



ẢNH HƯỞNG CỦA DUNG MÔI VÀ THỜI GIAN KẾT TỦA ĐẾN HIỆU QUẢ TINH SẠCH SƠ BỘ ENZYME PROTEASE TRÍCH LY TỪ THỊT ĐẦU TÔM

Hà Thị Thụy Vy, Trần Thanh Trúc và Nguyễn Văn Mươi

Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 24/10/2016

Title:

The influence of solvent and precipitation time on preliminary purification of protease extracted from shrimp head meat

Từ khóa:

Ethanol, hoạt tính riêng, protease, tác nhân kết tủa, thịt đầu tôm

Keywords:

Ethanol, precipitating agents, protease, shrimp head meat; specific activity

ABSTRACT

The study was conducted in order to determine the effect of precipitating agents on the efficient purification of protease extracted from two species shrimp head (black tiger shrimp head (*Penaeus monodon*) and white shrimp head (*Penaeus vannamei*). The ratio of crude enzyme extraction and precipitating solvents (ie. ethanol, acetone, iso-propanol) carried out at various ratios from 1:1 to 1:6 (v/v). The concentration of ammonium sulfate in crude enzyme extraction was used in ranged from 35% to 85%. The precipitating time of the best precipitation agent was also performed. The results showed that ethanol (99.5%) gave the highest potential for precipitation of both crude enzyme extraction. By using the crude protease extracted from the black tiger shrimp head, the enzyme specific activity, the protease yield and the purity degree reached 3.49 U/mg protein, 87.46% and 3.78 fold, respectively when, the ratio of material: ethanol was 1:4 (v/v) and 45 minutes of precipitation. Whereas, shrimp head to ethanol ratio 3: 1 (v/v) and precipitation time of 30 minutes were the best parameters for the precipitation of protease from white shrimp head. The obtained specific activity of the enzyme, the protease yield and the purity degree were 2.04 U/mg protein, 85.66% and 3.23 fold, respectively. With the both proteases, the molecular weight was estimated to be in the 35.8 to 40.5 kDa by using SDS-PAGE.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định ảnh hưởng của các tác nhân kết tủa đến hiệu quả tinh sạch enzyme protease trong dịch trích ly từ 2 loại thịt đầu tôm (sú và thẻ chân trắng). Tỷ lệ giữa dịch trích protease thô và dung môi (ethanol, acetone, iso-propanol) được thay đổi từ 1: 1 đến 1: 6 (v/v), tương tự nồng độ ammonium sulfate trong dịch trích cũng dao động từ 35% đến 85%. Xác định thời gian kết tủa thích hợp từ tác nhân được lựa chọn cũng được khảo sát. Kết quả cho thấy, ethanol đạt hiệu quả kết tủa protease cao cho cả hai dịch trích. Đối với dịch trích tôm sú, tỷ lệ mẫu: ethanol là 1: 4 (v/v) và thời gian kết tủa là 45 phút cho hoạt tính riêng, hiệu suất thu hồi và độ tinh sạch đạt tương ứng 3,49 U/mg protein, 87,46% và 3,78 lần. Đối với tôm thẻ, tỷ lệ mẫu với ethanol là 1: 3 (v/v), thời gian kết tủa 30 phút cho giá trị lần lượt là 2,04 U/mg protein, 85,66% và 3,23 lần. Cả hai loại protease được xác định bằng điện di SDS-PAGE có trọng lượng phân tử là 35,8 ÷ 40,5 kDa.

Trích dẫn: Hà Thị Thụy Vy, Trần Thanh Trúc và Nguyễn Văn Mươi, 2016. Ảnh hưởng của dung môi và thời gian kết tủa đến hiệu quả tinh sạch sơ bộ enzyme protease trích ly từ thịt đầu tôm. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 1): 9-17.

1 TỔNG QUAN

Protease là enzyme thủy phân có giá trị thương mại rất lớn, chiếm khoảng 60% tổng lượng enzyme công nghiệp được cung cấp trên thị trường thế giới (Joo and Chang, 2006) và được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như công nghiệp, nông nghiệp, mỹ phẩm, đặc biệt là trong y học hiện đại (Joo and Chang, 2006; Nedra *et al.*, 2011). Các nghiên cứu ứng dụng protease gần đây đã chỉ ra vai trò tích cực của việc sử dụng các protease trung tính, quan trọng hơn là protease ưa kiềm trong việc kiểm soát các bệnh liên quan đến sự nghẽn mạch do sự đông tụ của fibrin, khử protein trong phụ phẩm tôm, giúp quá trình chiết tách chitin, chitosan đạt hiệu quả tốt (Nedra *et al.*, 2011). Hệ protease trên đầu tôm có khả năng hoạt động khá mạnh với cả hai hệ endoprotease và exoprotease (Buarque *et al.*, 2010; Heu *et al.*, 2003). Chính vì thế, nghiên cứu sử dụng đầu tôm để tách chiết enzyme protease (Nguyễn Lệ Hà, 2014) là hướng đi đầy triển vọng. Nghiên cứu ảnh hưởng của các loại tác nhân kết tủa và tinh sạch protease trên phụ phẩm các loài tôm khác nhau để khảo sát các điều kiện hoạt động thích hợp nhằm xây dựng cơ sở ứng dụng nguồn enzyme protease trong chế biến thực phẩm.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Nguyên liệu thịt đầu tôm (sú và thè) sau khi phân tách tại nhà máy Chế biến thủy sản xuất nhập khẩu Hòa Trung (huyện Cái Nước, tỉnh Cà Mau), được xử lý sơ bộ và làm ráo nước trước khi phân chia thành các mẫu có khối lượng xác định, bao gói trong bao bì PA và cấp đông ở nhiệt độ -35°C đến -40°C cho đến khi nhiệt độ tâm đạt -18°C , tiến hành trữ đông ở $-18\pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.2 Phương pháp trích ly protease

Sau khi nghiên cứu, mẫu được cân định lượng rồi tiến hành trích ly bằng dung môi glycine-NaOH pH = 9,0; nhiệt độ 50°C với tỷ lệ mẫu: dung môi là 1: 4 (w/v) trong thời gian 40 phút để rút chiết enzyme (Trần Thanh Trúc và *ctv.*, 2014). Quá trình trích ly enzyme được thực hiện bằng máy khuấy từ liên tục với tốc độ 200 rpm nhằm làm tăng khả năng trích ly. Sau quá trình trích ly, mẫu được ly tâm ở tốc độ 6.000 rpm trong thời gian 20 phút, sau đó loại bỏ phần cặn, thu nhận phần dịch trong, gọi là dịch chiết enzyme protease thô (Yaneza *et al.*, 2004).

2.3 Phương pháp phân tích và đo đạc các chỉ tiêu

Các chỉ tiêu cơ bản được phân tích và đo đạc theo các phương pháp tiêu chuẩn:

Hoạt tính protease: Theo phương pháp Anson cải tiến (1938) sử dụng casein như cơ chất. Một đơn vị hoạt độ của protease được biểu thị là số micromole tyrosine sinh ra do thủy phân casein bởi 1 mL dung dịch hay 1 mg chế phẩm protease trong thời gian 1 phút ở điều kiện chuẩn (30°C ; pH 7,6).

Hoạt tính riêng là số đơn vị hoạt tính enzyme được tính trên 1 mg protein (phương pháp Bradford) của chế phẩm. Hiệu suất thu hồi protease là tỷ lệ giữa tổng hoạt tính enzyme thu được sau quá trình tinh sạch và tổng hoạt tính enzyme trong mẫu trước khi đem tinh sạch. Độ tinh sạch là tỷ lệ giữa hoạt tính riêng của enzyme thu được sau quá trình tinh sạch và hoạt tính riêng của mẫu enzyme trước khi đem tinh sạch.

Xác định khối lượng phân tử: Sử dụng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE để nhận diện protease và kiểm tra độ tinh sạch của protein.

2.4 Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, lặp lại ít nhất 3 lần. Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion 16.1, phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định LSD để kết luận về sự sai khác giữa trung bình các nghiệm thức.

2.5 Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.5.1 Thí nghiệm 1: Đánh giá ảnh hưởng của việc sử dụng dung môi hữu cơ để kết tủa protease thô từ dịch trích thịt đầu tôm

Thí nghiệm được thực hiện nhằm tìm ra loại dung môi và tỷ lệ sử dụng thích hợp để đạt hiệu quả kết tủa protease từ dịch trích của thịt đầu tôm mà không làm biến tính enzyme. Dung dịch enzyme thô được làm lạnh đến 4°C trước khi tiến hành thí nghiệm. Làm lạnh dung môi hữu cơ (ethanol, isopropanol và acetone) đến nhiệt độ -18°C , cho từ từ vào dịch enzyme thô theo các tỷ lệ như đã bố trí, lắc nhẹ và để ổn định 20 phút ở $0\pm 4^{\circ}\text{C}$ (Trần Quốc Hiền và Lê Văn Việt Mẫn, 2006). Sau khi kết tủa, hỗn hợp được ly tâm 6.000 rpm trong 20 phút ở 4°C , thu được phần kết tủa. Phần kết tủa được hòa tan bằng dung dịch đệm phosphate pH 7,5. Xác định hoạt tính, hàm lượng protein hòa tan và tính toán hiệu quả tinh sạch enzyme protease.

2.5.2 Thí nghiệm 2: Hiệu quả kết tủa của $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ đối với dịch trích protease thô

Thí nghiệm được tiến hành nhằm xác định tỷ lệ ammonium sulfate sử dụng thích hợp để đạt hiệu quả trong kết tủa protease từ dịch trích thịt đầu tôm. Dung dịch enzyme thô được làm lạnh đến 4°C trước khi sử dụng để kết tủa bằng muối

ammonium sulfate bão hòa theo các tỷ lệ từ 45% đến 85%. Sau đó, kết tủa thu được ở các phân đoạn muối bão hòa khác nhau sẽ được hòa tan trở lại bằng dung dịch đệm phosphate (pH 7,5) với thể tích vừa đủ. Tiếp theo, phần kết tủa được hòa tan sẽ đem đi thẩm tích trong dung dịch đệm phosphate (pH 7,5) bằng màng cellophane trong vòng 2 giờ (duy trì ở 0÷4°C). Sau cùng, ứng với từng phân đoạn muối bão hòa xác định hoạt tính, hàm lượng protein hòa tan của protease và tính toán hiệu quả tinh sạch của enzyme.

2.5.3 *Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của thời gian kết tủa đến hiệu quả thu nhận protease từ thịt đầu tôm*

Thí nghiệm được thực hiện tương tự như thí nghiệm 1 và 2 với tác nhân kết tủa được lựa chọn từ 2 thí nghiệm này. Thời gian kết tủa thay đổi ở 5 mức khảo sát khác nhau từ 15÷75 phút. Sau khi kết tủa, mẫu được tiến hành tách lấy kết tủa và hòa tan lại trong đệm phosphate 7,5 trước khi xác định hoạt tính enzyme protease và hàm lượng protein hòa tan.

2.5.4 *Thí nghiệm 4: Thu nhận protease kỹ thuật bằng phương pháp lọc màng*

Dựa trên kết quả kết tủa protein bằng muối hoặc dung môi hữu cơ khác nhau, tiến hành khảo sát hiệu quả của việc lọc màng. Đầu tiên, bơm 50 mL kết tủa đã hòa tan trong dung dịch đệm phosphate có pH 7,5 tốc độ 150 rpm qua hệ thống lọc màng QuixStand Benchtop Systems với bộ lọc

màng có khoảng phân đoạn 50 kDa. Điều chỉnh sao cho áp suất trên bề mặt màng không quá 5 psi (Huỳnh Ngọc Oanh và Trần Ngọc Hùng, 2008; Vương Bảo Thy và ctv., 2014), sau đó xác định hiệu quả của quá trình lọc màng.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ trong kết tủa protease thô từ dịch trích thịt đầu tôm

Phương pháp kết tủa bằng dung môi hữu cơ được tiến hành dựa trên độ hòa tan của protein, phụ thuộc vào sự tương tác của các nhóm tích điện trong phân tử protein với các phân tử nước. Dung môi hữu cơ thường dùng là ethanol, isopropanol, acetone hoặc hỗn hợp các loại rượu (Đặng Thị Thu và ctv., 2004).

3.1.1 Khả năng kết tủa protease từ dịch trích thịt đầu tôm bằng ethanol

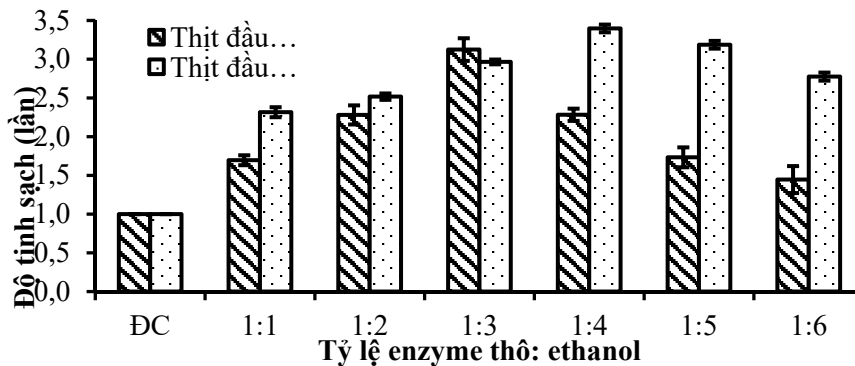
Ethanol là một trong những loại dung môi được sử dụng nhiều không chỉ ở các nghiên cứu kết tủa enzyme trong phòng thí nghiệm mà còn cả trong sản xuất công nghiệp. Hiệu quả của ethanol trong việc kết tủa protease từ dịch trích được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 1.

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy hiệu quả khi sử dụng ethanol trong quá trình tinh sạch protease từ thịt đầu tôm thể và thịt đầu tôm sú, hoạt tính riêng của enzyme ở các tỷ lệ ethanol bổ sung đều tăng so với mẫu protease thô ban đầu.

Bảng 1: Hiệu quả tinh sạch protease từ dịch trích thịt đầu tôm với dung môi ethanol

Tỷ lệ dịch enzyme thô/ethanol	Thịt đầu tôm thể		Thịt đầu tôm sú	
	Hoạt tính riêng (U/mg _{protein})	Hiệu suất (%)	Hoạt tính riêng (U/mg _{protein})	Hiệu suất (%)
Đối chứng	0,63±0,04 ^a	100,00 ^g	0,92±0,03 ^a	100,00 ^c
1: 1	1,07±0,04 ^c	12,92±0,46 ^a	2,14±0,06 ^b	20,09±1,53 ^a
1: 2	1,44±0,08 ^d	49,61±0,71 ^c	2,32±0,04 ^c	46,58±0,74 ^b
1: 3	1,98±0,09 ^e	83,59±1,40 ^f	2,74±0,03 ^c	63,86±0,75 ^c
1: 4	1,44±0,05 ^d	59,99±0,90 ^e	3,14±0,05 ^c	83,77±1,80 ^d
1: 5	1,10±0,08 ^c	51,88±1,28 ^d	2,94±0,08 ^f	63,50±1,23 ^c
1: 6	0,91±0,11 ^c	37,92±0,77 ^b	2,56±0,05 ^d	47,03±1,11 ^b

(Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở độ tin cậy 95%)



Hình 1: Độ tinh sạch protease ở các tỷ lệ ethanol khác nhau

Hoạt tính riêng protease đạt giá trị cao nhất khi sử dụng tỷ lệ dịch enzyme thô/ethanol là 1: 3 ở tôm thẻ (1,98 U/mg_{protein}) và tỷ lệ 1: 4 đối với tôm sú (3,14 U/mg_{protein}). Điều này được giải thích là do khi tăng tỷ lệ enzyme thô: ethanol lên thì hằng số điện môi của dung dịch thay đổi, các phân tử dung môi sẽ loại lớp phân tử nước bao lấy xung quanh phân tử protein, làm kết tủa nhanh protein (Polaina and MacCabe, 2007). Trong khi đó, khi tỷ lệ dung môi sử dụng tăng vượt quá 1: 3 ở tôm thẻ và 1: 4 ở tôm sú, hằng số điện môi thay đổi quá mức, thúc đẩy sự phá hủy enzyme, gây biến tính không thuận nghịch, dẫn đến hiệu quả tinh sạch giảm. Nghiên cứu của Vương Bảo Thy và *ctv.* (2014) cũng cho

thấy, việc sản xuất chế phẩm enzyme protease từ cá tra theo phương pháp kết tủa bằng ethanol với tỷ lệ dung môi: dịch trích enzyme là 3: 1 (v/v) cho hoạt tính protease đạt 49,26 U/g, hoạt độ riêng protease là 1,42 U/mg_{protein}. Hiệu suất thu nhận chế phẩm là 8,3% so với nguyên liệu ban đầu (w/w).

3.1.2 Khả năng kết tủa protease từ thịt đầu tôm bằng acetone

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của dung môi acetone đến hiệu suất thu hồi, độ tinh sạch và hoạt tính riêng của protease được trình bày ở Bảng 2 và Hình 2.

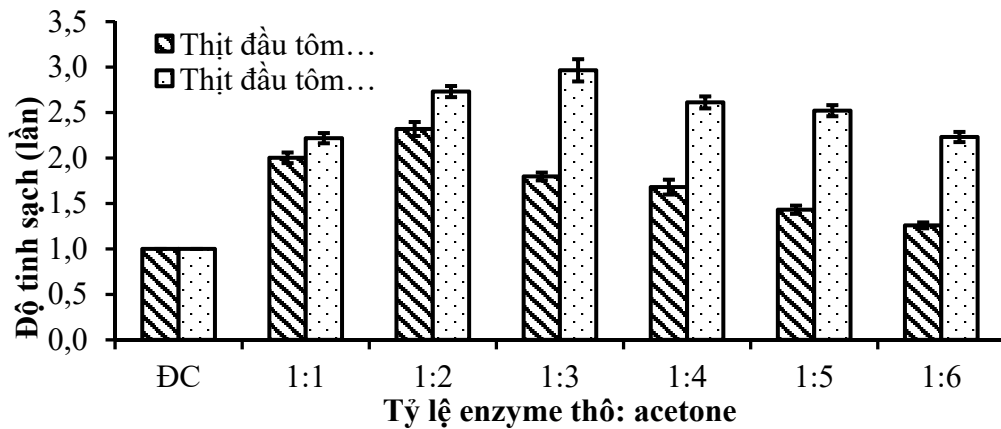
Bảng 2: Hiệu quả tinh sạch protease từ thịt đầu tôm với dung môi acetone

Tỷ lệ dịch enzyme thô/acetone	Thịt đầu tôm thẻ		Thịt đầu tôm sú	
	Hoạt tính riêng (U/mg _{protein})	Hiệu suất (%)	Hoạt tính riêng (U/mg _{protein})	Hiệu suất (%)
Đối chứng	0,63±0,04 ^a	100,00 ^g	0,92±0,03 ^a	100,00 ^g
1: 1	1,27±0,04 ^c	27,73±1,41 ^b	2,05±0,05 ^b	15,16±1,48 ^a
1: 2	1,47±0,05 ^f	64,33±0,60 ^f	2,52±0,06 ^d	37,65±0,73 ^c
1: 3	1,14±0,03 ^d	59,39±0,97 ^e	2,74±0,11 ^c	64,60±0,81 ^f
1: 4	1,06±0,05 ^c	53,69±1,00 ^d	2,41±0,06 ^{cd}	51,91±1,48 ^e
1: 5	0,91±0,03 ^b	48,24±1,08 ^c	2,33±0,07 ^c	41,75±1,50 ^d
1: 6	0,80±0,02 ^a	21,44±0,62 ^a	2,06±0,05 ^b	26,76±0,86 ^b

(Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở độ tin cậy 95%)

Kết quả từ Bảng 2 và Hình 2 cho thấy, acetone cũng tương tự như ethanol, tỷ lệ dịch enzyme thô từ thịt đầu tôm: dung môi thay đổi hiệu quả tinh sạch enzyme protease tăng và đạt giá trị cao nhất ở tỷ lệ 1: 2 đối với thịt đầu tôm thẻ và 1: 3 đối với thịt đầu tôm sú. Ở các tỷ lệ tiếp theo, hiệu quả tinh sạch giảm dần nhưng vẫn cho thấy hiệu quả tinh

sạch đáng kể so với mẫu đối chứng. Điều này có thể được giải thích là do protease thô thu được ít bền vững, đồng thời bản chất enzyme là protein nên khi gặp dung môi hữu cơ có tính phân cực mạnh như acetone, enzyme dễ dàng bị phá hủy khi bổ sung lượng acetone quá nhiều vào để kết tủa (Roe, 2001; Whitehurst and Law, 2002).



Hình 2: Độ tinh sạch protease ở các tỷ lệ acetone khác nhau

3.1.3 Khả năng kết tủa protease từ dịch trích thịt đầu tôm bằng isopropanol

isopropanol đến hiệu suất thu hồi, độ tinh sạch và hoạt tính riêng của protease được trình bày ở Bảng 3 và Hình 3.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của dung môi

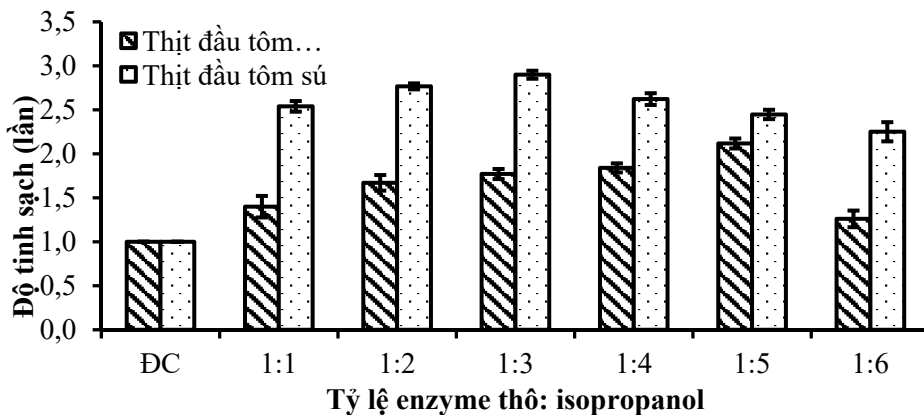
Bảng 3: Hiệu quả tinh sạch protease từ thịt đầu tôm với dung môi isopropanol

Tỷ lệ dịch enzyme thô/ Isopropanol	Thịt đầu tôm thỏ		Thịt đầu tôm sù	
	Hoạt tính riêng (U/mg _{protein})	Hiệu suất (%)	Hoạt tính riêng (U/mg _{protein})	Hiệu suất (%)
Đối chứng	0,63±0,04 ^a	100,00 ^g	0,92±0,03 ^a	100,00 ^g
1: 1	0,88±0,08 ^b	11,45±0,44 ^a	2,35±0,06 ^{cd}	37,17±0,66 ^b
1: 2	1,06±0,06 ^c	36,43±1,99 ^b	2,56±0,03 ^e	44,91±1,35 ^d
1: 3	1,12±0,04 ^{cd}	40,23±0,68 ^c	2,68±0,04 ^f	59,75±1,46 ^f
1: 4	1,16±0,03 ^d	46,13±1,90 ^d	2,42±0,06 ^d	51,24±1,80 ^e
1: 5	1,34±0,04 ^e	67,70±1,80 ^f	2,26±0,05 ^c	40,69±0,38 ^c
1: 6	0,80±0,06 ^b	57,35±1,23 ^e	2,08±0,10 ^b	28,96±1,12 ^a

(Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức tin cậy 95%)

Kết quả từ Bảng 3 cho thấy, hiệu quả tinh sạch enzyme protease từ thịt đầu tôm thỏ đạt giá trị cao nhất khi sử dụng tỷ lệ dịch protease thô và isopropanol là 1: 5, hiệu suất thu hồi protease là

67,70% và độ tinh sạch protease tăng 2,12 lần (Hình 3). Trong khi đó, đối với dịch protease thô từ thịt đầu tôm sù, hiệu quả tinh sạch đạt giá trị cao nhất ở tỷ lệ isopropanol là 1: 3.



Hình 3: Độ tinh sạch protease ở các tỷ lệ isopropanol sử dụng

Khi tiếp tục tăng tỷ lệ enzyme thô: isopropanol lên 1: 6 (đối với thịt đầu tôm thê) và 1: 4 (đối với thịt đầu tôm sú), hiệu quả tinh sạch giảm dần so với mẫu đối chứng. Kết quả khảo sát của Trần Quốc Hiền và Lê Văn Việt Mẫn (2006) cũng cho kết quả tương tự, khi tăng tỷ lệ isopropanol hiệu suất thu hồi protease cũng như mức tinh sạch của chế phẩm protease từ ruột cá basa sẽ tăng. Tỷ lệ Vmẫu/Vdm là 15/85 (tỷ lệ 1: 5,67), hiệu suất thu hồi protease cao nhất (90,42%) và mức tinh sạch của chế phẩm cũng cao nhất (1,65 lần). Nếu tiếp tục tăng tỷ lệ isopropanol trong thể tích hỗn hợp vượt quá 85%, hiệu suất thu hồi enzyme và mức tinh sạch của chế phẩm giảm.

3.2 Hiệu quả kết tủa của ammonium sulfate đối với dịch chiết protease thê

Kết quả khảo sát hiệu quả kết tủa bằng

Bảng 4: Hiệu quả tinh sạch protease từ thịt đầu tôm với dung môi (NH₄)₂SO₄

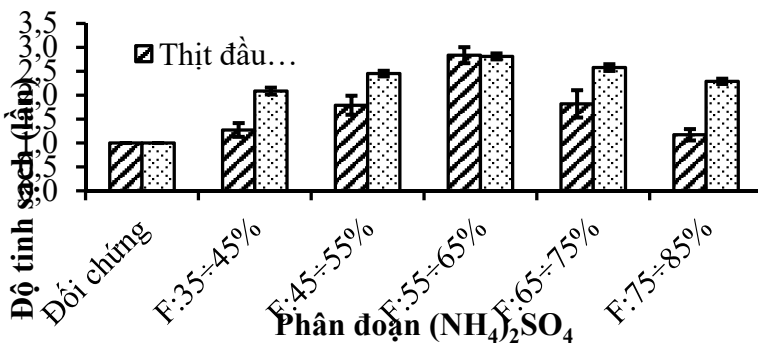
Tỷ lệ dịch trích/(NH ₄) ₂ SO ₄	Thịt đầu tôm thê		Thịt đầu tôm sú	
	Hoạt tính riêng (U/mg _{protein})	Hiệu suất (%)	Hoạt tính riêng (U/mg _{protein})	Hiệu suất (%)
Đối chứng	0,60±0,04 ^a	100,00 ^f	0,92±0,03 ^a	100,00 ^c
F35 ÷ 45%	0,80±0,09 ^a	10,47±0,97 ^b	1,93±0,07 ^b	9,46±0,96 ^a
F45 ÷ 55%	1,13±0,13 ^b	26,12±0,78 ^d	2,27±0,05 ^d	20,48±0,84 ^c
F55 ÷ 65%	1,79±0,11 ^c	36,71±1,75 ^e	2,60±0,06 ^f	41,72±0,94 ^d
F65 ÷ 75%	1,15±0,18 ^b	17,42±1,11 ^c	2,38±0,06 ^e	17,28±1,03 ^b
F75 ÷ 85%	0,74±0,08 ^a	7,86±0,84 ^a	2,11±0,05 ^c	9,25±0,71 ^a

(Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở độ tin cậy 95%)

Kết quả thí nghiệm cho thấy, hoạt tính riêng cũng như hiệu suất thu hồi và độ tinh sạch (Hình 4) không quan hệ tuyến tính với nồng độ muối

ammonium sulfate được thu thập, xử lý và tổng hợp ở Bảng 4. Đối với mẫu kết tủa ở phân đoạn F35÷45% (NH₄)₂SO₄, hoạt tính protease cũng như độ tinh sạch protease từ dịch trích thịt đầu tôm (cả tôm sú và tôm thê) khá thấp. Ngược lại, mẫu kết tủa ở phân đoạn F55÷65% (NH₄)₂SO₄ cho hiệu quả tinh sạch tốt nhất. Khi nồng độ (NH₄)₂SO₄ được sử dụng ở các phân đoạn cao hơn F55÷65% hiệu quả tinh sạch giảm dần. Khi thêm muối vào dung dịch protein thô, các phân tử muối (NH₄)₂SO₄ phân ly thành các ion, các ion này liên kết với các phân tử nước làm cho protein mất lớp áo nước, liên kết lại với nhau và hình thành kết tủa (Mukherjee and Banerjee, 2006). Tuy nhiên, khi nồng độ hóa chất kết tủa lớn hơn 65%, hoạt tính riêng càng thấp, việc sử dụng nồng độ (NH₄)₂SO₄ quá cao cũng làm biến tính không thuận nghịch protease.

(NH₄)₂SO₄ sử dụng. Mỗi loại enzyme có mức độ ion hóa, hydrate hóa và ái lực với nước khác nhau (Whitehurst and Law, 2002).



Hình 4: Độ tinh sạch protease ở các phân đoạn muối (NH₄)₂SO₄

3.3 So sánh, chọn lựa chất kết tủa enzyme protease tốt nhất

Bên cạnh việc tìm ra tỷ lệ sử dụng thích hợp của từng loại hóa chất trong quá trình kết tủa

protease, hiệu quả sử dụng của các loại hóa chất cần được so sánh nhằm kết tủa protease tạo chế phẩm enzyme có độ tinh sạch cao, tỷ lệ thu hồi lớn cũng như gia tăng khả năng ứng dụng enzyme.

Bảng 5: So sánh hiệu quả tinh sạch protease bằng các tác nhân khác nhau

Mẫu	Tác nhân kết tủa	Hoạt tính riêng (U/mg _{protein})	Hiệu suất thu hồi (%)	Độ tinh sạch (lần)
Thịt đầu tôm thẻ	(NH ₄) ₂ SO ₄ F55÷65%	1,79±0,11 ^c	36,71±1,75 ^a	2,84± 0,17 ^c
	Ethanol (1: 3)	1,98±0,09 ^d	83,59±1,40 ^f	3,12± 0,15 ^d
	Acetone (1: 2)	1,47±0,05 ^b	64,33±0,60 ^e	2,32± 0,08 ^b
	Isopropanol (1: 5)	1,34±0,04 ^a	67,70±1,08 ^e	2,12± 0,06 ^a
Thịt đầu tôm sú	(NH ₄) ₂ SO ₄ F55÷65%	2,60±0,06 ^c	41,72±0,94 ^b	2,81±0,06 ^c
	Ethanol (1: 4)	3,14±0,05 ^g	83,77±1,80 ^f	3,40±0,05 ^e
	Acetone (1: 3)	2,74±0,11 ^f	64,60±0,81 ^d	2,96±0,12 ^{cd}
	Isopropanol (1: 3)	2,68±0,04 ^{ef}	59,75±1,46 ^e	2,90±0,05 ^c

(Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở độ tin cậy 95%)

Kết quả thu nhận ở Bảng 5 cho thấy, trong cả hai trường hợp kết tủa protease từ dịch trích thịt đầu tôm sú và tôm thẻ, khi sử dụng các tác nhân khác nhau đều có sự khác biệt ý nghĩa thống kê trong giá trị của các chỉ tiêu theo dõi. Bên cạnh đó, hiệu quả tinh sạch, hoạt tính riêng cũng như hiệu suất thu hồi ở mẫu tôm sú đều cao hơn so với mẫu tôm thẻ khi sử dụng 4 tác nhân kết tủa. Tuy nhiên, kết tủa bằng ethanol tỏ ra khá ổn định cho cả hai dịch trích khi hiệu suất thu hồi và độ tinh sạch không có sự dao động lớn.

Vì vậy, tỷ lệ dịch protease thô: ethanol là 1: 3 ở thịt đầu tôm thẻ và 1: 4 đối với thịt đầu tôm sú được chọn lựa cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.4 Ảnh hưởng của thời gian kết tủa đến hiệu quả thu nhận protease từ thịt đầu tôm

Bên cạnh việc xác định tác nhân kết tủa, tỷ lệ

dung môi thì thời gian thực hiện kết tủa cũng ảnh hưởng đến hiệu suất, hoạt tính và độ tinh sạch của enzyme sau khi tinh sạch.

Kết quả thu nhận được từ Bảng 6 cho thấy, hiệu quả tinh sạch enzyme protease đạt giá trị cao nhất khi thời gian kết tủa bằng ethanol là 30 phút đối với tôm thẻ (hoạt tính riêng đạt 2,04 U/mg_{protein}; hiệu suất thu hồi 85,66%) và 45 phút ở thịt đầu tôm sú (hoạt tính riêng đạt 3,49 U/mg_{protein}; hiệu suất thu hồi 87,46%). Khi tiếp tục tăng thời gian kết tủa với ethanol, hiệu quả tinh sạch giảm dần. Với thời gian kết tủa là 75 phút, hiệu suất thu hồi và độ tinh sạch giảm. Khi tăng thời gian kết tủa, lượng enzyme thu nhận được càng nhiều, tuy nhiên khi thời gian kết tủa kéo dài lại làm tăng khả năng mất lớp nước liên kết với protein, gây biến tính của protein bởi dung môi nên hiệu quả tinh sạch giảm (Polaina and MacCabe, 2007).

Bảng 6: Ảnh hưởng của thời gian kết tủa đến hiệu quả kết tủa protease

Thời gian kết tủa (phút)	Thịt đầu tôm thẻ		Thịt đầu tôm sú	
	Hoạt tính riêng (U/mg _{protein})	Hiệu suất (%)	Hoạt tính riêng (U/mg _{protein})	Hiệu suất (%)
Đối chứng	0,65±0,04 ^a	100,00 ^f	0,92±0,03 ^a	100,00 ^f
15	1,78±0,07 ^d	71,97±0,73 ^d	2,78±0,06 ^d	68,08±1,39 ^c
30	2,04±0,03 ^c	85,66±1,71 ^e	3,25±0,08 ^c	84,08±0,49 ^d
45	1,87±0,10 ^d	54,29±0,75 ^c	3,49±0,07 ^f	87,46±1,34 ^e
60	1,53±0,05 ^c	45,37±1,34 ^b	2,65±0,05 ^c	58,16±1,60 ^b
75	1,22±0,12 ^b	31,97±0,73 ^a	1,74±0,10 ^b	52,30±1,30 ^a

(Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở độ tin cậy 95%)

3.5 Tinh sạch sơ bộ protease từ thịt đầu tôm bằng phương pháp lọc màng

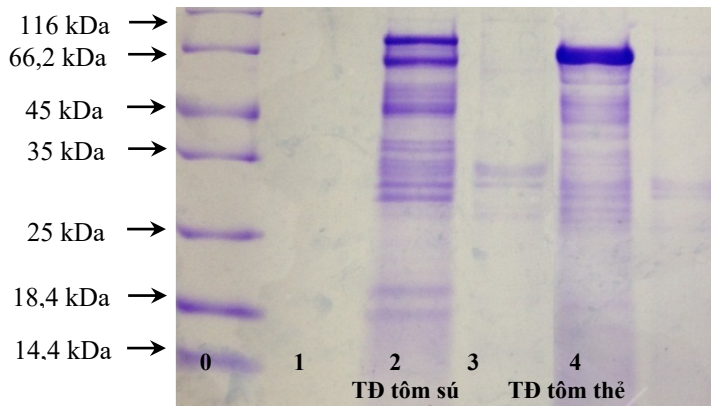
Kết quả thể hiện hiệu quả tinh sạch protease từ thịt đầu tôm bằng phương pháp lọc màng được thể hiện ở Bảng 7.

Bảng 7: Hiệu quả tinh sạch protease từ thịt đầu tôm sau quá trình lọc màng

Thông số	Thịt đầu tôm thẻ	Thịt đầu tôm sú
Hoạt tính riêng (U/mg _{protein})	3,18±0,12	4,73±0,15
Độ tinh sạch (lần)	4,98±0,89	5,14±0,46
Hiệu suất (%)	29,48±1,15	32,59±1,28

Kết quả thu được ở Bảng 7 cho thấy, hiệu suất thu hồi protease đạt được cho trường hợp tôm thẻ là 29,48%, trong khi hoạt tính riêng của protease đã qua lọc màng là 3,18 U/mg_{protein}. Ở mẫu protease từ thịt đầu tôm sú, hoạt tính riêng đạt 4,73 U/mg_{protein}, độ tinh sạch cũng tăng lên đáng kể. Hoạt tính riêng cao của mẫu enzyme sau bước kết tủa bằng ethanol

là điều kiện thuận lợi cho việc tinh sạch và thu nhận protease. Kết quả cũng cho thấy, hiệu quả của việc sử dụng ethanol trong việc kết tủa sơ bộ enzyme, tăng hiệu quả tinh sạch protease ở các bước tiếp theo. Tiến hành điện di protease sau khi lọc màng nhằm xác định khối lượng phân tử của enzyme thu được.



Hình 5: Kết quả điện di trên gel SDS-PAGE các mẫu protease

0: Thang chuẩn; 1, 3: mẫu enzyme thô sau ly trích, vi lọc 0,2 μm; 2, 4: protease sau quá trình kết tủa ethanol 1: 3 (v/v), lọc màng 50 kDa

Từ kết quả điện di trên gel SDS-PAGE ở Hình 5 có thể nhận thấy, mẫu enzyme thô ngay sau ly trích (giếng 2 và 4, mẫu enzyme protease sau khi kết tủa) có sự hiện diện của protein nằm trong khoảng khối lượng phân tử từ 35,8 đến 40,5 kDa, phù hợp với các khảo sát trước đó cho protease.

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, dung môi ethanol (99,5% thể tích) đạt hiệu quả kết tủa protease tốt nhất đối với cả hai dịch trích enzyme thô được trích ly từ thịt đầu tôm sú và thịt đầu tôm thẻ. Tỷ lệ mẫu: ethanol là 1: 4 (v/v) cho trường hợp thịt đầu tôm sú và 1:3 (v/v) cho tôm thẻ với thời gian kết tủa tương ứng là 45 phút và 30 phút. Cả hai loại enzyme protease đều có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 35,8 kDa đến 40,5 kDa với việc xác định được thực hiện bằng phương pháp điện di SDS-PAGE.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Buarque, D.S., Castro, P.F., Santos, F.M.S., Amaral, I.P.G., Oliveira, S.M., Alves, K.B., Carvalho Jr, L.B., and Bezerra, R.S., 2010. Digestive proteinases and peptidases in the hepatopancreas of the southern brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) in two sub-adult stages. *Aquaculture Nutrition*. 16(4), pp. 359-369.

Đặng Thị Thu (Chủ biên), Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Thu Thủy và Nguyễn Xuân Sâm,

2004. Công nghệ enzyme. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. 304 trang.

Heu, M. S., Kim, J., Shahidi, F., 2003. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*. 82: 235-242.

Huỳnh Ngọc Oanh và Trần Ngọc Hùng, 2008. Thu nhận enzyme pectinase từ *A. niger*-Tinh sạch bằng phương pháp lọc gel và lọc màng. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*. 11(8): 46-50.

Joo, H.S., and Chang, C.S., 2006. Production of an oxidant and SDS - Stable alkaline protease from an alkalophilic *Bacillus clausii* 1-52 submerged fermentation, feasibility as a laundry detergent additive. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 176-183.

Mukherjee, G., and Banerjee, R., 2006. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by a co-culture of *R. oryzae* and *A. foetidus*. 22: 207-212.

Nedra, E.H.A., Hmidet, N., Olfa, G., Nahed, F.Z., Ali, B., Nasri, M., 2011. Solvent-Stable Digestive Alkaline Proteinases from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*) Viscera: Characteristics, Application in the Deproteinization of Shrimp Waste and Evaluation in Laundry Commercial Detergents. 7: 1096-1110.

Nguyễn Lê Hà, 2013. Nghiên cứu tách chiết và ứng dụng enzyme protease từ tôm sú *Penaeus monodon* vào chế biến thủy sản. Luận án Tiến sĩ. Đại học Thủy Sản Nha Trang.

- Polaina, J., and MacCabe, A.P., 2007. *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Valencia, Spain, 633 pages.
- Roe, S., 2001. *Protein purification techniques*, Oxford University press. 262 pages.
- Trần Quốc Hiền và Lê Văn Việt Mẫn, 2006. Nghiên cứu ứng dụng enzyme protease từ ruột cá Basa. Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ. 11: 27-42.
- Trần Thanh Trúc, Trần Bạch Long, Phan Thị Bích Ngọc, Hà Thị Thụy Vy và Nguyễn Văn Mười, 2014. Nghiên cứu trích ly enzyme protease từ thịt đầu tôm sú (*Penaeus monodon*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Thủy sản (1): 8-14.
- Vương Bảo Thy, Trần Bích Lam và Lưu Duẩn, 2014. Nghiên cứu thu nhận chế phẩm enzyme từ gan và tụy cá Tra (*Pangasius hypophthalmus*) bằng phương pháp kết tủa. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ, 52(5C): 244-252.
- Whitehurst, R.J., and Law, B.A., 2002. *Enzymes in Food Technology*. Sheffield Academic Press CRC Press. 270 pages.
- Yaneza, F., Castillo, R., Aguilar, R.P., Carreno, F.L.G., de Los Angeles, M., Toro, N.D, 2004. Characterization of Acidic Proteolytic Enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagas caeruleae*) viscera. *Journal Food Chem.* 85: 343-350.