

CÁCH XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ PROTEASE

TS. Phạm Quang Chính, PGS.TS. Biền Văn Minh

Protease là enzyme được sử dụng nhiều nhất hiện nay trong một số ngành sản xuất như: chế biến thực phẩm, sản xuất chất tẩy rửa, thuốc da, y tế, nông nghiệp...

Nguồn protease có nhiều ở một số loại quả như dứa (*Ananas cocosus* L.), đu đủ (*Carica papaya* L.), vả (*Ficus auriculata* Lour.)... và nhiều vi sinh vật như vi khuẩn, nấm mốc và xạ khuẩn... Trong bài viết này, chúng tôi xin trao đổi về cách xác định hoạt độ protease từ quả đu đủ và nấm mốc *Aspergillus oryzae*.

1. Hóa chất và dụng cụ

- Quả đu đủ, nấm mốc *Aspergillus oryzae*.

- Dung dịch tartaric acid 1%; dung dịch trichloacetic acid 0,3M; dung dịch casein 2%; dung dịch đệm Britton và Robinson (acetic acid, phosphoric acid, boric acid); dung dịch HCl 0,2N; dung dịch tyrosine 1 mM; dung dịch Folin.

- Dụng cụ thủy tinh (bình tam giác, ống nghiệm, pipete...)

- Tủ ấm, bếp đun cách thủy

- Máy so màu.

2. Nguyên tắc

Dùng dịch chiết quả có enzyme thủy phân protein. Sau đó diệt enzyme và kết tủa protein chưa bị thủy phân bằng trichloacetic acid. Định lượng sản phẩm được tạo thành trong phản ứng bằng phản ứng màu với thuốc thử Folin, kết quả phân tích dựa vào đồ thị chuẩn tyrosine.

Đơn vị hoạt độ protease là lượng enzyme phân giải protein tạo thành các sản phẩm hòa tan trong trichloacetic acid tương ứng với một micromol tyrosine (0,181 mg) trong một phút, ở 30⁰C.

Protease của dịch chiết quả được xác định ở pH 7,2 ± 0,2.

3. Các bước tiến hành

a. Chuẩn bị dung dịch đệm Britton và Robinson pH 7,2

- Dung dịch A: Acetic acid 0,04M (2,32 ml pha thành 1000 ml), phosphoric acid 0,04M, boric acid 0,04M.

- Dung dịch B: 8g NaOH hòa tan trong nước cất và dẫn nước đến 1000 ml.

- Dung dịch đệm Britton và Robinson có pH khác nhau phụ thuộc vào tỉ lệ pha thể tích dung dịch A và B. Pha đệm pH 7,2: lấy 100 ml dung dịch A và 55 ml dung dịch B, dẫn nước cất đến 200 ml.

b. Dung dịch casein 2%

Hòa tan 2g casein vào 90 ml đệm Britton và Robinson pH 7,2. Nếu pH của dung dịch thấp hơn 7,2 thì dùng vài giọt NaOH 1N để điều chỉnh, dẫn đệm đến 100 ml.

c. Dung dịch enzyme

- Cân 1g đu đủ, nghiền với đệm Britton và Robinson pH 7,2. Đổ dịch nghiền vào bình định mức loại 100 ml. Dùng đệm rửa cối chày, nước rửa cho vào bình định mức. Bổ sung đệm đến vạch ngắn. Lắc đều, lọc lấy dịch trong.

- Chuẩn bị dịch enzyme từ dịch lên men vi nấm *A. oryzae* : Nuôi cấy *A. oryzae* trong môi trường dịch thể Czapek–Dox vô trùng (saccharose 30g; NaNO₃ 3,5g; K₂HPO₄ 1,5g; MgSO₄ 0,5g; KCl 0,5g; FeSO₄ 0,01g rồi thêm 20 ml sữa đặc hoặc 10g gelatin, hoặc casein, nước cất 1000 ml) trong điều kiện nhiệt độ phòng trên máy lắc 200 vòng/phút sau 72 giờ thu lấy dịch lọc.

d. Tiến hành phản ứng

Cho vào 2 ống nghiệm, mỗi ống 20 ml cơ chất (casein), đặt vào chậu ổn nhiệt ở 30°C. Sau 10 phút cho vào mỗi ống nghiệm 20 ml dung dịch enzyme (cũng ở 30°C), lắc trộn đều và để 10 phút ở 30°C. Sau đó cho vào mỗi ống nghiệm dung dịch trichloacetic acid 0,3M; lắc trộn nhanh để protein dư và các hợp chất cao phân tử khác kết tủa, giữ các ống nghiệm ở 30°C thêm 20 phút nữa rồi lọc lấy dịch. Lấy 1 ml dịch lọc và 5 ml dung dịch Na₂CO₃ 0,5M cho vào ống nghiệm, trộn đều và thêm 1 ml thuốc thử Folin. Sau 20 phút phản ứng, dung dịch có màu xanh da trời, mang đo trên máy so màu.

Thí nghiệm đối chứng thay dung dịch enzyme bằng 20 ml nước cất.

So sánh kết quả của thí nghiệm và đối chứng.

e. Xây dựng đường chuẩn tyrosine

Pha dung dịch gốc tyrosine có nồng độ 10⁻³ (1 mM): cân 181,12 mg tyrosine, hòa tan trong dung dịch HCl 0,2N rồi định mức đến 100 ml bằng HCl 0,2N. Từ dung dịch gốc pha loãng thành dãy nồng độ dung dịch như sau:

Tyrosine (ml)	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,5
HCl 0,2N (ml)	4,9	4,8	4,6	4,4	4,2	4,0	3,5
Nồng độ tyrosine (mM)	0,02	0,44	0,08	0,12	0,16	0,20	0,30

Mỗi dung dịch trên lấy 1 ml cho vào 7 ống nghiệm, cho thêm vào mỗi ống 5 ml Na₂CO₃ 0,5M và 1 ml thuốc thử Folin, lắc đều.

Mẫu đối chứng thay 1 ml dung dịch tyrosine bằng 1 ml nước cất. Giữ hỗn hợp phản ứng trong 20 phút, sau đó đo trên máy so màu ở bước sóng 720 nm. Lấy số liệu trung bình của hai ống nghiệm dựng đường chuẩn tyrosine với trục hoành là nồng độ tyrosine (e) tính theo micromol/ml, trục tung là mật độ quang (OD).

4. Tính kết quả

4.1. Định tính hoạt độ protease

+ Kiểm tra hoạt độ protease ở môi trường chứa casein hoặc gelatin tinh khiết: Dùng môi trường thạch đĩa Czapek–Dox thêm 10g gelatin, dùng khoan đồng khoan bỏ thỏi thạch rồi cho vào đó 1 ml dịch nuôi *A. oryzae* trên, sau 24 giờ dùng thuốc thử HCl 1% hoặc dung dịch (NH₄)₂SO₄ bão hòa đổ lên bề mặt môi trường thạch đĩa, nếu *A. oryzae* sinh ra protease thì sẽ có một vòng trong suốt xung quanh lỗ khoan do các protein đã bị phân giải, vùng không bị phân giải vẫn có màu trắng đục.

Căn cứ vào đường kính vùng phân giải để xác định hoạt độ protease.

4.2. Định lượng hoạt độ protease

Hoạt độ protease (Hdp) tính bằng đơn vị/gam hay đơn vị/ml theo công thức:

$$\text{Hdp} = \frac{\text{OD} \times 4 \times 1000}{a \times 10 \times w}$$

Trong đó: OD - mật độ quang đo được của mẫu

4 - Tỷ lệ thể tích của hỗn hợp phản ứng với dung dịch enzyme. Sau khi thêm trichloacetic acid:

$$\frac{2 \text{ ml cơ chất (tyrosine)} + 2 \text{ ml enzyme} + 4 \text{ ml TCA}}{2 \text{ ml enzyme}} = 4$$

A - Đương lượng tyrosine xác định theo đường chuẩn (mật độ quang mà 1 micromol tyrosine có trong 1 ml dung dịch chuẩn, khi phản ứng cho thuốc thử Folin.)

10 - Thời gian thủy phân cơ chất (phút)

W - Lượng chế phẩm enzyme (lấy để thủy phân cơ chất tyrosine tính bằng mg có trong 1 ml dung dịch enzyme)

1000 - Hệ số chuyển sang gam chế phẩm.

5. Những điểm cần lưu ý

Khi tiến hành thí nghiệm các dụng cụ phải được vệ sinh sạch sẽ.

Cách xác định định tính hoạt độ protease từ *A. oryzae* có thể dùng phương pháp đục lỗ và dùng thuốc thử là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa để phát hiện vùng thủy phân protein.

Chọn quả (đủ đủ còn xanh) mới thu hoạch, không bị dập nát, hư hỏng.

Điều kiện thủy phân: Nồng độ protein là 1% (nồng độ cơ chất trong dung dịch), thủy phân trong vòng 10 phút ở nhiệt độ 30°C . Trước khi tiến hành phản ứng thủy phân, dung dịch cơ chất và dung dịch enzyme đều phải đưa đến 30°C . Làm ngừng phản ứng bằng cách cho một lượng dung dịch trichloacetic acid 0,3M bằng thể tích hỗn hợp phản ứng, trộn đều, giữ ở 30°C trong 20 phút, lọc lấy dịch. Lượng enzyme cần cho phản ứng sao cho mật độ quang của dung dịch khi so màu nằm trong phạm vi 0,2–0,6.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thành Đạt, (2000). *Thực hành vi sinh học*, Nxb GD, Hà Nội.
2. Nguyễn Văn Mùi, (2001). *Thực hành hóa sinh học*. Nxb ĐHQG Hà Nội.
3. John William Henry Eyre, (2009). *A Laboratory Guide for Medical, Dental, and Technical Students*, <http://www.gutenberg.org/>

Thông tin về tác giả

- **PGS.TS. BIÊN VĂN MINH:** Trưởng khoa Sư phạm Kỹ thuật, Trường Đại học Sư phạm - ĐHHuế. ĐT: 0913439685. **Email:** minhs56@gmail.com

- **TS. PHẠM QUANG CHINH:** Phó Trưởng khoa Sư phạm Kỹ thuật, Trường Đại học Sư phạm - ĐHHuế. ĐT: 0983377159. **Email:** phamchinhs@gmail.com