEAE- Sepharose-CL6B	70	61,30	16,8	0,274	6,4	17,3	21,00	0,34
4	CM- cellulose	30	17,10	5,13	0,300	6,9	5,2	9,90	0,58
5	Butyl - Toyopearl 650M	31	5,65	3,35	0,590	13,7	3,4	-	-
6	Sephadex- G75	18	2,59	1,84	0,710	16,5	1,9	-	-

4.4.2. Quy trình thu nhận sản phẩm enzym kỹ thuật

Với mục tiêu sử dụng khác nhau, collagenase được nghiên cứu thu hồi dưới dạng chế phẩm kỹ thuật. Chúng tôi thử nghiệm song song hai biện pháp thu hồi chế phẩm kỹ thuật theo sơ đồ trên hình 13 (quy trình A và quy trình B) với kết quả được trình bày trong bảng 3 và 4 dưới đây. Với quy trình này collagenase được thu hồi với hiệu suất 50 - 59%, hoạt động riêng tăng 11,6 lần.

Quy trình A

Canh trường FS2 được nuôi như mô tả phần trên. Dịch nuôi cấy được ly tâm thu hồi ở 10 000v/phút x 15 phút. Dịch canh trường được cho qua siêu lọc với màng lọc loại bỏ các phần có trọng lượng phân tử dưới 50 000Da, áp suất nitơ duy trì 0,4 atm. Dịch thu được đem làm đông khô. Hiệu suất thu hồi enzym đạt 59%. Tóm tắt quá trình thu hồi mô tả trên bảng 3.

Bảng 3. Hiệu suất và mức độ làm sạch chế phẩm collagenase từ *B.subtilis* FS - 2 theo quy trình hình 12A.

TT	Các bước thu hồi	Thể tích (ml)	Protein tổng cộng (mg)*	Hoạt độ collagenase				Hoạt độ caseinaza	
				Tổng cộng (U)	Riêng phần (U/mg Pr)	Mức độ làm sạch (lần)	Hiệu suất thu hồi (%)	Tổng cộng (U)	Riêng phần (U/mg Pr)
1	Dịch nuôi cấy	13 280	144 290	3 984	0,027	(1)	100	2,337	0,016
2	Siêu lọc YM - 50	1 330	10 980	3 458	0,31	(11,6)	87	2,261	0,21
3	Đông khô	7,15 (g)	3 533	2 360	-	-	59	501	-

*, Hàm lượng Protein đo ở bước sóng 280nm, đường chuẩn được thành lập với albumin huyết thanh bò.

Quy trình B

Dịch enzym thô được làm lạnh ở 4°C trước khi kết tủa. Dung môi hữu cơ đã được làm lạnh ở -20°C trước khi đưa vào dịch enzym. Toàn bộ khối dịch được khuấy trên máy khuấy từ sao cho khối dịch được trộn được mà không tạo bọt, tránh tiếp xúc cục bộ với tác nhân kết tủa. Kết tủa được thu hồi bằng lọc chân không, sau đó được hoà tan trong đệm Tris - HCl 50mM và kiểm tra hoạt độ enzym.

Với tác nhân kết tủa là cồn thì hiệu suất thu hồi enzym rất thấp chỉ đạt 7,96% ở nồng độ kết tủa 80%. Vậy đây là phương pháp không kinh tế và cho hiệu quả kém.

Sử dụng aceton làm tác nhân kết tủa collagenaza tốt hơn so với cồn. Với nồng độ kết tủa 65%, hiệu suất thu hồi enzym đạt giá trị cao nhất 50,4%. Enzym sau đó được sấy chân không hoặc đông khô, nghiên cứu khả năng ổn định hoạt tính enzym với các chất bổ sung.

Bảng 4: Hiệu suất thu hồi enzym khi kết tủa với aceton (quy trình 12B)

Aceton (%)	V enzym (ml)	Hđ_E đầu U	Hđ_E thu được U	H/suất (%)
50	200	6446	1197,60	18,58
60	200	6446	1818,50	28,21
65	200	6446	3253,30	50,47
70	200	6446	1872,50	29,05

Trên cơ sở quy trình tổng hợp và thu nhận enzym, chúng tôi đã tiến hành lên men tổng hợp enzym và thu nhận được 5000mg chế phẩm enzym tinh khiết và 400g chế phẩm enzym kỹ thuật. Các enzym này được sử dụng tiếp tục trong nghiên cứu các chế độ ổn định enzym, khảo sát khả năng sử dụng chúng và giới thiệu sản phẩm.

Các quy trình tổng hợp và thu nhận enzym đã mô tả trên được kiểm định độ ổn định qua các lần lặp lại (không ít hơn 50 lần lặp lại).

4.5. Nghiên cứu tính chất của collagenase

4.5.1. Khối lượng phân tử

KLPT của enzym được xác định đồng thời bằng lọc gel trên Sephadex - G75 và SDS- PAGE theo cách như đã trình bày trong phần phương pháp. Xác định hoạt tính collagenase với cơ chất là collagen không tan.

Đồ thị biểu diễn quan hệ giữa KLPT của protein chuẩn với các thể tích rửa tương ứng được trình bày trên hình Cl, phụ lục C cho thấy collagenase của *B. subtilis* FS - 2 có KLPT nguyên dạng là 125 kDa.

Trên SDS - PAGE băng protein collagenase được xác định ở vị trí có KLPT khoảng 60 kDa. Như vậy, có khả năng protein collagenase bao gồm hai dưới - đơn vị, mỗi dưới - đơn vị có KLPT xấp xỉ 60 kDa. KLPT của enzym tính toán từ kết quả điện di vào khoảng 120 kDa, thấp hơn so với KLPT nguyên dạng của enzym được xác định bằng phương pháp lọc gel trên Sephadex - G - 75 (125 kDa).

4.5.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính và tính ổn định của enzym Nhiệt độ tối ưu

Thí nghiệm xác định nhiệt độ tối thích cho phản ứng enzym của collagenase được tiến hành với cơ chất là gelatin để tránh ảnh hưởng do sự biến tính bởi nhiệt của collagen trong quá trình thí nghiệm ở các nhiệt độ khác nhau: 10 - 70°C.

Kết quả trình bày trên hình 13 cho thấy nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của collagenase từ *B. subtilis*. FS - 2 là 50°C. Collagenase từ *B. subtilis*. FS - 2 có nhiệt độ hoạt động tối thích khá cao khi so sánh với các collagenase khác. Thông thường, các collagenase được thông báo là hoạt động tối thích trong khoảng nhiệt độ từ 35 - 40°C [38], [43].

Độ bền nhiệt

Trong thí nghiệm xem xét tính bền nhiệt của collagenase, dung dịch enzym được ủ trước 30 phút ở các nhiệt độ khác nhau trong khoảng 10 - 70°C. Hoạt độ còn lại của enzym sau khi xử lý nhiệt được xác định như đã

mô tả trong phần trăm so với hoạt độ của enzym xử lý ở 30°C. kết quả được trình bày trên hình 14.

Kết quả xử lý nhiệt collagenase từ *B. subtilis*. FS - 2 cho thấy chỉ có 15% và 35% hoạt tính enzym bị mất sau khi xử lý enzym ở các nhiệt độ tương ứng 60°C và 65°C so với hoạt tính enzym được xử lý ở 30°C.

Collagenase từ *B. subtilis*. FS - 2 là một enzym bền nhiệt khi so sánh với các kết quả công bố về các collagenase khác. Ví dụ, collagenase của *Cytophaga* sp.L43-1 bị mất 50% hoạt tính khi chịu xử lý ở nhiệt độ 50°C, collagenase của *Pseudomonas* bị mất 75% hoạt tính khi chịu xử lý ở 55°C và bị vô hoạt hoàn toàn khi xử lý 30 phút ở 60°C; collagenase của *Bacteroides melaninogenicus* [50] bị mất 65% hoạt tính khi chịu xử lý 10 phút ở 60°C. Tuy nhiên khi so sánh kết quả thử nghiệm tính bền nhiệt của collagenase từ *B. subtilis*. FS - 2 với các kết quả thu được trong các thí nghiệm của Cronlund và cộng sự [34] lại thấy rằng collagenase từ *B. subtilis*. FS - 2 có tính bền nhiệt thấp hơn collagenase từ *C. histolyticum* và *A. iophagus* (hoạt tính của các enzym này không đổi hoặc tăng lên ở 65°C).

4.5.3. Ảnh hưởng của pH lên hoạt độ và tính ổn định pH của enzym

Trong thí nghiệm xác định pH tối thích cho phản ứng enzym, hoạt độ enzym được xác định tại pH khác nhau theo phương pháp đã mô tả trong phần phương pháp xác định hoạt độ enzym với cơ chất là gelatin. Kết quả kiểm tra ảnh hưởng của pH tới hoạt độ của collagenase được thể hiện trên hình 15.

Enzym có hoạt độ cao nhất trong dung dịch phản ứng có pH 9 và giảm dần khi cho pH tăng tiếp tục

Kết quả thí nghiệm xác định độ ổn định pH của collagenase từ *B. subtilis*. FS - 2 được trình bày trên hình 16.

Hoạt độ enzym ổn định trong khoảng pH từ 5 - 10, đạt ít nhất 86% so với hoạt độ enzym xác định được ở pH tối thích (pH9). Trong khoảng pH 7,5 tới 10, hoạt độ enzym được xử lý thay đổi rất ít. Khi so sánh với các dữ

liệu hiện có về colagense, collagenase từ *B. subtilis*. FS - 2 có độ bền trong khoảng pH rộng hơn nhiều, từ pH 5 - 10. Điều đó cho phép nghĩ đến khả năng sử dụng collagenase từ *B. subtilis*. FS - 2 trong nhiều lĩnh vực khác nhau.

4.5.4. Tính đặc hiệu cơ chất

Enzym tinh khiết được thử hoạt tính trên các cơ chất protein thông thường và đặc hiệu như casein, gelatin và collagen. Theo kết quả phân tích, enzym thuần khiết thể hiện hoạt tính đối với gelatin, collagen mà không thể hiện hoạt tính đối với casein.

Collagenase từ *B. subtilis*. FS - 2 được tinh chế và xác định các tính chất cơ bản. Collagenase từ *B. subtilis*. FS - 2 là một enzym tương đối bền nhiệt với nhiệt độ tối ưu cho phản ứng enzym là 50°C; ổn định trong vùng pH rộng từ 5 - 10 với pH hoạt động tối thích là 9. Enzym từ *B. subtilis*. FS - 2 được xác định là một enzym đặc hiệu với collagen và gelatin mà không thể hiện hoạt tính đối với casein. Phân tóm tắt các tính chất của collagenase từ *B. subtilis*. FS - 2 được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5: Tóm tắt các tính chất của collagenase từ *B. subtilis*. FS - 2.

Nhiệt độ tối ưu	50°C
Độ ổn định nhiệt	60°C (mất 15% hoạt độ) 65°C (mất 15% hoạt độ)
pH tối thích	9
Độ ổn định pH	pH 5 - 10
KLPT	125 kDa (hai dưới - đơn vị)
Cơ chất đặc hiệu	Collagen, gelatin

/////

4.6. Nghiên cứu ứng dụng

4.6.1. Kiểm định tính an toàn của chế phẩm enzym

Chế phẩm enzym kỹ thuật collagenase từ FS-2 được kiểm định an toàn trên động vật thử nghiệm chuột lang và chuột nhắt theo đường tiêu hoá (Trung tâm kiểm định sinh phẩm quốc gia). Kết quả kiểm định đã khẳng định tính an toàn của chế phẩm enzym từ *B. subtilis* FS-2 (phụ lục C). Như vậy chế phẩm có thể được cho phép sử dụng cho thực phẩm.

4.6.2 Nghiên cứu ổn định enzym

Enzym thu được đem sấy chân không ở $32 \pm 2^\circ\text{C}$, hoặc sấy động khô ở chế độ - 78°C , độ chân không 15 mT. Enzym được bổ sung các chất ổn định ở các nồng độ và theo từng giai đoạn khác nhau (sau khi hết tủa và sau khi sấy sơ bộ đến độ ẩm $W = 10 - 15\%$). Kết quả kiểm tra độ ổn định của collagenaza được thể hiện tại phụ lục D.

Bảo quản với chất ổn định là CaCl_2 và đệm Tris - HCl 50mM (Bảng D1) Chất ổn định là CaCl_2 và CaCl_2 + đệm Tris - HCl 50mM đều cho khả năng ổn định chế phẩm enzym cao. Ca^{++} là ion rất cần cho quá trình ổn định hoạt tính của collagenaza và có tác dụng giúp cho collagenaza hoạt động hiệu quả hơn.

Ở nồng độ 35% (w/w), CaCl_2 ổn định hoạt tính của collagenaza hiệu quả nhất. Ở nồng độ Ca^{++} cao hơn thì khả năng hút nước của chế phẩm cũng tăng lên nhưng chế phẩm vẫn có thể bị mất hoạt tính. Còn ở nồng độ thấp hơn cũng cho hiệu quả bảo quản tốt, nhưng không đạt giá trị cao, do nồng độ ion Ca^{++} chưa đủ cho việc ổn định và hoạt động của enzym collagenaza.

Bảo quản với chất ổn định là tinh bột biến tính (bảng D2_)

Sự có mặt của TBBT trong chế phẩm collagenaza là tăng khả năng ổn định của chế phẩm. Tinh bột biến tính là một chất hút ẩm rất tốt nên việc bổ sung vào trong chế phẩm enzym đã giúp cho việc loại bỏ nước có trong enzym và làm cho hoạt độ của enzym tăng lên đáng kể.

Với các nồng độ TBBT bổ sung khác nhau cũng cho khả năng ổn định khác nhau nhưng đều làm cho hoạt độ enzym tăng lên đáng kể theo thời gian. Nồng độ TBBT càng cao thì khả năng loại nước ra khỏi enzym càng tốt, giúp cho hoạt tính của enzym cũng tăng theo. Tuy nhiên ở nồng độ TBBT là 35% (w/w) thì hoạt độ enzym tăng lên một cách rõ rệt và đều qua các tháng. Hiện tượng này có thể giải thích là do ở nồng độ 35% (w/w) TBBT có khả năng loại nước của enzym nhưng vẫn duy trì được hàm lượng nước thiết yếu cần cho cấu trúc của phân tử collagenaza.

Bảo quản với chất ổn định là Chitosan và Polyvidon 25 (Bảng D3)

Với chất bảo quản là Chitosan và PVPP thì hiệu suất bảo quản cũng tăng theo thời gian. Chúng là những chất hút ẩm nên có thể giúp loại bỏ một phần nước có trong chế phẩm collagenaza khi bảo quản. Chitosan còn là một chất có khả năng kháng khuẩn rất tốt và không có độc tính nên có thể áp dụng trong thực phẩm và y tế. PVPP là một polyme nên nó cũng có khả năng hút ẩm tốt và giúp ổn định hoạt tính của enzym. Với hàm lượng chất bổ sung thấp, nó giúp cho việc ổn định chế phẩm tốt hơn so với Chitosan.

Bảo quản với chất ổn định là glycerol (bảng D4)

Chế phẩm enzym được bổ sung vào glycerol dưới 2 dạng như mô tả trong phần “Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu”. Hỗn hợp được bảo quản trong các ống nghiệm có nắp đậy kín, để ở 0°C. Các kết quả kiểm tra cho thấy glycerol có khả năng ổn định hoạt tính của collagenaza. Đối với enzym được hoà trong đệm trước khi bảo quản, nồng độ glycerol 70% cho khả năng ổn định đều qua các tháng. Ở những nồng độ cao hơn (80%, 90%) hoạt tính của enzym có tăng và tăng không đồng đều qua các tháng. Điều này có thể là do glycerol nồng độ cao ảnh hưởng đến phản ứng enzym. Khi bảo quản dưới dạng khô trong glycerol, hoạt tính enzym tương đối ổn định. Tuy nhiên ở nồng độ cao (9%) enzym không còn hoạt tính. Như vậy, collagenaza được bảo quản theo cách thức này chỉ nên sử dụng glycerol ở nồng độ $\leq 80\%$.

Trong số các chất ổn định ở trên, TBBT chỉ khả năng ổn định tốt nhất ở nồng độ 35%.

Ảnh 10. Chế phẩm collagenaza

4.6.3. Thử nghiệm khả năng phân giải collagen và làm mềm thịt

Trong thí nghiệm này, chúng tôi kiểm tra tính đặc hiệu thủy phân collagenase khi sử dụng collagenase làm mềm thịt nhằm cải thiện các đặc điểm bất lợi như thịt quá nhũn hoặc không có tác dụng khi sử dụng các enzym làm mềm thịt trước đây. Để đạt được mục đích thí nghiệm, chúng tôi cho collagenase lần lượt thủy phân collagen và protein tinh khiết. Sau đó kiểm tra lại khả năng thủy phân của enzym khi cho thủy phân thịt chứa nhiều collagen.

Kết quả thủy phân collagen (SPC) bằng collagenase FS-2 được biểu diễn trên 12.5% SDS-PAGE (hình 17A): Chuỗi α - và β của collagen được chỉ bằng mũi tên. Collagenase FS-2 thủy phân collagen (đường 3) sau 6h nhanh hơn các collagenase kiểm chứng khác (đường 2 và đường 4). Kết quả này chứng minh khả năng thủy phân collagen của collagenase FS2.

Hình 17. Tính thủy phân đặc hiệu của collagenase

A, Sản phẩm thủy phân collagen bằng collagenase CN2 (đường 2), FS2 (đường 3) M2-4 (đường 4) trên SDS-PAGE 12.5% (Nagano et al., 2001). B, Myofibrillar (đường 1) và myofibrillar thủy phân với collagenase FS-2 30min. (đường 2), 60 min. (đường 3) trên SDS-PAGE 15%.

Tính thủy phân đặc hiệu của collagenase được chứng minh khi collagenase không thủy phân myofibrillra sau 30 và 60 min ủ với collagenase (hình 17B). Đường chạy 1 (myofibrin) cho thấy vị trí của 2 băng protein ứng với actin và muosin 45 kDa và 205 kDa. Sản phẩm thủy phân myofibrin với collagenase (đường 3 và 4) cho thấy actin và myosin không bị thủy phân. Như vậy sử dụng collagenase trong làm mềm thịt có thể loại trừ các nhược điểm thường gặp phải khi sử dụng các enzym làm mềm khác do tính không đặc hiệu của chúng.

Thí nghiệm phân giải bò bằng collagenase từ FS-2 (bảng 5) chỉ thấy sau 30 - 120 phút ủ với enzym, hàm lượng nhóm - NH₂ của mẫu thử nghiệm tăng hơn so với mẫu đối chứng 200 - 1200%. Điều này khẳng định khả năng

sử dụng collagenase từ FS-2 cho thủy phân collagen, làm cơ sở cho việc làm tăng cao chất lượng thịt chứa nhiều collagen và làm mềm thịt.

Bảng 5. Biến đổi hàm lượng - NH₂ khi thủy phân gân bò bằng collagenase FS - 2

Mẫu	α -NH ₂ (mg/g)		
	30 min	60 min.	90 min.
Kiểm chứng	0.02	0.02	0.02
Mẫu	0.04	0.08	0.24
α -NH ₂ mẫu (%)	200	400	1200

Kết quả phân tích mẫu thịt bò cấp thấp (thịt vai) được xử lý với enzym cũng cho thấy sau thời gian xử lý 30 - 120 phút, hàm lượng nhóm - NH₂ của mẫu thử nghiệm tăng hơn so với mẫu đối chứng từ 167 - 1687% (bảng 6). Như vậy, việc thủy phân mở đường collagen của collagenase được hỗ trợ bởi các protease khác có mặt trong chế phẩm, làm giá trị thịt tăng cao so với mẫu không xử lý. Tuy nhiên, do không có điều kiện phân tích cấu trúc nên chưa có thông tin về biến đổi cấu trúc của mẫu xử lý dưới dạng tác dụng của enzym.

Bảng 6. Hàm lượng - NH₂ (mg/g) giải phóng do tác dụng của collagenase FS - 2.

Thời gian xử lý (phút)	Gân bò		Thịt bò		Xúc xích từ thịt cổ	
	Mẫu KC	Mẫu TN	Mẫu KC	Mẫu TN	Mẫu KC	Mẫu TN
30 phút	0,02 (100%)	0,04 (200%)	0,08 (100%)	0,10 (125%)		
60 phút	0,02	0,08(400 %)	0.08	0,38 (475%)	7,31 (100%)	8,61 (117%)
120 phút	0.02	0.24 (1200%)	0.08	135 (1678%)		

4.6.4 Thử nghiệm khả năng phân giải collagen da cá của enzym và FS2

Kết quả cho thấy khả năng phân giải da cá của vi khuẩn *B.subtilis* FS-2 trong chượp cá không cao. So với mẫu đối chứng hàm lượng axit amin tăng không đáng kể (hình 18A) và da cá cũng không bị thay đổi nhiều. Bề mặt da vẫn còn những lớp này bên ngoài. Hiện tượng này có thể được giải thích là do nồng độ muối quá cao trong chượp cá đã ức chế khả năng sinh tổng hợp collagenaza trong chượp (hình 18 và phụ lục E).

//////////

Hình 18: Sự tăng nồng độ axit amin trong chượp cá khi bổ sung FS-2 (A) và enzym (B)

Dung dịch enzym collagenase của FS-2 có bổ sung da cá được giữ trong 5 ngày. Quan sát độ thay đổi của da cá dưới kính hiển vi thấy rằng mẫu da cá mất đi các cấu trúc sợi ngang, dần nở lớn, mất sắc tố và dần bị mỏng đi, trong suốt.

Ở mẫu có bổ sung collagenaza hàm lượng axit amin tăng lên đáng kể so với mẫu đối chứng. Rõ ràng, collagenaza đã hoạt động tốt trong môi trường có nồng độ muối cao. Điều này mở ra khả năng sử dụng collagenaza vào khâu lọc để giảm bớt khó khăn đồng thời rút ngắn thời gian sản xuất nước mắm. Sau khi bổ sung, collagenaza hoạt động tốt sau khoảng thời gian 24 - 48 giờ. Vậy trong sản xuất nước mắm muốn đạt hiệu quả xử lý cao ta có thể kết hợp cả 2 phương pháp: bổ sung *B.subtilis* FS-2 vào giai đoạn đầu của công đoạn muối cá và ở giai đoạn cuối của quá trình này thì bổ sung collagenaza (hình 18B).

4.5.6. Khả năng sử dụng collagenase trong phân giải một số protein dị ứng

Như đã trình bày trong phần phương pháp, gliadin và α_3 - casein được sử dụng trong thí nghiệm phân giải bởi collagenase của *β. Subtilis* FS-2 với vai trò các cơ chất protein có khả năng gây dị ứng để thử nghiệm khả năng làm

giảm tính gây dị ứng của enzym. Các hỗn hợp phản ứng trong đệm photphat natri 0,1 M, pH7 với tỷ lệ enzym: cơ chất là 1: 100 được ủ ở 37°C trong 24 giờ trên máy lắc ngang. Mẫu đối chứng là một hỗn hợp tương tự khi thay dung dịch enzym bằng dung dịch đệm. Sản phẩm phản ứng được phân tách trên SDS-PAGE nồng độ 12,5%.

Kết quả phân tách hỗn hợp sản phẩm phân giải gliadin và α_3 - casein bằng collagenase của *B. Subtilis* FS-2 trên SDS - PAGE 12,55 được trình bày trên hình 19.

Kết quả cho thấy các mẫu sau 24 giờ xử lý với enzym không thể hiện trên điện di đồ các băng protein của gliadin và α_3 - casein. Collagenase có khả năng biến cấu trúc protein này, phân giải các cơ chất dị ứng và tái kết hợp tạo thành chất có KLPT cao hơn mà không phân giải tới axit amin sau 24 giờ thí nghiệm.

/////

Các phản ứng phân giải gliadin và α_3 - casein bởi collagenase từ *B. Subtilis* FS-2 được gửi thử nghiệm với huyết thanh của các bệnh nhân dị ứng với sản phẩm sữa và bột mì trong phản ứng ELISA.

Theo đánh giá, nếu giá trị đo được của hỗn hợp phản ứng miễn dịch ELISA cho giá trị nhỏ hơn 0,05 (đo tại bước sóng 490nm) thì sản phẩm thử nghiệm không có tính dị ứng. Kết quả thử nghiệm ELISA với sản phẩm phân giải bởi collagenase sau 24 giờ của cả gliadin và α_3 - casein đều cho giá trị nhỏ hơn 0,05 trong khi thử nghiệm với gliadin và α_3 - casein trong mẫu đối chứng tại 0 giờ và 24 giờ cũng như các mẫu thí nghiệm tại 0 giờ cho kết quả lớn hơn 2.0. Như vậy, sau khi được xử lý 24 giờ với collagenase của *B. Subtilis* FS-2, các sản phẩm phân giải của protein dị ứng nghiên cứu không còn thể hiện tính gây dị ứng.

Kết quả thí nghiệm đã chứng minh khả năng sử dụng collagenase thu được từ *B. Subtilis* FS-2 trong việc cải thiện tính chất gây dị ứng của một số thực phẩm gây dị ứng nghiên cứu thông qua khả năng phân cắt hạn chế đặc

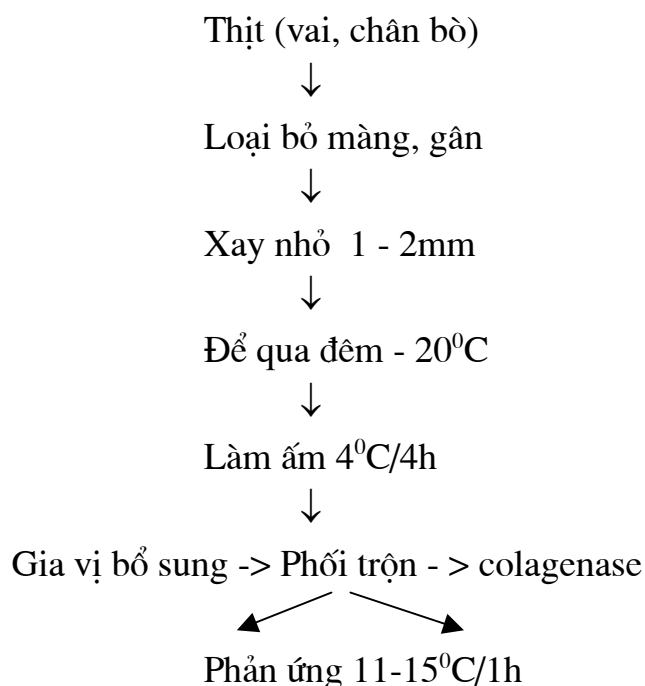
hiệu của bản thân collagenase. Việc sử dụng collagenase từ *B. Subtilis* FS-2 cho thấy kết quả tương tự như kết quả sử dụng collagenase từ *C.histobyticum* với tính chất công nghệ cải thiện hơn so với việc sử dụng các proteaza phân cắt không đặc hiệu khác. Hơn thế nữa, khả năng phân cắt hạn chế protein tới các peptit mà không tới các axit amin của collagenase còn là cơ sở cho việc sử dụng enzym này cho việc thủy phân hạn chế protein với mục đích cải thiện tính chất chức năng và dinh dưỡng của các protein trong các công nghệ protein.

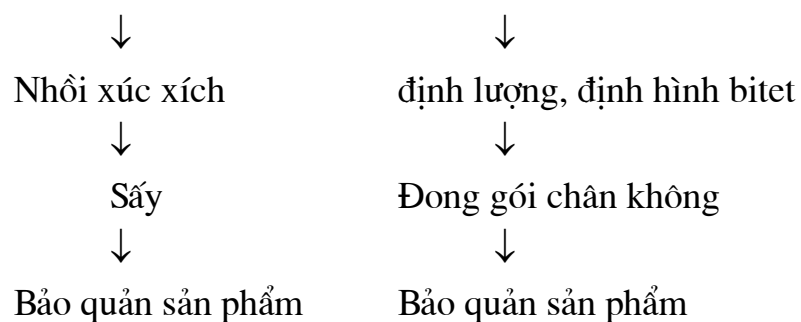
4.6.6. Thử nghiệm sản xuất một số sản phẩm thử nghiệm

Sản phẩm từ thịt bò cấp thấp:

Từ các kết quả thu được, chúng tôi tiến hành thử nghiệm sản xuất một số sản phẩm từ thịt bò cấp thấp chứa nhiều collagen (xuc xich từ thịt vai, thịt cổ, bittet thịt vai), xử lý với collagenase của FS-2 trong 60 phút ở nhiệt độ 11⁰C, đánh giá khả năng thủy phân của mẫu và đánh giá cảm quan sơ bộ mẫu thí nghiệm. Kết quả thực nghiệm cho thấy có sự khác biệt về hàm lượng -NH₂ của mẫu xử lý so với đối chứng (tăng tương ứng là 7,5 và 17%. Kết quả đánh giá cảm quan so sánh cho thấy có sự khác biệt về độ mềm của mẫu.

Quy trình tạo sản phẩm như sau:





Công thức sản phẩm thử nghiệm như sau:

Thịt bò	:	100gam
NaCl	:	0,75gam
Na ₅ P ₃ O ₁₀	:	0,5gam
Colagenaza	:	128U

Gia vị chứa collagenase

Trên cơ sở các kết quả trình bày ở trên, chúng tôi thiết lập một công thức gia vị chứa collagenase dùng cho thịt bò chứa nhiều collagenase để sử dụng thông dụng. Tất cả các thành phần gia vị được sấy kho tách riêng tước khi đem phối trộn với nhau. Gia vị chứa 10U/g collagenase

Ảnh chụp các mẫu sản phẩm được trình bày trong phụ lục F.

CHƯƠNG V. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ

5.1. Độ tin cậy của kết quả

Mọi thí nghiệm thực hiện trong báo cáo này đều được lặp lại ít nhất hai lần. Các thí nghiệm được thực hiện với hoá chất tinh khiết sử dụng cho nghiên cứu. Thiết bị và phương pháp nghiên cứu là thông dụng, hiện đại và tin cậy. Do vậy mọi số liệu thu được theo đầu tài là các số liệu trung thực, chính xác và tin cậy.

5.2. Tính ổn định của công nghệ

Các quy trình công nghệ kết quả nghiên cứu để đề tài đều được lặp lại không dưới 50 lần. Các lần thí nghiệm đều cho kết quả lặp lại. Như vậy quy trình công nghệ của đề tài này rất tin cậy và ổn định, tuy nhiên mới chỉ ở mô hình phòng thí nghiệm.

Một yếu tố khác cũng cần lưu ý là do mục tiêu của đề tài là sử dụng collagenase cho sản xuất thực phẩm, do vậy để đề tài chủ trương tập trung nghiên cứu quy trình thu nhận chế phẩm enzym kỹ thuật và an toàn. Quy trình đã được hoàn chỉnh và kiểm tra tính ổn định cũng như điều kiện ổn định hoạt tính enzym. Enzym cũng được kiểm tra tính an toàn để dùng trong thực phẩm.

5.3. Kết quả đào tạo

Đề tài đã tham gia đào tạo 04 cán bộ khoa học ở trình độ đại học, 01 tiến sĩ và nâng cao trình độ của cá cán bộ tham gia đề tài trong lĩnh vực công nghệ enzym và công nghệ vi sinh.

5.4. Đánh giá toàn diện.

Đề tài nghiên cứu đã hoàn thành mục tiêu nghiên cứu đặt ra. Các kết quả đề tài đã góp thêm kiến thức về công nghệ enzym tại Việt Nam (enzym collagenase là enzym chưa được nghiên cứu tại Việt Nam) cũng như tìm ra nguồn enzym an toàn cho phép khai thác sử dụng enzym này cho thực phẩm và trong các ngành khác. Do là một đề tài nghiên cứu mở đầu cũng như mục tiêu đề tài là tìm kiếm nguồn enzym, các kết quả đề tài là ở quy mô phòng thí nghiệm.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Từ kết quả nghiên cứu đã trình bày, chúng tôi xin được rút ra một số kết luận sau đây:

1. Đã phân lập và xác định hoạt tính collagenase của hệ vi sinh vật của một số thực phẩm lên men truyền thống ở Việt Nam và các nước lân cận. Đã lựa chọn được chủng vi khuẩn không sinh độc tố *Bacillus subtilis* FS - 2 được phân lập từ chượp cá là chủng hoạt động nhất trong bộ sưu tập.

2. Hoàn thiện 01 quy trình tổng hợp enzym với môi trường nhân giống, môi trường tổng hợp enzym, thời gian tối thích thu nhận enzym với

cơ chất là gelatin - polypepton - glucose (0,3% - 0,75% - 1%), NaCl 1%, 35 - 37°C, pH 7,4. enzym thu nhận ở giữa pha cân bằng (28h).

3. Đề xuất 01 quy trình thu nhận chế phẩm enzym tinh khiết. Hoàn thiện 02 quy trình thu nhận enzym kỹ thuật. Các quy trình này cho phép thu hồi enzym với hiệu suất 50 - 59%.

4. Đã xác định được các đặc tính cơ bản của collagenase của *B. subtilis* FS - 2: điều kiện tối ưu cho phản ứng enzym: 50°C, pH 9; enzym bền ở nhiệt độ cao (mất 15% và 35% hoạt độ ở 60°C và 65°C), bền trong vùng pH 5 - 10; KLPT của enzym: 125 kDa, bao gồm hai dưới - đơn vị có KLPT mỗi phân 60 kDa; cơ chất đặc hiệu: collagen và gelatin.

5. Chế phẩm enzym được làm ổn định với các chất bổ sung và ổn định khác nhau, dưới dạng các chế phẩm kỹ thuật cho các mục đích sử dụng khác nhau: tinh bột biến tính, Ca^{+2} , Chitosan... Chế phẩm được thử nghiệm ổn định hoạt tính trong thời gian bảo quản.

6. Khảo sát tính an toàn của chế phẩm cho thấy chế phẩm đạt tiêu chuẩn an toàn.

7. Đã nghiên cứu thăm dò khả năng sử dụng collagenase từ *B. subtilis* S - 2 để làm giảm tính gây dị ứng của một số protein thực phẩm làm cơ sở tạo ra các sản phẩm không dị ứng.

8. Sử dụng collagenase làm tăng chất lượng v thịt chứa nhiều collagen, nâng cao giá trị tăng cho sản phẩm. Collagenase được chứng minh đặc tính đặc hiệu trong làm mềm thịt.

9. Nghiên cứu thăm dò khả năng sử dụng collagenase trong sản xuất nước mắm cho thấy enzym thủy phân dân tộc cá chỉ sau 1 ngày nuôi cấy cùng FS - 2. Hàm lượng axit amin chượp cá tăng 25% khi bổ sung enzym trong chượp. Kết quả này cho phép nâng cao hiệu suất thu hồi và rút ngắn thời gian lọc nước mắm.

10. Thử nghiệm sản xuất một số sản phẩm: chế phẩm enzym kỹ thuật, gia vị chứa collagenase, xúc xích và bitết từ thịt bò chứa nhiều collagen.

Kiến nghị

1. Chưa có đủ thời gian, kinh phí và cơ sở vật chất để sản xuất thử enzym ở quy mô lớn hơn, thu nhận lượng lớn enzym để có thể tiến đến giới thiệu sản phẩm rộng rãi, do vậy khả năng đưa kết quả nghiên cứu ra thực tế bị hạn chế.

2. Đề nghị được tiếp tục khai thác kết quả nghiên cứu và khai thác ứng dụng thực tế trong lĩnh vực thực phẩm và các lĩnh vực khác.

Nhóm thực hiện đề tài “Nghiên cứu phân lập, tuyển chọn, sinh tổng hợp enzym collagenase và ứng dụng trong thực phẩm” xin trân trọng cảm ơn Bộ KH&CN và Ban chủ nhiệm chương trình Công nghệ sinh học, Ban chủ nhiệm đề tài 04 - 07 đã cho phép chúng tôi được thực hiện nội dung nghiên cứu đã đăng ký. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự phối hợp của Ban thư ký đề tài đã giúp đỡ nhóm đề tài về các thủ tục hành chính cần thiết để đề tài có thể thực hiện đúng tiến độ. Nhóm đề tài Collagenase xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học - Công nghệ thực phẩm, trường đại học Bách khoa Hà Nội đã hết lòng ủng hộ công việc nghiên cứu của chúng tôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Quỳnh Anh. Thu nhận, ứng dụng pepsin và proteaza axit của *A.niger* trong y học và chăn nuôi. đề tài Phó tiến sĩ khoa học, trường Đại học Bách khoa Hà Nội, Hà Nội, 1985.
2. Nguyễn Hữu Chấn. Enzym và xúc tác sinh học. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 1983.
3. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học. Tập 3. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 1987, 441.
4. Lê Văn Nhung và Ngô Thị Mai. Tổng hợp cảm ứng và tổng hợp bản thể các enzym ở vi sinh vật. Vi sinh vật học (tuyển tập). Tập II. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1975.
5. Lương Đức Phẩm, Hồ Sưởng. Vi sinh tổng hợp, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1975, 470.
6. Lâm Xuân Thanh, Nghiên cứu các phương pháp biến hình protein đậu tương và ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm. Đề tài Phó tiến sĩ khoa học kỹ thuật, Hà Nội, 1996.
7. Phạm Quốc Thăng, Đồng Thanh Thu, Vũ Kim Thành. Nghiên cứu sản xuất Pancreatin. Báo cáo Hội nghị khoa học trường Đại học Bách khoa Hà Nội, Hà Nội, 1983.
8. Lê Ngọc Tú, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẩn, Ngô Hữu Hợp, Đặng Thị Thu, Nguyễn Trọng Cẩn, Hoá học thực phẩm. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1994, 292.
9. Lê Ngọc Tú, La Văn Chúc, Phạm Trân Châu, Nguyễn Lân Dũng. Enzym vi sinh vật. Tập 1 và 2. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1982.
10. Tuyển tập báo cáo khoa học Hội nghị khoa học trường Đại học Bách khoa Hà Nội lần thứ 16. Tập I, Hà Nội, 1990.
11. Tuyển tập báo cáo khoa học. Hội thảo quốc gia và khu vực nhân năm Louis Pasteur, Hà Nội, 1995.

12. Viện công nghiệp thực phẩm. Các công trình nghiên cứu ứng dụng Công nghệ sinh học và Công nghiệp thực phẩm giai đoạn 1986 - 1995. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1996.
13. Wolfgang Frit Sche. Chương 7: Enzym: Cơ sở hoá sinh của vi sinh vật học công nghiệp. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1983.
14. Audigé Cl., Zonszain F. Biochimie Structure. Doin éditeurs - Paris, 1987.
15. Cheftel JC., Cheftel H and Besancon P. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Vol 1. 9^{ème} tirage, Techniques et Documentation - Lavoisier, Paris, 1992.
16. Chefel JC., Cuq JL. Et Lorient D. Protéines alimentaires. Techniques et Documentation - Lavoisier, Paris, 1985.
17. Cuq Jean - Louis. Les méthodes modernes d'analyse rapide en microbiologie alimentaire. Agro - alimentaire information N.9, C.D.I.U.P.A., Massy, Paris, 1993.
18. Ribardeau - Dumas B., Bringion G., Grosclaude F. et Mercier J.C. Structure primaire de la caséine β -A₂ bovine. Sequence complete. Eur. J. Biochem. 225, 1972, 505 - 514.
19. Scriban René. Biotechnologie. Technique et Documentation - Lavoisier, Paris, 1993.
20. Weil Jack Henry. Biochimie générale. 8^e édition, Masson, Paris, 1997.
21. Adornnithae S., Akiyama K., Sasaki T., Takata R. Isolation and characterization of a collagenolytic enzyme from *Bacillus licheniformis* N22. J. Ferment. Bioeng., 78, 1994, 283 - 287.
22. Ahmed T., Fuchs G.J. Gastrointestinal allergy to food: a review. Diarrhoeal. Dis. Res. Dec. 15, 1997, 211 -223.
23. Amano M., Ogawa H., Kofima K., Kamidair T., Suetsugu S., Yoshihama M., Satoh T., Samejima. T. and Matsumoto I. Identification of

the major allergens in wheat flour responsible for bakers asthma. *Biochem. J.* 330, 1998, 1229 - 1234.

24. Andrew P. The gel filtration behavior of protein related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* 96, 1965, 595 - 606.

25. Ashie I.N.A. and Shimpson B.K. α_2 - macroglobulin inhibition of endogenous protease in fish muscle. *J. Food Sci.*, 61, 1996, 357 - 361.

26. Bailey A.j. The chemistry of intramuscular collagen. In "Recent advances in the chemistry of meat". Royal Society of Chemistry, London 1984, 22-27.

27. Barman T.E.. *Enzyme handbook*. Vol.2. 1985, 2nd ed., Springer - Verlag, Berlin - Heidelberg.

28. Bernal V.M. and Stanley D.W. Change in the melting characteristic bovine tendon collagen induced by a bacterial collagenase. *J. Food Sci.* 51, 1986, 834 - 835.

29. Bernal V.M. and Stanley D.W. Stability of bovine muscle connective tissues. *J. Food Sci.*, 52, 1987, 876-878.

30. Boethling R.S.J. *Bacteriol.* 123. 1975, 954-960.

31. Bond M.D. and Van Wart H.E. Characterization of the individual collagenase from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry*, 23, 1984, 3085 - 3091.

32. Brocklehurst K., Baines B.S., and Kierstan M.P.J. Papain and other constituents of *Carica papaya* L. In "Topics in enzyme fermentation Biotechnology". Ellis Horwood Ltd. Chicago, 1981.

33. Claus D. and Berkeley, R.C.W. *Bergeys manual of systematic bacteriology*. Vol. 2, ed by Sneath, P.H.A. Mair, N.S. and Sharpe M.E., William and Wilkins, Baltimore, 1986, 1105 - 1139.

34. Cronlund A.L. and Woychik J.H. Solubilisation of collagen in restructured beef with collagenase and α -amylase. *J. Food Sci.*, 52, 1987, 857 - 860.

35. Daarselaar M.C.C. and Harder W. Some aspects of the regulation of the production of the extracellular proteolytic enzyme by a marine bacterium. *Arch. Microbiol.* 101, 1974, 21 - 34.
36. Dickinson E. and Stanby G. *Food Technol.* 41, 1987, 74 - 116.
37. Drucker H. Regulation of the exoprotease in *Neurospora crassa*: induction and repression of enzyme synthesis. *J. Bacteriol.* 110, 1972, 1041 - 1049.
38. Endo A., Murakawa S., Shimizu H. and Shiraishi Y. Purification and properties of collagenase from a *Streptomyces* species. *J. Biochem.*, 102, 1987, 163 - 170.
39. Enzyme nomenclature: Recommendations of the International Union of Biochemistry. Academic Press, New York, 1987.
40. Enzyme structure database.
<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/entries/ec/ec04/ec24/ec0003index.html>.
41. Enzyme structure database. http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget.ec:3.4.24.3.
42. Enzyme structure database. <http://www.expasy.ch/cgi-bin/get-enzyme-entry3.4.24.3>.
43. Enzyme structure database. [http://srs.ebi.ac.uk/srs5bin/cgi-bin/tz-e+\[BRENDA-EC number: "3.24.4.3"\]](http://srs.ebi.ac.uk/srs5bin/cgi-bin/tz-e+[BRENDA-EC number: '3.24.4.3']).
44. Fernando L. Garcia - Carreno, M. Patricia Hernades - Cortes and Norman F. Harrod. Enzyme with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1994, 1456 - 1461.
45. Fiochi A., Restani P., Riva E., Restelli A.R., Biasucci G., Galli CL., Giovannini M. Meat allergy: II - Effect of food processing and enzymatic digestion on the allergenicity of bovine and ovine meats. *J. Am. Coll. Nutr.* Jun, 14, 1995, 245 - 250.

46. Fox. P.F. Food enzymology, vol.2. Elsevier Applied Science, London and New York, 1991.
47. Fukushima J., Takeuchi H., Tanaka E., Hamajima K., Sato Y., Kawamono S., Morihara K., Keil B. and Okuda K. Molecular cloning and partial DNA sequencing of the collagenase gene of *Vibrio alginolyticus*. Microbiol. Immunol. 34, 1990, 977 - 984.
48. Furcolo G. Marziali M. and Businco L. Food allergay: recent finding. Pediatr. Med. Chir. 18, 1996, 551 - 557.
49. Gallop P.M., Seifter S. and Meilman E. Study on collagen. J. Biol. Chem. 227, 1957, 891 - 906.
50. Gibbons R.J. and McDonal J.B. Degradation of collagenous substrates by *Bacteroides melaninogenicus*. J. Biochem. 81, 1961, 614 - 621.
51. Giger O., Charilaou C.C. and Cundy K.R. J. Clin. Microbiol., 19, 1984, 68 - 72.
52. Gilles A.M. and Keil B. Cleavage of β -casein by collagenases from *Achromobacter iophagus* and *Clostridium histolyticum*. FEBS letters. 6, 1976, 369 - 372.
53. Goldberg GI., Wilhelm SM., Kronberger A., Bauer E., Grant GA. And Eisen AZ. Human fibroblast collagenase. J. Boil. Chem. 261, 1986, 6600 - 6605.
54. Goodwin, B.F.J., Rawcliffe, P.M. Food alergies associated with cere al product. Food Chem., 11, 1983, 321 - 338.