

NGHIÊN CỨU CHỌN NHUYỄN THỂ HAI MẢNH VỎ CHỨA PROTEASE HOẠT TÍNH CAO VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA ENZYME

Trần Quốc Đảm*, Đào Thị Tuyết Mai, Nguyễn Công Bình

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: *damtq@cntp.edu.vn*

Ngày nhận bài: 21/8/2017; Ngày chấp nhận đăng: 26/9/2017

Protease có khả năng thủy phân protein thành các peptid và acid amin hay còn gọi là dịch đạm thủy phân được ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tách chiết protease từ một số loại nhuyễn thể hai mảnh vỏ và khảo sát một số đặc tính của enzyme này. Tiến hành đánh giá hoạt độ protease từ một số nhuyễn thể hai mảnh vỏ bằng phương pháp Anson cải tiến. Kết quả lựa chọn được nhuyễn thể sò lụa chứa hệ protease có hoạt tính cao. Xác định được điều kiện tách chiết protease thích hợp từ nội tạng sò lụa là: đệm phosphat với tỷ lệ mẫu/dung môi là 1/2, nhiệt độ chiết là 35 °C và thời gian chiết là 10 phút. Protease thu được hoạt động thích hợp ở nhiệt độ 50 °C, pH 5,5 và có khả năng hoạt động thủy phân trong khoảng thời gian 5 giờ.

Từ khóa: Protease, nhuyễn thể hai mảnh vỏ, sò lụa, sò điệp, sò lông.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, việc sử dụng chế phẩm enzyme đã góp phần nâng cao chất lượng sản phẩm và giảm thiểu tác động gây ô nhiễm môi trường rất nhiều so với việc sử dụng chất hóa học. Chính vì thế, chế phẩm enzyme ngày càng được sử dụng phổ biến hơn. Có rất nhiều chế phẩm enzyme được thương mại hóa và mang lại giá trị kinh tế khá lớn ở nhiều quốc gia.

Protease là một trong những enzyme được ứng dụng nhiều nhất hiện nay. Trong công nghiệp thực phẩm, protease có vai trò quan trọng trong quá trình sản xuất nước mắm, trong sản xuất dịch đạm acid amin, sữa, phomai...[1, 2].

Nghiên cứu thu nhận enzyme từ nguyên liệu thủy sản đã và đang rất được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm [2]. Phần lớn các nghiên cứu chỉ tập trung vào hai đối tượng là cá và tôm. Trong thực tế, nhuyễn thể cũng có chứa hệ enzyme protease có hoạt tính cao [2-4]. Tuy nhiên, các nghiên cứu thu nhận enzyme từ nhuyễn thể nói chung và nhuyễn thể hai mảnh vỏ còn rất hạn chế. Theo thống kê của Tổng cục Thủy sản năm 2016 thì tổng sản lượng nhuyễn thể đạt khoảng 400.000 tấn, trong đó sò 54.280 tấn. Bên cạnh việc khai thác từ tự nhiên, một số nhuyễn thể hai mảnh vỏ cũng đã được nuôi ở nhiều tỉnh ven biển nên sản lượng thu được hàng năm là rất ổn định.

Như vậy, việc nghiên cứu thu nhận enzyme protease từ nhuyễn thể hai mảnh vỏ để tìm ra hệ protease có hoạt tính cao và bước đầu có thể ứng dụng enzyme này vào đời sống sản xuất là cần thiết.

Theo các nghiên cứu về thu nhận protease từ thủy sản cho thấy hoạt tính enzyme thu được phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện tách chiết enzyme [2, 5, 6]. Mục tiêu của nghiên cứu này là lựa chọn loại nhuyễn thể hai mảnh vỏ chứa protease có hoạt tính cao, xác định điều kiện tách chiết protease thích hợp và một số tính chất của enzyme thu được.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Nhuộm thể hai mảnh vỏ

Sò lông, sò điệp và sò lụa kích cỡ 30 con/kg được mua tại chợ Bình Điền và bảo quản sống đưa về phòng thí nghiệm.

2.1.2. Dung môi chiết enzyme

Đệm phosphat pH 7, đệm tris-HCl pH 7, nước muối sinh lý và nước cất được sử dụng làm dung môi chiết enzyme. Các hóa chất sử dụng được sản xuất từ Trung Quốc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xử lý mẫu

Sò được tách bỏ phần vỏ và thu phần thịt. Sau đó tiếp tục tách lấy phần nội tạng từ phần thịt sò. Phần nội tạng sò được đưa đi nghiền nhuộm bằng cối chày sứ. Hỗn hợp nội tạng sò được đưa đi ủ ở 35 °C trong thời gian khoảng 30 phút trước khi tách chiết enzyme.

2.2.2. Phương pháp thu nhận dịch protease thô từ nội tạng nhuộm thể

Nội tạng sò được chiết với dung môi ở tỷ lệ mẫu/dung môi, nhiệt độ và thời gian chiết thích hợp. Sau khi chiết đủ thời gian tiến hành đưa mẫu chiết đi ly tâm lạnh với tốc độ 6000 vòng/phút, ở 4 °C trong 15 phút. Sau khi ly tâm, thu phần dịch lỏng có chứa protease bên trên và loại bỏ phần kết tủa bên dưới. Phần dịch lỏng này được gọi là dịch protease thô [2, 5].

2.2.3. Phương pháp xác định hoạt độ của protease

Hoạt độ protease được xác định theo phương pháp Anson cải tiến [1].

Phương pháp này dựa trên sự thủy phân protein casein bằng protease có trong dịch nghiền cứu, tiếp đó làm vô hoạt enzyme và kết tủa protein chưa bị thủy phân bằng dung dịch acid trichloroacetic. Định lượng sản phẩm được tạo thành trong phản ứng thủy phân bằng phản ứng màu với thuốc thử Folin. Dựa vào đồ thị chuẩn của Tyrosin để tính lượng sản phẩm do enzyme xúc tác tạo nên.

Hoạt độ protease được xác định dựa vào lượng μM tyrosin hình thành trong quá trình thủy phân casein. Một đơn vị hoạt độ protease là lượng enzyme thủy phân casein tạo thành 1 μM tyrosin trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm.

2.2.4. Phương pháp xác định loại, tỷ lệ dung môi, nhiệt độ và thời gian tách chiết protease thích hợp

Lấy 10 g mẫu nội tạng nhuộm thể hai mảnh vỏ đưa đi chiết lần lượt với từng loại dung môi chiết ở các tỷ lệ mẫu/dung môi là 1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 (w/v), ở nhiệt độ chiết 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C và thời gian chiết 5 phút, 10 phút, 15 phút, 20 phút, 25 phút. Sau khi chiết, thu nhận dịch protease thô của từng mẫu chiết và xác định hoạt độ protease. Tiến hành nghiên cứu theo quy hoạch cổ điển, mỗi thí nghiệm được lập lại 3 lần và lấy số liệu trung bình [2, 7].

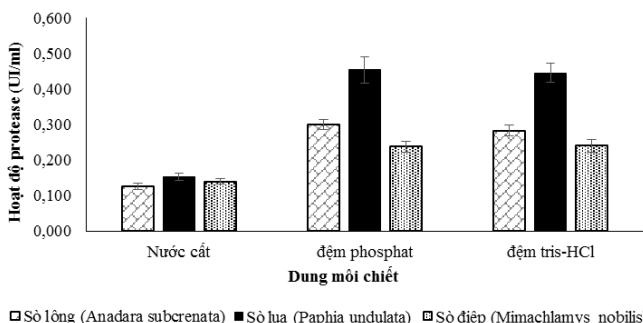
2.2.5. Phương pháp xác định ảnh hưởng của nhiệt độ và pH ban đầu đến hoạt động của protease

Thực hiện phản ứng thủy phân giữa protease thô thu được với dung dịch casein 1%, tỷ lệ E/S là 1/2. Thực hiện phản ứng ở các nhiệt độ khác nhau từ 30 - 70 °C với bước nhảy là 5 °C và pH ban đầu khác nhau từ 5 - 9 với bước nhảy là 0,5. Sau khi thủy phân, xác định hoạt độ protease ở từng chế độ thủy phân [8]. Tiến hành nghiên cứu theo quy hoạch cổ điển, mỗi thí nghiệm được lập lại 3 lần và lấy số liệu trung bình.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả chọn nhuộm thể hai mảnh vỏ chứa protease có hoạt tính cao

Mẫu nội tạng từ sò lông, sò lụa và sò điệp lần lượt được đưa đi chiết với từng dung môi là nước cất, đệm phosphat và đệm tris-HCl với tỷ lệ mẫu/dung môi là 1/2 (w/v) để thu dịch protease thô. Kết quả nghiên cứu cho thấy trong 3 loại dung môi chiết khảo sát thì protease tách chiết được từ nội tạng sò lụa đều có hoạt độ cao hơn so với protease tách chiết từ sò lông và sò điệp như trong Hình 1. Kết quả này bước đầu có thể xác định được sò lụa là đối tượng chứa protease có hoạt tính cao nhất trong 3 loại nhuộm thể hai mảnh vỏ khảo sát.

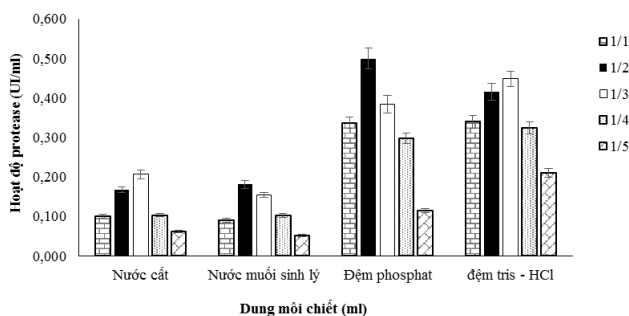


Hình 1. Hoạt độ protease của dịch chiết thô từ nội tạng sò lông, sò lụa và sò điệp

3.2. Kết quả xác định ảnh hưởng của điều kiện tách chiết đến hoạt độ protease từ nội tạng sò lụa

3.2.1. Ảnh hưởng của loại và tỷ lệ dung môi chiết

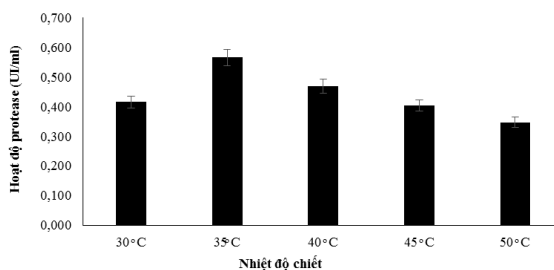
Ảnh hưởng của loại và tỷ lệ dung môi chiết đến hoạt độ protease trong dịch chiết thu được từ nội tạng sò lụa được thể hiện trong Hình 2. Trong 4 loại dung môi chiết khảo sát thì đệm phosphat chiết được protease có hoạt độ cao nhất. Điều này có thể do trong môi trường đệm phosphat enzyme protease có trạng thái ion tốt hơn trong các môi trường chiết còn lại nên enzyme thu có hoạt độ được cao hơn. Tỷ lệ mẫu/dung môi thích hợp để chiết protease từ nội tạng sò lụa của các dung môi chiết cũng khác nhau. Với đệm phosphat, tỷ lệ mẫu/dung môi chiết thích hợp nhất là 1/2. Khi tiếp tục tăng tỷ lệ chiết lên 1/3, 1/4 và 1/5 thì hoạt độ protease thu được giảm. Điều này là do ở tỷ lệ chiết 1/2 đã chiết được hết lượng enzyme protease trong mẫu nên khi tiếp tục tăng tỷ lệ mẫu chiết/dung môi thì lượng enzyme chiết không đổi nhưng lượng dung môi tăng nên làm hoạt độ protease sẽ giảm tương đối. Như vậy, đệm phosphat là dung môi phù hợp để chiết protease từ nội tạng sò lụa với tỷ lệ mẫu/dung môi chiết là 1/2.



Hình 2. Ảnh hưởng của loại và tỷ lệ dung môi đến hoạt độ dịch chiết protease thu được từ nội tạng sò lụa

3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

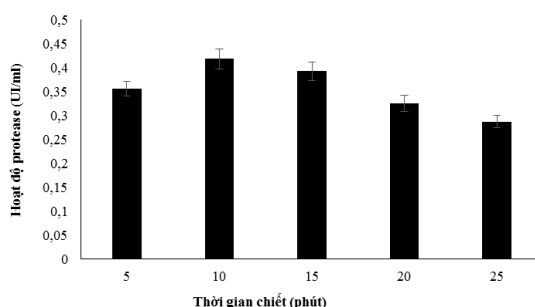
Kết quả từ Hình 3 thể hiện sự ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hoạt độ protease thu được từ nội tạng sò lụa. Khi tăng nhiệt độ chiết từ 30 - 35 °C thì hoạt độ protease dịch chiết thu được tăng. Điều này có thể là do khi nhiệt độ tăng thì quá trình khuếch tán enzyme protease vào dịch chiết tăng nên hoạt độ protease trong dịch chiết thu được cũng tăng. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nhiệt độ chiết lên 40 °C, 45 °C và 50 °C thì hoạt độ protease trong dịch chiết thu được giảm. Điều này có thể là do trong khoảng nhiệt độ từ 40 °C - 50 °C có thể làm tăng khả năng hòa tan thêm một số chất tan khác có tác dụng kiềm hãm hoạt động của enzyme thu được nên làm giảm hoạt tính enzyme. Như vậy, nhiệt độ thích hợp để chiết protease từ nội tạng sò là 35 °C.



Hình 3. Ảnh hưởng nhiệt độ chiết đến hoạt độ dịch chiết protease thu được từ nội tạng sò lụa

3.2.3. Ảnh hưởng của thời gian chiết

Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hoạt độ protease thu được từ nội tạng sò lụa được thể hiện trong Hình 4. Trong khoảng thời gian chiết từ 5 - 10 phút, khi tăng thời gian chiết thì hoạt độ protease từ dịch chiết thu được tăng. Điều này hoàn toàn phù hợp với định luật khuếch tán Fick. Tuy nhiên, khi tiếp tục kéo dài thời gian chiết lên 15 phút, 20 phút và 25 phút thì hoạt độ protease dịch chiết thu được giảm nhẹ. Điều này có thể do ở khoảng thời gian 10 phút thì lượng protease đã khuếch tán hết vào dịch chiết và khi kéo dài thêm thời gian chiết thì lúc này các yếu tố bên ngoài tác động bất lợi đến protease nên làm giảm hoạt tính protease theo thời gian. Như vậy, thời gian chiết protease từ nội tạng sò lụa thích hợp là 10 phút.



Hình 4. Ảnh hưởng thời gian chiết đến hoạt độ dịch chiết protease thu được từ sò lụa.

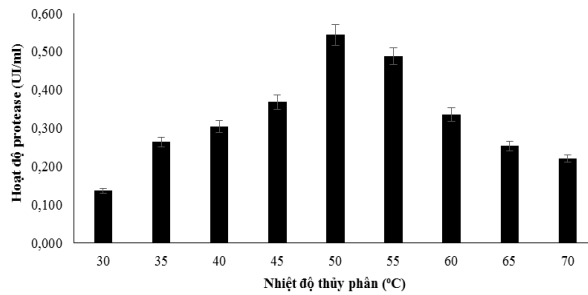
3.3. Kết quả xác định một số đặc tính của protease từ nội tạng sò lụa

3.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ protease từ nội tạng sò lụa

Kết quả từ Hình 5 thể hiện sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng hoạt động của enzyme protease từ nội tạng sò lụa. Khi tăng nhiệt độ từ 30 - 50 °C thì hoạt độ protease tăng dần và đạt hoạt độ cực đại ở 50 °C. Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng nhiệt độ thủy phân lên 55 °C thì hoạt độ protease có sự giảm nhẹ và giảm mạnh ở nhiệt độ thủy phân 60 °C, 65 °C và 70 °C. Điều này là do khi nhiệt độ thủy phân tăng lớn hơn 55 °C thì protease bắt đầu bị biến

tính và ở khoảng nhiệt độ 65 - 70 °C thì protease biến tính mạnh nên hoạt độ protease giảm mạnh. Như vậy, nhiệt độ hoạt động thích hợp của protease từ nội tạng sò lụa là 50 °C.

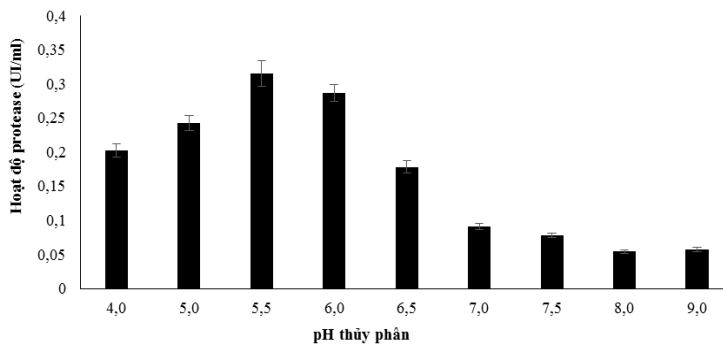
Nhiệt độ hoạt động của protease từ nội tạng sò lụa hơi thấp hơn so với nhiệt độ hoạt động của protease từ nội tạng cá thu, cá ngừ và gan mực ống đánh bắt ở biển Việt Nam là 55 °C và thấp hơn nhiều so với protease từ nội tạng và đầu tôm sú *Penaeus monodon* là 62 °C [7, 8]. Như vậy, ở nhiệt độ hoạt động thích hợp là 50 °C thì protease thu từ nội tạng sò lụa cũng thuộc nhóm enzyme ưa nhiệt và đây là lợi thế lớn khi ứng dụng protease thu được vào quá trình sản xuất vì có thể hạn chế được sự phát triển của một số vi khuẩn có thể làm giảm chất lượng sản phẩm.



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hoạt tính của protease từ nội tạng sò lụa

3.3.2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ của protease từ nội tạng sò lụa

Kết quả từ Hình 6 thể hiện mối quan hệ giữa độ pH và khả năng hoạt động của protease từ nội tạng sò lụa. Khi tăng giá trị pH từ 4,0 - 5,5 thì hoạt độ protease tăng và đạt cực đại ở pH 5,5. Điều này có thể do ở pH 5,5 enzyme và cơ chất đạt trạng thái ion hóa cao nhất nên đạt hoạt độ cao nhất. Tuy nhiên, khi tăng giá trị pH đến 6,0 thì hoạt độ protease giảm nhẹ và ở pH từ 7,0 - 9,0 thì hoạt độ protease giảm mạnh. Điều này có thể do khi pH tăng enzyme và cơ chất không còn ở trạng thái ion hóa cao nên hoạt độ giảm. Mặc khác, ở khoảng pH từ 7,0 - 9,0 có thể enzyme protease đã bị biến tính một phần nên hoạt tính bị giảm. Như vậy, giá trị pH ban đầu thích hợp của protease từ nội tạng sò lụa là pH 5,5. Protease thu được rất nhạy cảm với pH trong môi trường trung tính với kiềm cho nên chỉ có thể ứng dụng enzyme này trong các quá trình thủy phân có điều kiện môi trường acid yếu.

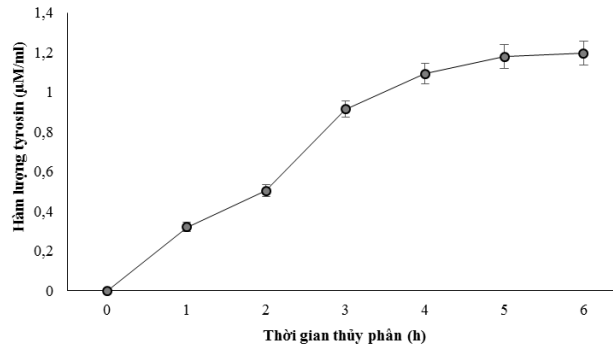


Hình 6. Ảnh hưởng của pH phản ứng đến hoạt tính protease từ nội tạng sò lụa

3.3.3. Thời gian hoạt động thủy phân của protease từ nội tạng sò lụa

Xác định thời gian hoạt động của enzyme có ý nghĩa quan trọng trong quá trình ứng dụng enzyme. Mỗi enzyme chỉ hoạt động xúc tác trong một khoảng thời gian xác định. Điều này còn phụ thuộc vào mức độ tinh sạch và chế độ bảo quản enzyme. Để xác định thời gian

hoạt động của protease từ nội tạng sò lụa, tiến hành thực hiện phản ứng giữa enzyme với cơ chất casein ở nhiệt độ 50 °C, pH 5,5 theo thời gian. Sau mỗi giờ thủy phân, tiến hành xác định hàm lượng tyrosin hình thành trong dịch thủy phân.



Hình 7. Sự thay đổi hàm lượng tyrosin theo thời gian thủy phân casein bằng protease từ nội tạng sò lụa

Kết quả từ Hình 7 thể hiện mối quan hệ giữa hàm lượng tyrosin hình thành trong dịch thủy phân và thời gian hoạt động thủy phân của protease từ nội tạng sò lụa. Trong khoảng thời gian từ 0 - 5 h, khi thời gian thủy phân tăng thì hàm lượng tyrosin hình thành trong dịch thủy phân cũng tăng do enzyme thủy phân cơ chất. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng thời gian thủy phân lên 6 h thì hàm lượng tyrosin tăng không đáng kể so với hàm lượng tyrosin sau thời gian thủy phân 5 h. Điều này có thể do sau khoảng thời gian thủy 5 h thì enzyme đã bị mất hoạt tính hoặc các biến đổi môi trường lúc này bắt đầu kiềm hãm hoạt động của enzyme. Như vậy, có thể kết thúc phản ứng thủy phân của protease từ nội tạng sò lụa sau khoảng thời gian là 5 h.

4. KẾT LUẬN

Trong 3 đối tượng nhuộm thể hai mảnh vỏ thực hiện khảo sát thì sò lụa chứa hệ enzyme protease có hoạt tính cao hơn so với sò điệp và sò lông. Bước đầu xác định được điều kiện thích hợp để tách chiết protease từ nội tạng sò lụa là đệm phosphat với tỷ lệ mẫu/dung môi là 1/2, nhiệt độ chiết là 35 °C và thời gian chiết là 10 phút. Enzyme protease thu được hoạt động tốt ở nhiệt độ là 50 °C. Ở nhiệt độ này khi ứng dụng enzyme vào chế biến thực phẩm có thể ức chế được một số vi sinh vật gây thối và giữ được chất lượng sản phẩm. Hoạt tính protease thu được thể hiện tốt nhất ở pH ban đầu 5,5 và khả năng hoạt động thủy phân trong khoảng thời gian là 5 h.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Trọng Căn, Nguyễn Thị Hiền, Đỗ Thị Giang, Trần Thị Luyến - Công nghệ enzyme, Nhà xuất bản Nông nghiệp TP. Hồ Chí Minh, 1998.
2. Trần Thị Luyến, Đỗ Minh Phụng, Nguyễn Anh Tuấn, Nguyễn Lệ Hà - Sản xuất các chế phẩm kỹ thuật và y dược từ phế liệu thủy sản, Nhà xuất bản Nông nghiệp TP. Hồ Chí Minh, 2016.
3. Nguyễn Lệ Hà - Một số enzyme từ động vật thủy sản, Tạp chí Khoa học - Công nghệ thủy sản, Số 3 (2013) 183-189.
4. Sriket C. - Proteases in fish and shellfish: Role on muscle softening and prevention, International Food Research Journal 21 (2014) 433-445, <http://www.ifrj.upm.edu.my>.

5. Lâm Tuyết Hận - Nghiên cứu thu chế phẩm enzyme protease từ nội tạng cá chẽm (*Lates calcarifer*) và ứng dụng sản xuất bột cá thực phẩm, Luận văn thạc sĩ kỹ thuật, Trường Đại học Nha Trang, 2009.
6. Trần Quốc Hiền, Lê Văn Việt Mẫn - Nghiên cứu thu nhận chế phẩm enzyme protease từ ruột cá basa (*Pangasius bocourti*), Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ, Số 11 (9) (2006) 59-67.
7. Đỗ Văn Ninh - Nghiên cứu quá trình thủy phân protein cá bằng protease nội tạng cá, mực và thử nghiệm sản xuất sản phẩm mới từ protein được thủy phân, Luận án tiến sĩ kỹ thuật, Trường Đại học Thủy sản, Nha Trang, 2004.
8. Nguyễn Lệ Hà - Protease tinh sạch từ tôm sú *penaeus monodon* và một số tính chất cơ bản, Tạp chí Khoa học - Công nghệ thủy sản, Số 2 (2015), 32-37.

ABSTRACT

SELECTION OF BIVALVE SPECIES CONTAINING HIGHLY-ACTIVE PROTEASE AND DETERMINATION OF SOME PROPERTIES OF ENZYME

Tran Quoc Dam*, Dao Thi Tuyen Mai, Nguyen Cong Binh
Ho Chi Minh City University of Food Industry
*Email: damtq@cntp.edu.vn

Protease is able to hydrolyze the proteins into peptides and amino acids or known as hydrolyzed protein which is popularly used in many industries. In this study, we extracted the protease from some bivalve species and determined some properties of this enzyme. Evaluation of proteolytic activity from some bivalve species was carried out using the modified Anson's method. The results showed the short-neck clam (*Paphia undulata*) contained highly active proteases. The optimum conditions for extraction of protease from the short-neck clam were determined as follows: ratio of sample to phosphate buffer at 1/2; extraction temperature at 35 °C and extraction duration of 10 minutes. This protease activity is the best at 50 °C, pH 5.5 and hydrolysis for 5 hours.

Keywords: Protease, bivalve, *Paphia undulata*, *Mimachlamys nobilis*, *Anadara subcrenata*.