

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**

PHAN THỊ VIỆT HÀ

**NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH, KHẢO SÁT
TÍNH CHẤT CỦA LECTIN TỪ HẠT ĐẬU
ĐỎ TÂY (PHASEOLUS VULGAIS) VÀ ĐỀ
XUẤT HƯỚNG ỨNG DỤNG**

Chuyên ngành: Công nghệ Thực phẩm và Đồ uống
Mã số : 60.54.02

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ KỸ THUẬT

Đà Nẵng – Năm 2011

Công trình được hoàn thành tại
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

Người hướng dẫn khoa học: **PGS.TS. Trần Thị Xô**

Phản biện 1: GS.TS. Đào Hùng Cường.

Phản biện 2: GS.TSKH. Lê Văn Hoàng.

Luận văn sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm
Luận văn tốt nghiệp thạc sĩ kỹ thuật họp tại
Đại học Đà Nẵng vào ngày 26 tháng 7 năm 2011.

Có thể tìm hiểu luận văn tại:

- Trung tâm Thông tin-Học liệu, Đại học Đà Nẵng
- Trung tâm Học liệu, Đại học Đà Nẵng

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Lectin là một glycoprotein có hoạt tính sinh học, có khả năng gắn kết với tế bào hồng cầu, tương tác có chọn lọc với saccharide. Lectin ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như nông nghiệp, sinh hóa, vi sinh vật học, tế bào học, miễn dịch học, y dược học... Lectin có khả năng gây ngưng kết với các tế bào vi khuẩn, nấm men hoặc nấm mốc. Do vậy, lectin từ đậu tương (SBA) và ốc sên (HPA) dùng để nhận dạng vi khuẩn gây bệnh than *Bacillus anthracis* (chúng rất khó phân biệt với các chủng *Bacillus* khác) [13].

Lectin được phân bố rộng rãi trong thực vật, động vật và cả vi sinh vật. Lectin thu nhận từ các nguồn khác nhau thì có cấu trúc, trọng lượng phân tử và thành phần hóa học cũng như đặc tính sinh học khác nhau.

Xuất phát từ những lí do trên, để đi sâu vào nghiên cứu lectin họ đậu chúng tôi chọn đề tài nghiên cứu: **“Nghiên cứu chiết tách, khảo sát tính chất của lectin từ hạt đậu đỏ tây (*phaseolus vulgaris*) và đề xuất hướng ứng dụng”**, nhằm góp phần khai thác nguồn tài nguyên lectin phong phú từ nguồn thực vật của Việt Nam.

2. MỤC ĐÍCH NGHIÊN CỨU

- Chiết tách lectin từ hạt đậu đỏ tây, tinh sạch lectin này.
- Khảo sát một số tính chất lý hóa của lectin.
- Đề xuất hướng ứng dụng của nó.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

- Nguyên liệu hạt đậu đỏ tây.
- Tế bào hồng cầu người.

- Nấm men bia.
- Nghiên cứu được thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm.

4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Phương pháp xác định độ ẩm, phương pháp xác định hàm lượng protein, phương pháp xác định hàm lượng glucit tổng bằng phương pháp Bertran, phương pháp xác định hoạt độ lectin, phương pháp điện di trên gel polyacrylamide.

5. Ý NGHĨA KHOA HỌC CỦA ĐỀ TÀI

- Khảo sát một số thành phần hóa học của hạt đậu đỏ tây mua tại địa bàn Đà Nẵng. Khảo sát được hàm lượng lectin có trong đậu đỏ tây.

- Tăng thêm những hiểu biết về cấu tạo và tính chất của lectin họ đậu.

6. Ý NGHĨA THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

- Xây dựng qui trình chiết tách và xác định những tính chất lý hóa đặc trưng của lectin, từ đó có thể thu nhận lectin ở quy mô lớn hơn để đưa vào ứng dụng thực tế.

- Từ nguồn lectin đã được nghiên cứu các đặc tính có thể đề xuất các hướng ứng dụng khác nhau.

7. CẤU TRÚC CỦA LUẬN VĂN

Ngoài phần mở đầu, kết luận, tài liệu tham khảo và phụ lục trong luận văn được thành các chương như sau :

Chương 1: Tổng quan

Chương 2: Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Chương 3: Kết quả và thảo luận.

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. LƯỢC SỬ VÀ TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU LECTIN TRÊN THẾ GIỚI VÀ Ở VIỆT NAM

1.1.1. Sơ lược lịch sử lectin

1.1.2. Tình hình nghiên cứu lectin trên thế giới và Việt Nam

1.1.2.1. Tình hình nghiên cứu lectin trên thế giới

1.1.2.2. Tình hình nghiên cứu lectin ở Việt Nam .

1.2. SỰ PHÂN BỐ LECTIN TRONG SINH GIỚI

1.2.1. Sự phân bố lectin trong thực vật

Ở Việt Nam tính phổ biến của lectin lần đầu tiên được nghiên cứu vào năm 1983 bởi Nguyễn Thị Thịnh và cộng sự. Kết quả nghiên cứu 90% loài đậu ở Việt Nam có chứa lectin [11].

1.2.2. Sự phân bố lectin trong động vật

1.2.3. Sự phân bố lectin trong vi sinh vật.

1.3. TÍNH CHẤT CỦA LECTIN

1.3.1. Thành phần hóa học, cấu trúc và khối lượng phân tử của lectin

1.3.1.1. Thành phần hóa học

Vậy lectin có bản chất là protein, chủ yếu là glycoprotein.

1.3.1.2. Cấu trúc của lectin

Lectin là một loại protein nên lectin có cấu trúc bậc 1, 2, 3 và bậc 4 như những protein thông thường khác. Ngoài những lectin có cấu trúc không gian đơn giản, các lectin có cấu trúc không gian phức

tạp đều chứa trung tâm hoạt động, đây là nơi liên kết với carbohydrate và quyết định hoạt độ của lectin. Theo tác giả Bourillon (1973) ngoài gốc acid amin tạo nên trung tâm hoạt động, một số ion kim loại cũng tham gia hoạt động của lectin như là các ion Mg^{2+} , Mn^{2+} .

1.3.1.3. Khối lượng phân tử của lectin

Lectin là một polyme sinh học, có khối lượng phân tử lớn, khối lượng phân tử dao động trong phạm vi khá rộng từ hàng ngàn cho đến hàng trăm ngàn Dalton [30]. Lectin từ nguồn gốc thực vật có khối lượng phân tử bé nhất là lectin từ rễ cây *Urtica dioica* (họ gai *Urticaceae*), khoảng 8,5 kDa. Lectin từ một số thực vật cũng đã được xác định khối lượng phân tử như lectin của một số loài mít chi *Artocarpus* có khối lượng phân tử khoảng 50 kDa, lectin từ loài táo đỏ (*Plumosa plumosa*) có khối lượng phân tử 150 kDa [20].

1.3.2. Các tính chất đặc trưng của lectin

1.3.2.1. Tính tan của lectin

1.3.2.2. Sự tương tác của lectin với đường

Khả năng tương tác với đường là một trong những tính chất điển hình của lectin. Lectin có thể liên kết với cả phân tử đường đơn lẫn cả gốc đường nằm trên bề mặt tế bào. Các loại đường như glucose, galactose, manose ... có khả năng tương tác với nhiều loại lectin [20]. Khả năng tương tác đặc hiệu của lectin - đường đã được ứng dụng nhiều trong các nghiên cứu tế bào học, huyết học và miễn dịch học.

1.3.3. Đặc tính sinh học và miễn dịch học của lectin

1.3.3.1. Khả năng gây ngưng kết tế bào

1.3.3.2. Khả năng kích thích và kìm hãm phân bào

1.3.3.3. Các quyết định kháng nguyên nhận biết

1.4. ỨNG DỤNG CỦA LECTIN

Sử dụng lectin để phân loại nhóm máu là ứng dụng sớm nhất, cho đến nay vẫn còn được áp dụng rộng rãi. Phương pháp xác định nhóm máu bằng lectin cho kết quả nhanh, chính xác mà không cần dùng huyết thanh mẫu. Lectin được sử dụng như một công cụ chẩn đoán có hiệu quả (dựa vào khả năng tác dụng đặc hiệu lên một số loại vi sinh vật), kết hợp với các xét nghiệm thông thường khác để nâng cao giá trị chẩn đoán bệnh.

Do bề mặt của vi khuẩn mang các gốc đường, lectin có thể kết hợp với các vị trí liên kết tiềm năng này, thêm vào đó là tính đặc hiệu khiến chúng trở thành công cụ hữu ích trong việc nhận dạng vi khuẩn [22].

Do có khả năng liên kết với đường và các hợp chất chứa đường (thành phần cấu tạo quan trọng trên bề mặt tế bào), lectin có tiềm năng ứng dụng rất lớn trong sinh - y học.

Việc nghiên cứu lựa chọn lectin tương tác đặc hiệu với các loại vi khuẩn có thể giúp ích trong việc định danh các vi sinh vật này.

1.5. TỔNG QUAN VỀ ĐẬU ĐỎ TÂY

Đặc tính thực vật: đậu tây (*Phaseolus vulgaris*) thuộc họ thực vật *Fabiaceae*. Cây thuộc loại thân thảo thấp hay dây leo. Hàm lượng protein trong đậu tây chiếm khoảng 17-23% trọng lượng chất khô [24].

Chương 2

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ

2.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Nguyên liệu nghiên cứu là hạt đậu đỏ tây (*Phaseolus vulgaris*). Thu mua ở Trung tâm Thương nghiệp, thành phố Đà Nẵng.

2.1.2. Hóa chất

Những hoá chất sử dụng trong nghiên cứu này là những hoá chất có độ tinh khiết cao, sử dụng trong phân tích, được mua của các hãng Sigma, Merk và Trung Quốc. Các dụng cụ và hóa chất thuộc trung tâm công nghệ sinh học môi trường thuộc đại học Bách Khoa Đà Nẵng và trung tâm y tế dự phòng thành phố Đà Nẵng.

- Hồng cầu các nhóm máu người do khoa Huyết học, bệnh viện Đa Khoa Đà Nẵng cung cấp.

2.1.3. Dụng cụ và thiết bị

Sử dụng các dụng cụ và thiết bị thuộc trung tâm công nghệ sinh học môi trường thuộc đại học Bách Khoa Đà Nẵng và trung tâm y tế dự phòng thành phố Đà Nẵng.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp xác định độ ẩm [14]

2.2.2. Phương pháp xác định hàm lượng protein

2.2.2.1. Xác định hàm lượng protein thô [14]

2.2.2.2. Phương pháp xác định hàm lượng protein tổng số bằng phương pháp đo quang [6]

Xác định hàm lượng protein tổng số bằng đo hấp thụ quang ở $\lambda=280$ và $\lambda=260$ (nm) trên máy quang phổ kế hiệu UV (SmartSpecTM Plus Spectrophotometer - Bio Rad).

Hàm lượng protein được tính theo công thức

$$PC_{(pr)} = (1,55 * A_{280} - 0,77 * A_{260}) * D \quad (\text{mg/ml})$$

Trong đó: $PC_{(pr)}$: Nồng độ protein (mg/ml). A_{260} , A_{280} : Độ hấp thụ quang của mẫu ở $\lambda = 260$ (nm) và $\lambda = 280$ (nm). D: Độ pha loãng của dung dịch mẫu (lần).

2.2.3. Phương pháp xác định hàm lượng glucit tổng bằng phương pháp Bertran

2.2.4. Phương pháp xác định hoạt độ lectin [13]

Hoạt độ lectin được xác định theo phương pháp ngưng kết hồng cầu của Gebauer trên bản nhựa đáy nhọn microtiter.

Cách tiến hành: Dùng micropipetter cho vào mỗi giếng của bản nhựa microtiter 50 μ l đệm PBS pH 7,2. Lấy 50 μ l mẫu thí nghiệm cho vào giếng thứ nhất trộn đều, lấy ra 50 μ l đưa vào giếng thứ hai trộn đều, rồi lại lấy 50 μ l từ giếng thứ hai cho vào giếng thứ 3... cho đến giếng thứ 10 (lấy ra 50 μ l rồi bỏ đi). Như vậy ta có nồng độ mẫu pha loãng 2^n lần (n là số giếng đã pha loãng, ở đây là giếng thứ 10). Giếng thứ 11 và 12 không có mẫu được sử dụng làm mẫu đối chứng.

Cho vào mỗi giếng của bản nhựa 50 μ l hồng cầu của các nhóm máu. Hồng cầu của các nhóm máu trước khi sử dụng được rửa sạch bằng nước muối sinh lý (NaCl 0,9%) từ 2-3 lần (ly tâm 3000 rpm/5') và pha loãng ở các nồng độ 2-5% bằng nước muối sinh lý. Vậy tổng thể tích mẫu và hồng cầu trong mỗi giếng là 100 μ l.

Để yên bản nhựa chứa mẫu lectin và hồng cầu ở nhiệt độ phòng từ 30 phút đến 1 giờ, tiến hành đọc kết quả. Kết quả được đọc dựa trên sự đối chiếu với các giếng đối chứng. Giếng đối chứng có hiện tượng hồng cầu tụ gọng xuống đáy giếng. Giếng nào mà hồng cầu tạo lớp màng mỏng không tụ gọng xuống đáy giếng thì chứng tỏ có hiện tượng ngưng kết, nghĩa là có hoạt tính lectin. Kết quả đọc ở giếng cuối cùng có sự ngưng kết. Hoạt tính gây ngưng kết được tính như sau :

- **Hoạt độ chung (HĐC)** của lectin (viết tắt là HAA) được xác định là nghịch đảo của độ pha loãng lớn nhất của dịch lectin mà ở đó nó còn có khả năng gây ngưng kết toàn bộ lượng hồng cầu [28].

$$\text{HĐC (Đv/ml)} = \frac{2^n}{V}$$

Trong đó

n là số giếng còn hoạt tính lectin.

V : thể tích mẫu thí nghiệm. (μl)

- **Hoạt độ riêng (HĐR)**: là giá trị hoạt độ của lectin trong 1 mg protein.

$$\text{HĐR (Đv/mgpr)} = \frac{\text{HĐC}}{\text{mgpr}}$$

2.2.5. Phương pháp chiết tách và tinh sạch lectin

2.2.6. Phương pháp điện di trên gel polyacrylamide [27]

2.3. PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH SỰ TƯƠNG TÁC CỦA ION KIM LOẠI - LECTIN VÀ CÁC LOẠI ĐƯỜNG - LECTIN

2.3.1. Tương tác của ion kim loại - lectin

2.3.2. Tương tác các loại đường - lectin

Chương 3

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ KHẢO SÁT NGUỒN NGUYÊN LIỆU

Tiến hành xác định một số chỉ tiêu như độ ẩm, hàm lượng protein thô, hàm lượng glucit được thực hiện theo qui trình của TCVN (phụ lục 2) và quá trình xác định được thực hiện tại Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường chất lượng 2. Kết quả thu nhận được trình bày tại bảng 3.1.

Bảng 3.1: Một số thành phần hoá học của hạt đậu đỏ tây.

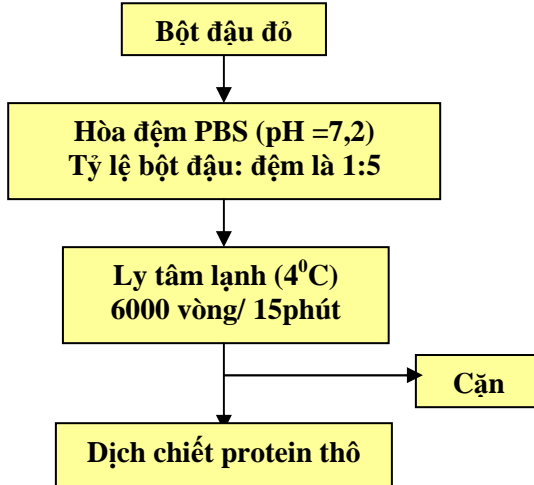
STT	Chỉ tiêu	ĐVT	Phương pháp thử	Kết quả
1	Độ ẩm	%	TCVN 4295:2009	12,42
2	Hàm lượng protein thô	%	TCVN 4295:2009 PK2-F49	18,20
3	Hàm lượng glucit	%	TCVN 4594-88	54,40

Kết quả khảo sát các thành phần của hạt đậu đỏ tây cho thấy độ ẩm của hạt là 12,42% thấp hơn so với độ ẩm của hạt đậu trắng tây (14%). Hàm lượng glucit tổng số được xác định là 54,4 cao hơn so với hàm lượng glucit hạt đậu trắng tây (47,7%) và đậu Hà lan (48,0%). Hàm lượng protein thô của hạt đậu đỏ tây là 18,2% thì lại tương đối thấp hơn của hạt đậu trắng tây (20,6%) và đậu Hà lan (19,7%).

3.2. NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH LECTIN

3.2.1. Nghiên cứu phương pháp chiết tách

Quá trình chiết tách được thực hiện theo sơ đồ sau:



Với mục tiêu là khảo sát điều kiện chiết dịch lectin thô đạt hiệu quả cao, chúng tôi tiến hành theo 3 phương pháp khác nhau:

Lấy một lượng bột đậu đỏ như nhau (50g) hòa tan vào một lượng đệm như nhau (250ml) và tiến hành chiết theo 3 phương pháp khác nhau:

- Phương pháp 1: Bột đậu sau khi hòa đệm tiến hành khuấy (30 phút).

- Phương pháp 2: Bột đậu sau khi hòa đệm tiến hành siêu âm bằng máy siêu âm (30 phút).

- Phương pháp 3: Bột đậu sau khi hòa đệm tiến hành làm lạnh đông - tan giá - lạnh đông - tan giá.

Sau khi chiết tách dịch protein thô bằng 3 phương pháp như trên, tiến hành xác định hàm lượng protein thô theo phương pháp đo quang ở mục (2.2.2.2). Kết quả thu được ở bảng 3.2.

Bảng 3.2: Hàm lượng protein của dịch chiết thô

Phương pháp	1	2	3
Hàm lượng protein (mg/ml)	49,19	51,83	49,90

Hàm lượng protein thô thu nhận theo phương pháp 2 là cao nhất do sử dụng tác nhân vật lý là sóng siêu âm có tác dụng phá vỡ tế bào nên protein được giải phóng ra nhiều hơn.

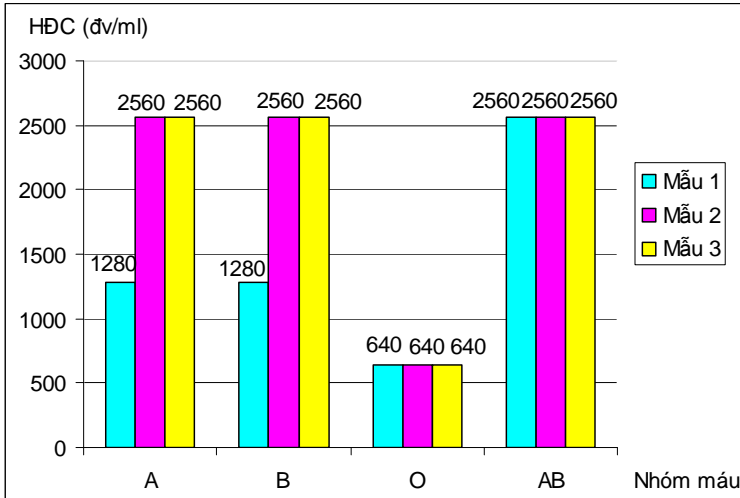
Nhằm xác định hoạt độ của lectin thu được theo 3 phương pháp trên tôi tiến hành thử khả năng ngưng kết với hồng cầu theo phương pháp được trình bày ở mục 2.2.4. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.3.

Bảng 3.3: Hoạt độ lectin của mẫu thu nhận theo 3 phương pháp

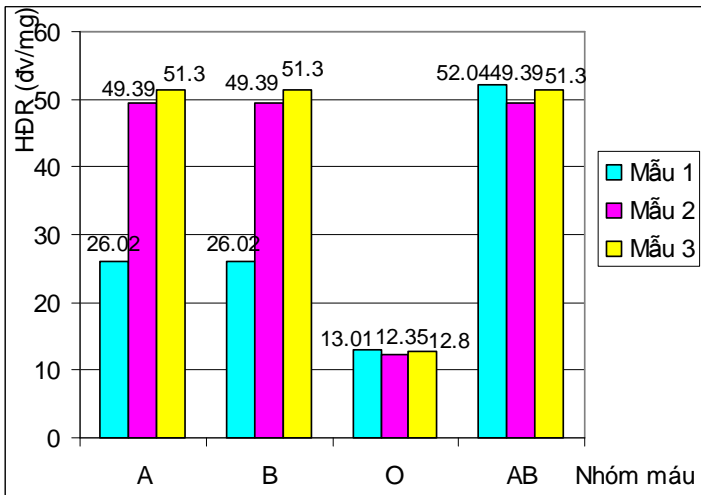
Nhóm máu	HĐC (đv/ml)			HĐR (đv/mgpr)		
	1	2	3	1	2	3
A	1280	2560	2560	26,02	49,39	51,3
B	1280	2560	2560	26,02	49,39	51,3
O	640	640	640	13,01	12,35	12,8
AB	2560	2560	2560	52,04	49,39	51,3

- 1- Mẫu thu được theo phương pháp 1
- 2- Mẫu thu được theo phương pháp 2
- 3- Mẫu thu được theo phương pháp 3

Để so sánh hoạt độ chung của lectin thu được ở 3 mẫu trên tôi xây dựng đồ thị như hình 3.2 và 3.3.



Hình 3.2: Đồ thị biểu diễn hoạt độ chung của 3 mẫu dịch lectin thô



Hình 3.3: Đồ thị biểu diễn hoạt độ riêng của 3 mẫu dịch lectin thô

Kết quả cho thấy hoạt độ chung của lectin mẫu 1 là thấp hơn so với 2 mẫu còn lại. Trong đó mẫu 2 và mẫu 3 có hoạt độ chung là như nhau đối với ngưng kết các nhóm máu.

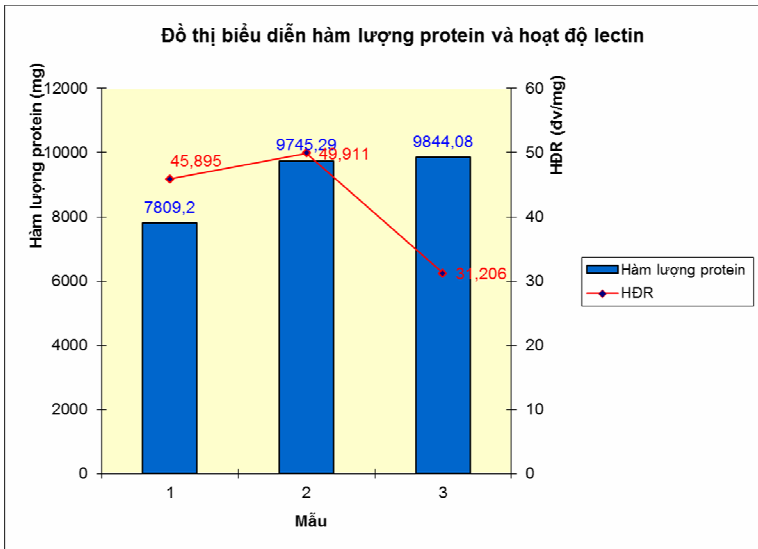
Mẫu 1 có HDR thấp nhất so với mẫu 2 và 3. Mẫu 3 có HDR cao hơn so với 2 mẫu còn lại. Qua chiết tách dịch lectin theo 3 phương pháp trên cho thấy rằng phương pháp 3 đạt hiệu suất chiết tách cao, tuy nhiên phương pháp này lại tiêu tốn nhiều thời gian và nhiên liệu hơn so với phương pháp 2.

Dựa vào kết quả thu được trên, chúng tôi chọn mẫu chiết tách theo phương pháp 2 để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2. Khảo sát tỷ lệ đệm dùng để chiết

Nhằm khảo sát tỷ lệ đệm PBS dùng để chiết tách lectin đạt hiệu quả cao chúng tôi tiến hành chiết tách lectin theo phương pháp đã chọn ở phần trên và sử dụng đệm PBS (pH = 7,2) với các mẫu 1,2,3 tương ứng theo tỷ lệ nguyên liệu và đệm khác nhau là 1:4; 1:5; 1:6 được chiết trên cùng 1 lượng bột đậu là 50g.

Sau khi chiết tách chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng protein tổng và hoạt độ lectin. Kết quả thu được được biểu diễn trên đồ thị hình 3.4.



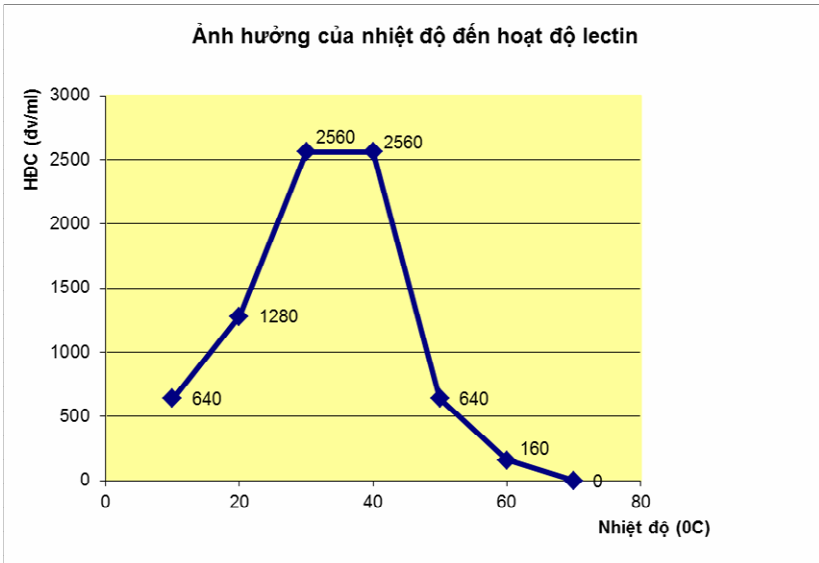
Hình 3.4: Đồ thị biểu diễn hàm lượng protein và hoạt độ lectin của 3 mẫu với tỷ lệ đậm chiết khác nhau.

Kết quả trên hình 3.4 có thể thấy rằng lượng đậm tăng thì lượng protein thu nhận được cũng tăng theo. Hàm lượng protein thu nhận được nhiều nhất ở mẫu 3 nhưng không lớn hơn nhiều so với mẫu 2. Đồ thị cũng cho thấy rằng hoạt độ riêng của lectin ở mẫu 2 là lớn nhất (49,911đv/mgpr) so với 2 mẫu còn lại.

Trên cơ sở so sánh hàm lượng protein tổng số và hoạt độ của lectin thu được theo 3 tỷ lệ đậm khảo sát khác nhau có thể nhận thấy rằng sử dụng tỷ lệ bột đậu đỏ: đậm PBS là 1:5 cho hiệu quả chiết tách cao nhất. Vì vậy tôi chọn tỷ lệ đậm dùng để chiết tách dịch protein lectin là 1:5 để chiết tách.

3.3. NGHIÊN CỨU KHẢO SÁT MỘT SỐ TÍNH CHẤT LÝ HÓA CỦA LECTIN

3.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ của lectin

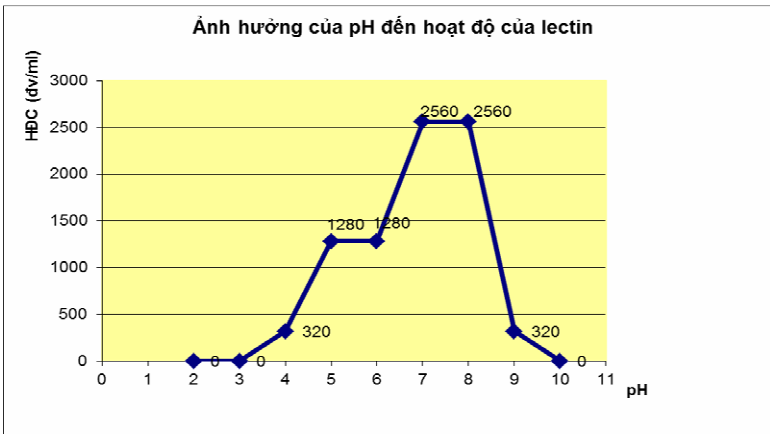


Hình 3.5: Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ của lectin.

Nhiệt độ tối thích cho lectin hoạt động là trong khoảng $30^{\circ}\text{C} \div 40^{\circ}\text{C}$. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả công bố của một số tác giả nghiên cứu về lectin của họ đậu [1].

3.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của pH đến hoạt độ của lectin

Kết quả trên hình 3.6 cho thấy lectin đậu đỏ tây biểu hiện hoạt độ cao ở trong vùng pH trung tính và hơi kiềm, $\text{pH} = 7 \div 8$. Trong khoảng pH này hoạt độ cao nhất là 2560 đv/ml. Theo kết quả nghiên cứu của tác giả Trương Văn Châu thì lectin chiết tách từ hạt đậu cove cũng có khoảng pH tối thích là $6 \div 8$, tương tự với kết quả thu nhận trong nghiên cứu này.



Hình 3.6: Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của pH đến hoạt độ lectin.

3.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt độ lectin

Bảng 3.4: Ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt độ của lectin

Muối	Nồng độ kìm hãm	Nồng độ kích thích
BaCl_2	-	0,25M
CuSO_4	-	0,0625M
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	-	0,25M
CaCO_3	-	0,25M
KCl	-	-

Ghi chú: dấu “-” trong bảng biểu thị phản ứng không bị kìm hãm

Từ kết quả thực nghiệm cho thấy muối KCl không ảnh hưởng đến hoạt độ của lectin. Các loại muối còn lại, trong thành phần của chúng có các cation Ba^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} đều có ảnh hưởng đến hoạt độ của lectin. Sự có mặt của các ion này làm tăng hoạt độ của lectin. Tuy nhiên khả năng kích thích của cation Cu^{2+} là mạnh nhất vì ở nồng độ thấp nhất là 0,0625M nó đã có tác dụng làm tăng hoạt độ của lectin.

3.3.4. Khảo sát sự tương tác đặc hiệu với các loại đường

Kết quả thu được trong bảng 3.5

Bảng 3.5: Tương tác đặc hiệu giữa đường với các loại lectin

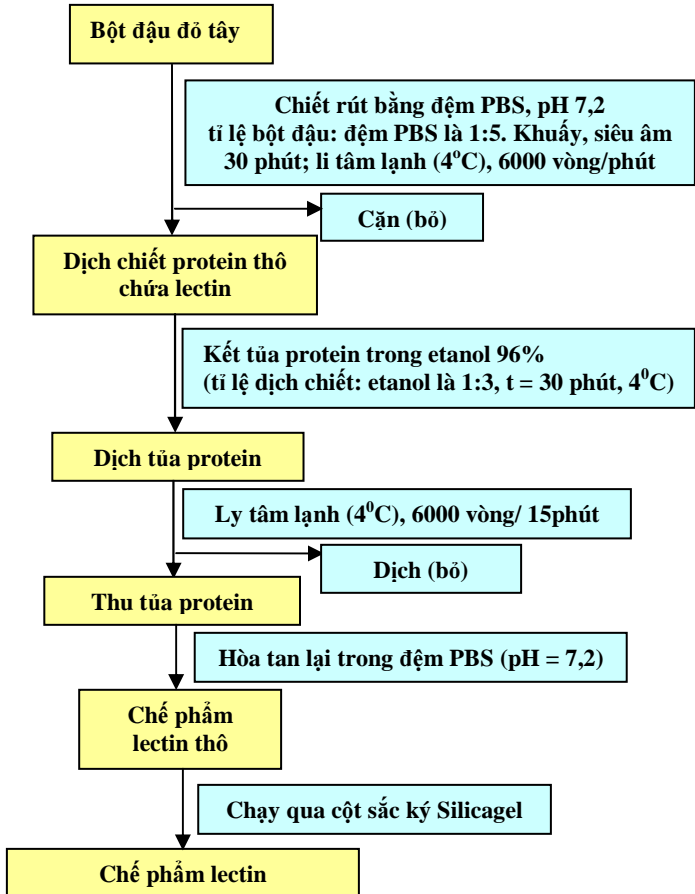
Tên các loại đường	Nồng độ kìm hãm
D - Glucose	-
D - Manose	-
D - Arabinose	-
Lactose	-
Saccharose	-

Ghi chú: - không kìm hãm

Qua kết quả thu được có thể thấy rằng trong 5 loại đường sử dụng là D-glucose, D-manose, D-arabinose, lactose, saccharose thì không có loại đường nào có khả năng ức chế rõ rệt đến hoạt độ của lectin đậu đỏ tây. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đó về lectin của đậu đỏ tây là không tương tác với các loại đường đơn mà chỉ tương tác với oligosaccharide và polysaccharide [20].

3.4. TINH SẠCH LECTIN ĐẬU ĐỎ TÂY

Tiến hành tinh sạch lectin thông qua sơ đồ tinh sạch lectin như sau



3.4.1. Xử lý sơ bộ mẫu thô

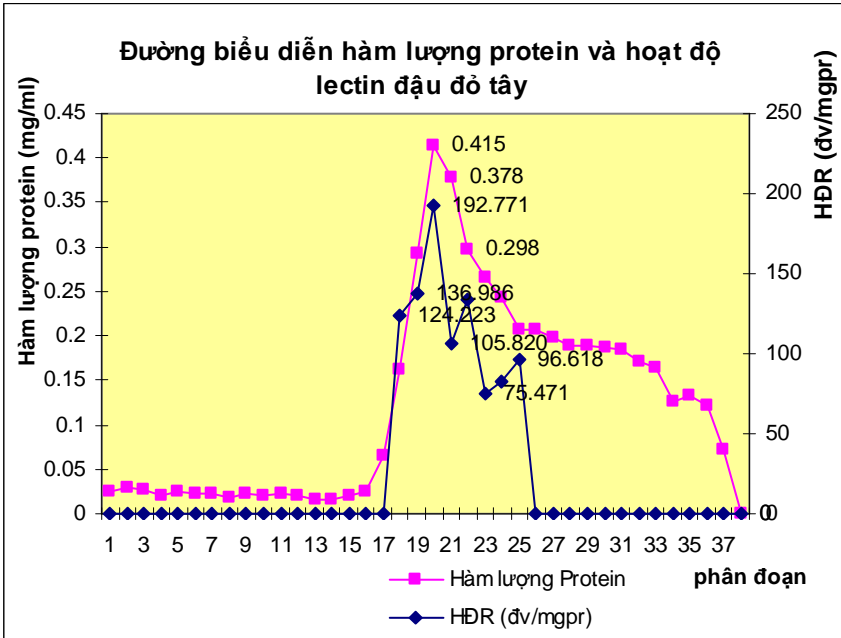
Mẫu dịch lectin sau khi tiến hành sơ bộ các bước như trên thì kết quả thu được có hàm lượng protein thô bằng 22,03mg/ml và hoạt độ lectin là 2560đv/ml.

3.4.2. Tinh sạch qua sắc ký qua cột Silicagel

Dịch lectin thu được ở trên tiến hành tinh sạch bằng phương pháp sắc ký qua cột sắc ký có chứa hạt Silicagel. Kích thước cột 1,7 x 20cm. Pha động được sử dụng là đệm PBS (pH =7,2). Trước khi cho mẫu vào chạy sắc ký cột này đã được cân bằng với đệm PBS (pH = 7,2) trong thời gian là 8 giờ.

Quá trình sắc ký được tiến hành như sau:

- Lượng dịch lectin cho vào cột sắc ký là 2ml. Tốc độ dòng chảy là 14ml/h. Thể tích thu được của mỗi phân đoạn là 1,4ml tương ứng với 30 giọt. Sử dụng bộ thu hồi tự động (biofrac fraction collector) để tách các phân đoạn sau sắc ký. Sau khi thu nhận, chúng tôi tiến hành đánh giá hàm lượng protein tổng số của từng phân đoạn bằng phương pháp đo quang như đã được trình bày ở mục 2.2.2.2. và đánh giá hoạt độ của lectin cho từng phân đoạn được tiến hành theo phương pháp được trình bày ở mục 2.2.4. Kết quả đánh giá được biểu diễn theo đồ thị ở hình 3.8.



Hình 3.8: Đồ thị biểu diễn hàm lượng protein và hoạt độ lectin của đậu đỏ tây

Hàm lượng protein bắt đầu xuất hiện ở phân đoạn thứ 18 là 0,16mg/ml đến phân đoạn 37; xuất hiện 1 pic lớn duy nhất đạt đỉnh ở phân đoạn 20 với hàm lượng protein 0,415mg/ml.

Dựa vào kết quả phân tích hoạt độ lectin của các phân đoạn cho thấy rằng từ phân đoạn 17 đến phân đoạn 20 hoạt độ của lectin tăng lên theo chiều tăng của protein và đạt đến giá trị lớn nhất tại phân đoạn 20 với hoạt độ riêng là 192,771đv/mgpr. Toàn bộ kết quả thu được trong quá trình tinh chế protein được thể hiện ở bảng 3.6.

Bảng 3.6: Tóm tắt kết quả chiết tách và tinh chế lectin đậu đỏ tây

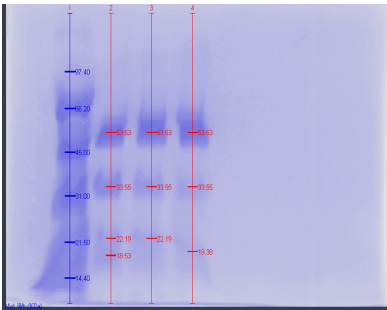
Các giai đoạn tinh chế	Protein tổng số (mg/ml)	HĐC (Đv/ml)	HĐR (đv/mgpr)	Độ sạch (lần)
Dịch chiết thô	51,291	2560	49,911	1,00
Dịch protein hòa tan sau rửa	22,030	2560	116,205	2,32
Dịch lectin sau sắc ký	0,415	80	192,770	3,86

Dựa vào kết quả thu được có thể thấy rằng lectin thu được sau khi sắc ký qua cột Silicagel thì có độ sạch cao gấp 3,86 lần so với dịch chiết thô ban đầu.

3.4.3. Điện di trên gel polyacrylamide

Với mục đích xác định khối lượng phân tử của lectin thu được sau sắc ký tôi tiến hành điện di mẫu lectin thu được của các phân đoạn 20, 22, 24 trên gel polyacrylamide có SDS.

Kết quả điện di thể hiện trên hình 3.9



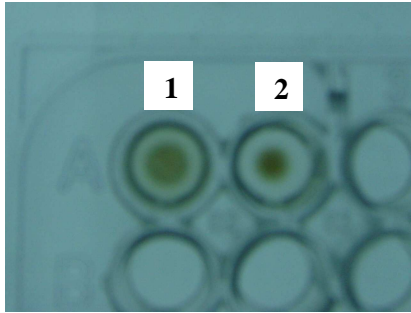
Ghi chú: Dãy 1: các protein tiêu chuẩn (markers). Dãy 2: dịch sau sắc ký phân đoạn 20. Dãy 3: dịch sau sắc ký phân đoạn 22. Dãy 4: dịch sau sắc ký phân đoạn 24.

Hình 3.9 : Ảnh kết quả điện di các chế phẩm lectin trên gel polyacrylamide

Theo tài liệu đã được công bố [20] thì lectin đậu đỏ tây có khối lượng phân tử trong khoảng 25 đến 30 kDa. Kết quả phân tích điện di sản phẩm lectin thu nhận của chúng tôi có 2 băng protein 33,5kDa và 22,19 kDa phù hợp với kết quả đã được công bố. Trong ba phân đoạn điện di đều có băng protein rất rõ nét với khối lượng 53,61kDa, lớn hơn so với khối lượng phân tử của lectin chiết tách từ đậu đỏ đã được công bố, do vậy cần có những nghiên cứu tiếp theo để làm rõ vai trò của protein này.

3.5. ĐỀ XUẤT HƯỚNG ỨNG DỤNG

Lectin được chiết tách từ đậu tây theo như nghiên cứu của các tác giả trước đây, thì nó không có khả năng tương tác với các monosaccharide mà nó chỉ có thể tương tác với oligosaccharide và polysaccharide [20]. Do cấu tạo của bề mặt màng tế bào như vi khuẩn, nấm men đều có chứa thành phần polysaccharide, đây có thể là vị trí phản ứng tiềm năng của lectin. Kết quả nghiên cứu của Bùi Phương Thuận về khả năng tương tác giữa lectin với tế bào các loại vi khuẩn như *Salmonella*, *E.coli* [13]. Dựa trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành thử khả năng ngưng kết của lectin chiết tách được từ đậu đỏ tây với tế bào nấm men. Kết quả thu được khi tiến hành thử ngưng kết như hình 3.10.



Hình 3.10: Tương tác giữa lectin với tế bào nấm men

Chú thích: Giếng thứ 1: có chứa dịch lectin thô - tế bào nấm men.

Giếng thứ 2: mẫu đối chứng.

Giếng thứ 1 đã xuất hiện sự kết tụ thành mảng lớn của tế bào nấm men, điều đó cho thấy là lectin có khả năng ngưng kết mạnh với tế bào nấm men. Giếng thứ 2 không có hiện tượng ngưng kết. Kết quả thử nghiệm ở trên đã cho thấy lectin có khả năng ngưng kết tế bào nấm men.

Vì vậy dựa vào kết quả nghiên cứu trên, có thể định hướng nghiên cứu ứng dụng lectin vào dịch lên men bia sau khi lên men nhằm mục đích tạo kết tụ các tế bào nấm men sau quá trình lên men để tăng hiệu suất của quá trình lọc.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

A. KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu chúng tôi rút ra một số kết luận

- Đã xác định được một số thành phần hóa học hạt đậu đỏ tây
- Qua nghiên cứu chiết tách lectin từ hạt đậu đỏ tây đã xác định chiết tách lectin bằng phương pháp siêu âm với tỷ lệ bột đậu đỏ tây: đệm PBS (pH = 7,2) là 1:5 đạt hiệu quả chiết cao nhất.

- Lectin đậu đỏ tây hoạt động tốt nhất trong khoảng nhiệt độ tối thích là $30 \div 40^{\circ}\text{C}$, pH tối thích là $7 \div 8$. Lectin hoạt động tốt nhất khi có mặt của các ion kim loại Ba^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} trong đó Cu^{2+} làm tăng hoạt độ của lectin mạnh nhất.

- Lectin đậu đỏ tây không tương tác với các loại đường đơn mà chỉ tương tác với các oligosaccharide và polysaccharide.

- Đã tinh sạch được lectin chiết tách được bằng phương pháp sắc ký trên cột Silicagel và xác định được khối lượng phân tử của lectin bằng phương pháp điện di là 33,5kDa và 22,19kDa.

- Đề xuất được hướng ứng dụng lectin trong quá trình sản xuất có giai đoạn lên men bởi nấm men, dựa trên nghiên cứu lectin có khả năng ngưng kết với tế bào nấm men.

B. KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu thử nghiệm ứng dụng lectin vào quá trình sản xuất bia nhằm tăng hiệu suất của quá trình lọc. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng khi tiến hành thử nghiệm lectin đến chất lượng sản phẩm bia.

- Nghiên cứu ứng dụng lectin đậu đỏ tây trong việc nhận dạng các chủng vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm như Salmonela, Escherichia coli dựa trên cơ sở lectin có khả năng ngưng kết tế bào vi khuẩn