

NGHIÊN CỨU TÁCH FIBROIN TUYẾN TƠ CHẾ TẠO MÀNG POLYMER SINH HỌC

Trần Bích Lam, Vương Bảo Thy

Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Đại học Bách Khoa, Tp Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Đề tài này đã nghiên cứu phương pháp tách fibroin khỏi màng bao tuyến tơ bằng enzym papain và axit citric, hòa tan fibroin theo phương pháp kết hợp enzym-kiềm; tạo màng theo phương pháp đổ khuôn và nghiên cứu tính chất của màng Fibroin.

Kết quả đã chọn phương pháp xử lý màng bao tuyến tơ bằng dung dịch citric 5%, hòa tan fibroin bằng enzym trypsin trong dung dịch NH_4OH . Màng fibroin tạo thành đạt các tính chất về độ bền cơ lý cao (ứng suất: 71.435 N/mm^2), độ truyền suôt (87.56 đến 93.54 %), khả năng thấm thấu tốt, giữ được các tính chất khi vô khuẩn nên có khả năng ứng dụng cao.

ABSTRACT

The paper reports on methods of fibroin separation from the coating of silk-worm gland by papain enzyme and citric acid; dissolving fibroin in enzyme-alkali solution; make membrane by casting methods; and defining specifications of membrane.

In results to choose treatment of silk-worm gland by citric acid 5%, dissolving fibroin by trypsin enzyme in NH_4OH solution. Fibroin membrane made have high tensile strength (71.435 N/mm^2), high light transmission (87.56 to 93.54 %), good water transmission. These properties keep unchanged after sterilization. Therefore, this biopolymer membrane has high potential uses.

1. MỞ ĐẦU

Màng polymer sinh học tự phân hủy trong môi trường, được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như: màng che trong sản xuất nông nghiệp, màng bao gói trong công nghiệp thực phẩm; trong y tế màng polymer sinh học được sử dụng làm da nhân tạo để điều trị vết thương do khả năng hoà hợp sinh học cao; trong xử lý nước các màng này có khả năng ngăn cản sự tích tụ khoáng và chống ăn mòn. [1,2]

Tiếp theo các nghiên cứu chế tạo màng polyme sinh học từ collagen và fibroin tơ tằm[5], để khắc phục các nhược điểm do phải sử dụng các phụ gia, chúng tôi chọn nguyên liệu chế tạo màng là fibroin có trong tuyến tơ và nghiên cứu một số tính chất của màng để trên cơ sở đó đề xuất các phương hướng ứng dụng.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

- Tằm: được cung cấp từ Bảo Lộc Lâm Đồng.
- Trypsin (EC No. 232-650-8), SIGMA CHEMICA CO.
Hoạt tính Trypsin: 1,466 BAEE units/mg
Hoạt tính Chymotrypsin: 3 BTEE units/mg
- Papain: chế phẩm của Phòng thí nghiệm Hóa sinh Đại học Bách khoa

2.2 Phương pháp

- Độ hoà tan của fibroin được tính bằng Bx của dung dịch sau khi xử lý với tác nhân hòa tan là dung dịch papain hay axit citric

- Phương pháp tạo màng: chuẩn bị dung dịch tạo màng có nồng độ và độ nhớt thích hợp, tạo màng bằng phương pháp đổ khuôn.
- Xác định độ nhớt dung dịch tạo màng bằng nhớt kế Osvanda, cp
- Xác định bề dày màng bằng dụng cụ đo chiều dày, đơn vị µm
- Xác định tính chất cơ lý của màng bằng máy đo độ bền cơ học (TENSILON)
- Xác định độ truyền suốt của màng bằng máy quang phổ SPECTRONIC UV_VIS

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nghiên cứu tách fibroin từ tuyến tơ

Tuyến tơ được bao bọc bởi một lớp màng mỏng. Lớp màng này sẽ cản trở quá trình hoà tan fibroin và có ảnh hưởng đến màu sắc, độ trong và tính chất cơ lý của màng. Vì vậy cần phải tách fibroin khỏi màng bao. Công việc này có thể thực hiện thủ công nhưng chỉ có thể làm với một lượng rất nhỏ. Để tách lớp màng bao tuyến tơ, giải phóng fibroin, ta có thể dùng phương pháp thuỷ phân bằng acid, kiềm hoặc enzym. Tuy nhiên, do fibroin cũng có khả năng hòa tan trong các acid như H₂SO₄, HCl, HNO₃, HCOOH; và trong dung dịch kiềm như NaOH, KOH, NH₄OH [3,4] nên cần tránh sử dụng các tác nhân này vì chúng sẽ hoà tan một phần Fibroin. Trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát khả năng tách màng bao tuyến tơ bằng papain và acid citric.

3.2. Nghiên cứu hòa tan fibroin

Để thuỷ phân fibroin có thể chọn trypsin và chymotrypsin hoạt động trong môi trường kiềm.

Dung dịch NH₄OH ở nồng độ thấp được chọn có ba tác dụng:

- Tạo môi trường kiềm, khoảng pH thích hợp cho hoạt động của enzym trypsin.
- Kết hợp khả năng thuỷ phân fibroin của NH₄OH.
- Đặc tính dễ bay hơi sẽ giúp cho quá trình hình thành màng nhanh hơn.

Bảng 1: So sánh hiệu quả tách màng bao tuyến tơ

Phương pháp xử lý	Thời gian (phút)	Khối lượng tuyến tơ ban đầu (g)	Khối lượng Fibroin thu được (g)	Tỉ lệ thu hồi Fibroin (%)
Acid citric (5%)	5	6	5,42	90,3
Enzym papain (0.15%)	15	6	5,25	87,5
Thủ công	30	6	4,53	75,5

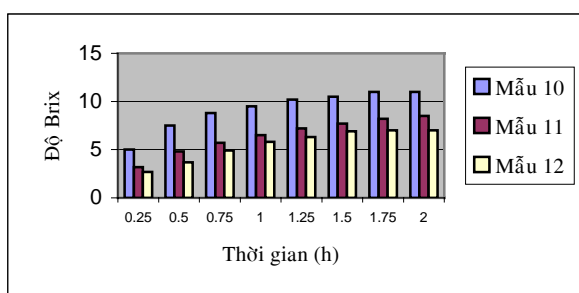


Hình 1: Tuyến tơ trước và sau khi tách màng bao

3.2.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung dịch xử lý

Bảng 2: Thay đổi tỉ lệ dung dịch xử lý Fibroin

Mẫu	Khối lượng fibroin (g)	nồng độ NH ₄ OH (%)	Nồng độ trypsin (%)	Tỉ lệ xử lý Fibroin: dung dịch
10	6	0,6	0,05	1:1
11	6	0,6	0,05	1:2
12	6	0,6	0,05	1:3



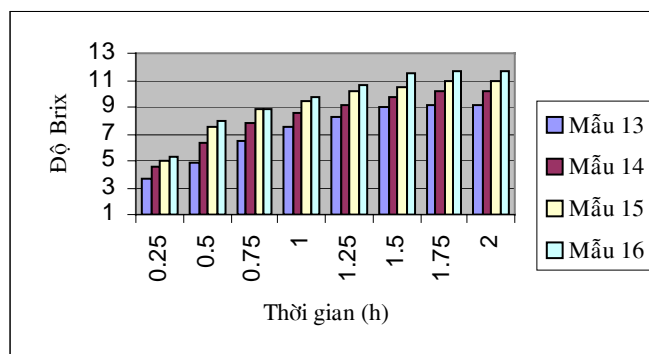
Hình 2: Sự biến thiên Bx theo thời gian ở các tỉ lệ dung dịch xử lý

Từ kết quả trên, đã chọn sử dụng tỉ lệ 1:1 để dung dịch fibroin có Bx lớn, để điều chỉnh nồng độ.

3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ NH₄ OH đến độ tan của fibroin

Bảng 3: Thí nghiệm thay đổi nồng độ NH₄OH hòa tan fibroin

Mẫu	Khối lượng fibroin (g)	Nồng độ Trypsin (%)	Nồng độ NH ₄ OH (%)	Tỉ lệ Fibroin: dung dịch	pH đầu
13	12	0,05	0,2	1:1	8,69
14	12	0,05	0,4	1:1	8,81
15	12	0,05	0,6	1:1	8,95
16	12	0,05	0,8	1:1	8,98



Hình 3: Diễn biến độ tan của fibroin theo thời gian xử lý của các mẫu có nồng độ NH₄OH khác nhau

Ngoài nồng độ của dung dịch thì tính chất tạo màng chịu ảnh hưởng rất lớn bởi độ nhớt của dung dịch. Độ nhớt thấp khi protein đã bị thủy phân sâu sắc và vì vậy rất khó tạo màng hoặc chất lượng của màng kém.

Bảng 4: Ảnh hưởng của nồng độ NH₄OH đến độ nhớt của dung dịch fibroin, độ Brix =9,0

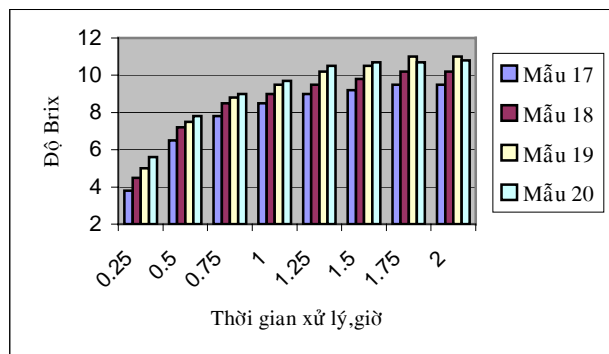
Mẫu	Độ nhớt (cp)
13	153,25
14	187,92
15	265,27
16	204,18

Với cùng độ Bx thì dung dịch có độ nhớt cao nhất là ở mẫu 15, có nồng độ NH₄OH là 0,6%

3.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến tính tan của fibroin

Bảng 5: Thí nghiệm thay đổi nồng độ enzyme xử lý

Mẫu	Khối lượng fibroin (g)	Nồng độ NH ₄ OH (%)	Nồng độ trypsin (%)	Tỉ lệ Fibroin: dung dịch
17	12	0,6	0,01	1:1
18	12	0,6	0,03	1:1
19	12	0,6	0,05	1:1
20	12	0,6	0,07	1:1



Hình 4: Sự biến đổi độ tan của fibroin theo thời gian của các mẫu có xử lý nồng độ enzym khác nhau

Bảng 6: So sánh độ nhớt của các dung dịch mẫu xử lý nồng độ enzym khác nhau có Brix =9,0

Mẫu	Độ nhớt (cp)
17	221,42
18	306,51
19	272,16
20	170,87

Vậy để hòa tan fibroin chọn dung dịch enzym trypsin 0,03% trong NH₄OH 0,6% tỷ lệ 1:1. Trong điều kiện này sau 1 giờ, nồng độ chất tan của dung dịch đạt 9Bx và độ nhớt của dung dịch là cực đại 306,5cp.

3.2. Nghiên cứu các tính chất của màng fibroin

Dung dịch Fibroin được đổ khuôn nhựa plastic để tạo màng. Diện tích khuôn 10x18 cm².

3.3.1. Độ bền cơ lý

Từ kết quả được trình bày trong bảng 7, chúng tôi chọn Mẫu 23C với nồng độ dung dịch tạo màng 9⁰Brix, thể tích dung dịch tạo màng: 10.5 ml là tối ưu.

Bảng 7: Tính chất cơ lý của màng

Các thông số		Nồng độ			
		7 ⁰ Brix (21)	8 ⁰ Brix (22)	9 ⁰ Brix (23)	10 ⁰ Brix (24)
7,5 (ml) (A)	Bề dày (µm)	18,325	19,258	21,561	24.376
	Lực kéo (N)	4,025	4,382	5,138	5.483
	Ứng suất (N/mm ²)	54,91	57,054	59,575	56.234
	Độ giãn dài (%)	4,127	5,325	5,612	5.516
9,0 (ml) (B)	Bề dày (µm)	22,530	23,725	26,510	28.193
	Lực kéo (N)	5,256	6,363	7,572	7.343
	Ứng suất (N/mm ²)	58,322	67,050	71,435	65.114
	Độ giãn dài (%)	4,812	5,616	6,875	6.185
10,5 (ml) (C)	Bề dày (µm)	25,861	27,036	30,815	32.524
	Lực kéo (N)	6,695	7,535	9,018	8.913
	Ứng suất (N/mm ²)	64,721	69,676	73,162	68.511
	Độ giãn dài (%)	4,031	5,013	5,156	5.327

Bảng 8: Độ truyền suốt của màng

Bước sóng λ (nm)	400	450	500	550	600	650	700
Độ truyền suốt (%)	87,56	89,23	90,72	91,85	92,59	93,14	93,54

3.3.2 Độ truyền suốt

Các màng fibroin tạo thành hầu như trong suốt. Trong vùng thấy được, độ truyền suốt của màng tới trên 90%. Tính chất này làm tăng giá trị ứng dụng của màng: trong điều trị vết thương giúp dễ dàng quan sát quá trình lành vết thương, khi ứng dụng làm màng bao thực phẩm giúp quan sát được hiện trạng sản phẩm bên trong.

Khi thực hiện vô khuẩn màng bằng tia tử ngoại trong thời gian 20 phút, các tính chất trên của màng không đổi.

4. KẾT LUẬN

4.1. Từ các kết quả nghiên cứu đã chọn được các thông số như sau:

- Sử dụng dung dịch acid citric 5% để tách màng bao tuyến tơ.
- Dung môi hoà tan fibroin là trypsin 0,03% trong dung dịch NH_4OH 0.6%.
- Tỷ lệ Fibroin : dung môi hoà tan là 1:1.

4.2. Với nồng độ chất khô ban đầu của dung dịch tạo màng : 9 độ Brix, thể tích dung dịch tạo màng trên diện tích khuôn 18 x10 cm^2 là 9 ml, các tính chất của màng fibroin thu được là:

- Độ bền cơ lý: ứng suất: 71,435 N/mm^2 ; độ giãn dài: 6,875 %.
- Độ truyền suốt: từ 87,56 đến 93,54 % (bước sóng từ 400 đến 700 nm)

4.3. Kiến nghị ứng dụng màng:

Có thể nghiên cứu khả năng ứng dụng màng vô khuẩn thay thế da nhân tạo trong điều trị bỏng, vết thương do mất da. Tuy nhiên, để màng có thể ứng dụng được trong y tế, cần có sự cộng tác nghiên cứu thực nghiệm lâm sàng với các đơn vị ngành y .

Biological Sources (New York, NY: Stockton Press, 1991), pp. 1-53.

4. David L. Kaplan et al., Biosynthesis and Processing of Silk Proteins, Materials Research Bulletin, October (1992), pp. 41-47
5. Trần Bích Lam, Trần Hoàng Thảo, Phạm Quang Hiền, Nguyễn Ngọc Sơn “Nghiên cứu chế tạo màng polyme sinh học” Báo cáo Khoa học - Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, NXB KHKT, Hà Nội 12/2003, 459-462
6. D. McPherson, C. Morrow, D.S. Minehan, J.Wu, E. Hunter, and D.W. Urry, Production and Purification of a Recombinant Elastomeric Polypeptide, Biotechnology Progress, vol. 8 (1992), pp. 347-352.
7. Joseph Cappello, Genetic Production of Synthetic Protein Polymers, Materials Research Bulletin, October (1992), pp. 48-53

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Lê Dũng và cộng sự, Màng sinh học Vinachitin, Tạp chí Hóa Học, 2, (2001), trang 21_27.
2. Roger C. Herdman, Biopolymer: Marking Materials Nature's Way, September (1993).
3. D.L. Kaplan, S.J. Lombardi, W.S. Muller, and S.A. Fossey, *Silks*, D. Byrom (cd.), Biomaterials: Novel Materials from