

TINH SẠCH VÀ KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM PROTEASE TỪ TRÙN QUẢN (*PHERETIMA POSTHUMA*)

Phan Thị Bích Trâm¹, Trương Thủy Trang², và Dương Thị Hương Giang²

ABSTRACT

The results of this study showed that the crude enzyme extract of Trun Quan (*Pheretima posthuma*) was the most active on both casein and fibrin substrates in comparison with that of Trun Ho, Trun Que, Trun Com and Trun Chi. Period of autolysis to get highest protease activity was 4 days. The optimum conditions for protease activity were 55°C and pH 8 and 10. These enzymes were stable at 25-55°C and at pH 7 and 11. The protease fractions were purified by acetone precipitation in combination with ionexchange and hydrophobic chromatography. SDS-PAGE activity staining on casein substrate without beta-mercaptoethanol revealed that the enzyme composition of Trun Quan was complex. It composed of 10 protease fractions with molecular weight in a range from 24,0 to 58,3 kDa.

Keywords: *Trun Quan, Pheretima posthuma, protease, fibrin plate, ionexchange chromatography, hydrophobic chromatography, SDS-PAGE activity staining*

Title: *Purification and characterization of proteases from earthworm (Pheretima posthuma)*

TÓM TẮT

Kết quả đề tài nghiên cứu cho thấy hoạt tính của protease từ dịch trích enzyme thô của trùn quản trên cả hai cơ chất casein và fibrin đều mạnh hơn so với trùn hổ, trùn quế, trùn com và trùn chỉ. Thời gian thích hợp cho quá trình tự thủy phân để đạt hoạt tính protease cao nhất là 4 ngày. Nhiệt độ tối ưu là 55°C, và pH tối ưu là 8 và 10. Enzyme bền trong khoảng nhiệt độ 25-55°C, ở pH 7 và 11.

Tinh sạch bằng tua acetone, phối hợp với sắc ký trao đổi ion và tương tác kỵ nước, đồng thời phân tích điện di SDS-PAGE nhuộm hoạt tính không có beta-mercaptoethanol trên cơ chất casein cho thấy thành phần protease trong trùn quản khá phức tạp, có đến 10 phân đoạn enzyme khác nhau với trọng lượng phân tử từ 24,0 kDa đến 58,3 kDa.

Từ khóa: *Trùn Quản, Pheretima posthuma, protease, đĩa fibrin, sắc ký trao đổi ion, sắc ký tương tác kỵ nước, SDS-PAGE nhuộm hoạt tính*

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, hệ protease trong các loài trùn đất đang được quan tâm nghiên cứu. Một số nước Châu Á như Nhật, Trung quốc, Hàn Quốc đã chiết xuất và tinh sạch được enzyme Lumbrokinase từ các loại trùn đất như *Lumbricus rubellus* (Cho, I.H., 2004 & Mihara, H.,1993), *Eisenia fetida* (Yang J.S., 1997). Các enzyme này có khả năng thủy phân được fibrin, làm tan các cục máu đông, và được ứng dụng trong y dược học để điều trị một số bệnh về tim mạch. Ở Việt Nam, các nghiên cứu sơ bộ qua tiến hành xác định hoạt tính thủy phân fibrin tách từ một số loài trùn đất (Thùy *et al.*, 2002), cho thấy ở loài trùn quế (*Perionyx excavatus*) hoạt tính này

¹ Bộ môn Sinh lý- Sinh Hóa, Khoa Nông Nghiệp & Sinh học ứng dụng

² Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học

khá cao. Viện Công nghệ Sinh học Quốc gia Hà Nội đã có những nghiên cứu tách dòng và biểu hiện gen mã hóa cho enzyme thủy phân fibrin từ trùn quế (Bách *et al.*, 2003), gần đây nhất là nghiên cứu chiết tách và tinh sạch protease từ trùn quế bằng các kỹ thuật sắc ký (Trâm *et al.*, 2006).

Những khảo sát ban đầu được tiến hành ở phòng thí nghiệm enzyme Viện NC&PT CNSH cho thấy ngoài trùn quế các loại trùn khác như trùn quắn, trùn com, và trùn hổ cũng có hoạt tính protease mạnh, nhưng ở trùn quắn là trội hơn cả. Đề tài nhằm mục đích khảo sát đặc điểm hệ protease từ trùn quắn (*Pheretima posthuma*), và xác định hoạt tính thủy phân fibrin trên đối tượng trùn này, đồng thời đưa ra quy trình tinh sạch thích hợp, góp phần làm tăng thêm giá trị của nguồn trùn đất Việt Nam.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương tiện thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành tại phòng Công nghệ Enzyme và phòng Sinh hóa của Viện Nghiên Cứu và Phát Triển Công Nghệ Sinh Học, trường Đại Học Cần Thơ.

2.1.1 Nguyên liệu thí nghiệm

Trùn quắn, trùn com, trùn hổ, trùn quế, trùn chỉ được mua tại huyện Châu Thành, tỉnh Hậu Giang, trữ ở -20°C.

Bột enzyme thô: Trùn được rửa sạch bằng nước lạnh, sau đó rửa lại bằng nước cất, nghiền nhuyễn, trích ly enzyme bằng nước cất. Ly tâm bỏ cặn, dung dịch enzyme được tủa bằng acetone lạnh. Ly tâm thu lấy phần tủa, làm khô trong bình hút ẩm. Bột enzyme thô được trữ ở -20°C.

2.1.2 Bố trí thí nghiệm

(a) Khảo sát đặc điểm protease trùn quắn

Thí nghiệm 1: Khảo sát khả năng thủy phân fibrin và casein của protease trong các loài trùn khác nhau.

- Hoạt tính thủy phân fibrin: Đĩa fibrin được chuẩn bị như sau: agarose (1,6%) + fibrinogen (0,6%) + thrombin (10NIH /ml), cho vào đĩa petri, ổn định 1 giờ. Tạo các lỗ đường kính 5mm, mỗi lỗ bơm vào 10 µl enzyme (1mg/ml) trích ly từ 5 giống trùn khảo sát: Trùn com, trùn hổ, trùn chỉ, trùn quắn và trùn quế. Ủ 8 giờ ở 37°C. Hoạt tính fibrin của enzyme được so sánh dựa vào diện tích vòng tròn thủy phân tạo thành trên đĩa.
- Hoạt tính thủy phân casein được khảo sát bằng phương pháp Anson cải tiến (Phạm Thị Trân Châu *et al.*, 1997)

Thí nghiệm 2: Khảo sát khả năng tự phân giải của enzyme trùn quắn

Trùn quắn được nghiền nhuyễn trong nước cất, khuấy đều ở 45°C, tiến hành thủy phân ở nhiệt độ phòng. Mẫu enzyme được lấy từ ngày thứ nhất đến ngày thứ 10 và kiểm tra hoạt tính trên casein. Thí nghiệm được lập lại 2 lần.

(b) Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt tính protease trùn quắn

- Thí nghiệm 3: Khảo sát nhiệt độ tối ưu của bột enzyme thô

- Enzyme được ủ ở các nhiệt độ 25, 35, 45, 55, 65, 75°C trong 10', đo hoạt tính trên casein.
- Thí nghiệm 4: Khảo sát độ bền nhiệt của bột enzyme thô
- Enzyme được ủ ở các nhiệt độ như thí nghiệm 3 trong 12giờ, sau đó ổn định ở nhiệt độ phòng trong 30', đo hoạt tính trên casein.
- Thí nghiệm 5: Khảo sát pH tối ưu của bột enzyme thô
- Enzyme được ủ ở các pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 trong 15' ở nhiệt độ tối ưu đã chọn ở thí nghiệm 3. Đo hoạt tính trên casein.
- Thí nghiệm 6: Khảo sát độ bền pH của bột enzyme thô, enzyme được ủ ở các pH như thí nghiệm 5 trong 12g, sau đó đưa về pH 7. Đo hoạt tính trên casein.

Các thí nghiệm 3, 4, 5, và 6 được bố trí theo thể thức một nhân tố hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Định nghĩa về đơn vị hoạt tính (ĐVHT) enzyme: 1 ĐVHT enzyme (U (Unit)) là lượng enzyme cần thiết để thủy phân casein, tương đương với 1 μ M tyrosine sinh ra trong thời gian 1 phút ở nhiệt độ 37°C, pH 7.5.

Hoạt tính đặc hiệu: là số ĐVHT enzyme có trong 1mg protein (U/mg).

(c) Các bước tinh sạch protease

- Thí nghiệm 7: Sắc ký trao đổi ion

Cân bằng cột gel trao đổi ion âm Unosphere Q với dung dịch đệm tris-HCl pH 8,5, tốc độ 0,8ml/phút. Bột enzyme thô được hòa tan trong cùng dung dịch đệm và cho qua cột. Rửa cột với cùng dung dịch, tốc độ 1ml/phút, để loại các protein không bám trên cột. Đẩy các protein bám trên cột bằng gradient nồng độ muối NaCl tăng dần từ 0-0,45M trong Tris-HCl, pH 8,5. Thu các phân đoạn protein kiểm tra hoạt tính bằng phương pháp Anson cải tiến và điện di SDS-PAGE nhuộm hoạt tính casein.

- Thí nghiệm 8: Sắc ký tương tác kỵ nước

Cân bằng cột sắc ký tương tác kỵ nước gel Phenyl Sepharose bằng dung dịch đệm tris-HCl pH 8,5 + ammonium sulphate 30%, tốc độ dòng 0,7ml/phút. Các phân đoạn enzyme thu được qua sắc ký trao đổi ion được thẩm tích loại muối và cân bằng với dung dịch Tris-HCl pH 8,5 có chứa ammonium sulphate 30%. Lần lượt từng phân đoạn được cho qua cột. Rửa giải protein bám trên cột bằng gradient nồng độ ammonium sulphate giảm dần từ 30%-0%. Thu các phân đoạn protein và kiểm tra hoạt tính như trong thí nghiệm 7.

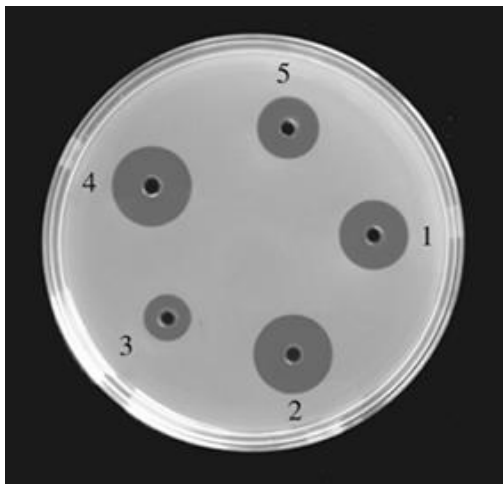
2.2 Phương pháp phân tích

Đo hoạt tính enzyme bằng phương pháp Anson cải tiến (Phạm Thị Trân Châu *et al.*, 1997) và hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford (1976). Kỹ thuật điện di trên gel SDS- PAGE (Hames, P.D, 1998).

2.3 Xử lý thống kê

Số liệu được xử lý theo chương trình thống kê Statgraphics và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Excel.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN



1- Trùn com, 2- Trùn hổ, 3 - Trùn chỉ, 4 - Trùn quắn, 5 - Trùn quế

Hình 1: Khả năng thủy phân fibrin của 5 giống trùn sau khi ủ 8 giờ ở 37°C

3.1 Đặc điểm của protease trùn quắn

3.1.1 Khả năng thủy phân fibrin của enzyme các loài trùn

- Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme trên đĩa fibrin cho thấy sau 8 giờ ủ ở 37°C, cả 5 loài trùn đều có khả năng tạo thành những vòng tròn trong suốt do fibrin bị thủy phân. Dựa vào diện tích vòng tròn thủy phân, có thể thấy khả năng thủy phân fibrin của trùn quắn khá mạnh. Mức độ hoạt tính của các loài trùn được xếp theo thứ tự sau: trùn quắn > trùn hổ > trùn com > trùn quế > trùn chỉ.

Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Nguyễn Thị Ngọc Dao (2005) về hoạt tính thủy phân fibrin của một số loài trùn đất ở Việt Nam.

Bảng 1: Kết quả đo hàm lượng protein và hoạt tính enzyme của 5 loài trùn trên casein

| Loài trùn | Com | Hổ | Chỉ | Quắn | Quế |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Hàm lượng protein (mg/gct*) | 17,72 | 19,88 | 42,97 | 13,54 | 28,30 |
| Hoạt tính đặc hiệu (U/mg) | 0,084 | 0,193 | 0,000 | 0,281 | 0,039 |

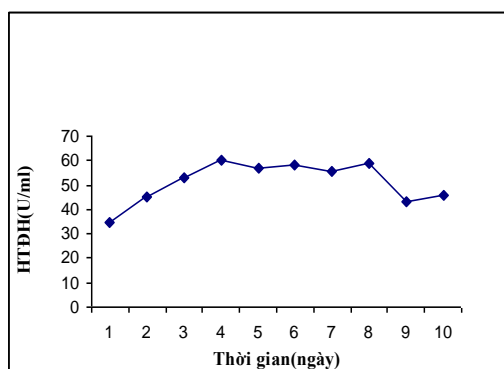
* gct: gam chất tươi

Kết quả đo hàm lượng protein và xác định hoạt tính protease trên casein cho thấy trùn quắn có hàm lượng protein thấp nhất (13,54mg/gct), trùn quế khá cao (28,30mg/gct) và cao nhất là trùn chỉ (42,97mg/gct). Nhưng hoạt tính đặc hiệu của trùn quắn lại cao nhất (0,281U/mg), kế đó là trùn hổ (0,193U/mg) và thấp nhất là trùn quế (0,039U/mg).

3.1.2 Khảo sát khả năng tự thủy phân của protease trùn quắn

Biểu đồ (Hình 2) cho thấy hoạt tính protease trong trùn quắn tăng dần trong 4 ngày đầu tự thủy phân và sau đó tương đối ổn định đến ngày thứ 8, hoạt tính enzyme giảm ở ngày thứ 9 và 10. Như vậy sau 4 ngày enzyme đã được hoạt hóa hoàn toàn

và nếu kéo dài thời gian có khả năng enzyme bị biến tính và giảm hoạt tính.



Hình 2: Biểu đồ kết quả tự thủy phân của protease trùn quắn

Kết quả này tương tự như sự tự thủy phân của protease trùn quế (Trâm & ctv 2006), dung dịch enzyme sau khi trích ly tiếp tục ủ trong khoảng một tuần thì hoạt tính protease sẽ tăng, có thể là trong quá trình ủ đã xảy ra sự tự thủy phân các tiền chất enzyme, tạo thành các phân tử enzyme có hoạt tính, tương

tự như sự hoạt hóa các enzyme trypsin, pepsin trong hệ tiêu hóa của động vật.

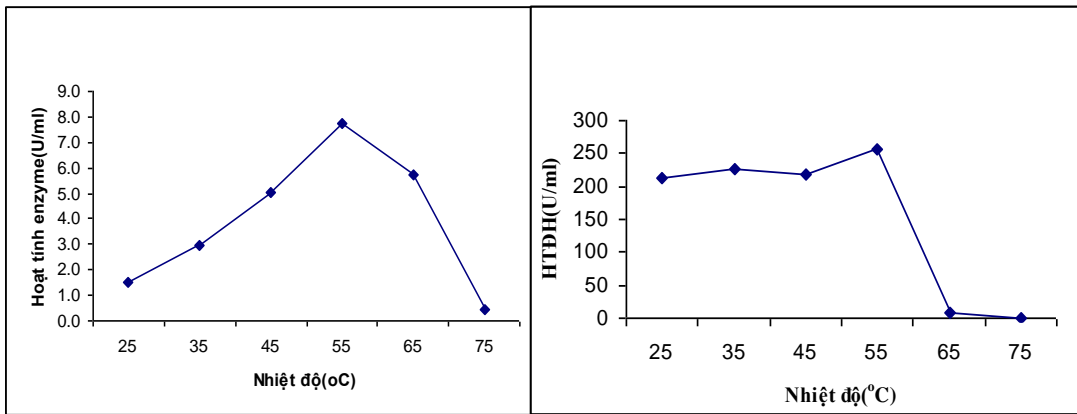
Qua thí nghiệm này nhận thấy thời gian tốt nhất cho quá trình tự thủy phân để hoạt hóa các enzyme protease trong trùn quắn là 4 ngày.

3.2 Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt tính của protease trùn quắn

3.2.1 Nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt của protease trùn quắn

Nhiệt độ tối ưu là nhiệt độ mà ở đó enzyme hoạt động mạnh nhất Biểu đồ (Hình 3) cho thấy protease trong trùn quắn hoạt động mạnh trong khoảng nhiệt độ từ 45-65°C, hoạt tính cao nhất ở 55°C, mất hoạt tính gần như hoàn toàn khi nhiệt độ tăng đến 75°C.

Trong công nghệ enzyme, việc khảo sát độ bền nhiệt của enzyme là cần thiết vì quá trình thủy phân đôi khi cần có thời gian dài và nếu enzyme bền ở nhiệt độ phòng hay nhiệt độ cao trong thời gian kéo dài thì đó là một đặc điểm vô cùng thuận lợi cho quá trình trích ly, tinh sạch và ứng dụng enzyme.

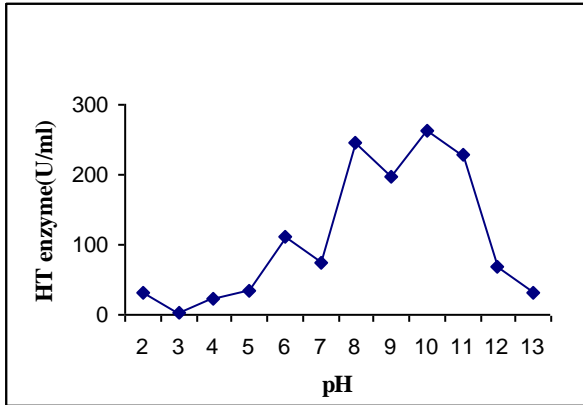


Hình 3: Biểu đồ nhiệt độ tối ưu protease trùn quắn Hình 4: Độ bền nhiệt độ protease trùn quắn

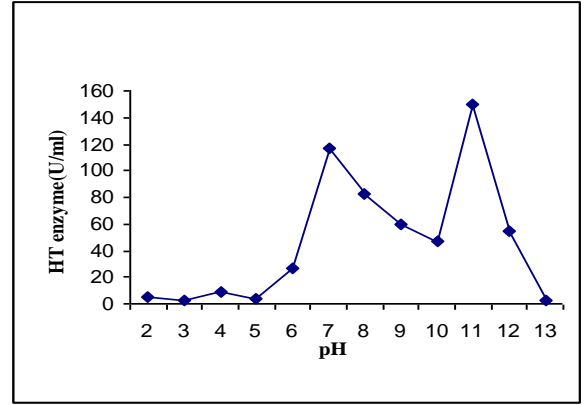
Kết quả khảo sát độ bền nhiệt, biểu đồ (Hình 4) cho thấy protease trong trùn quắn khá bền trong khoảng nhiệt độ dưới 55°C, hoạt tính bị mất gần như hoàn toàn sau 15 giờ ủ ở 65°C và không còn hoạt tính ở 75°C. Có thể thấy là nhiệt độ tối ưu và nhiệt độ bền của enzyme trùng với nhau điều này thuận lợi cho việc ứng dụng enzyme trong qui trình sản xuất .

3.2.2 pH tối ưu và độ bền pH của protease trùn quắn

Một số enzyme hoạt động mạnh ở một giá trị pH nhất định nhưng lại không bền ở giá trị pH này nếu kéo dài thời gian hoạt động của enzyme, vì vậy cần khảo sát cả hai nhân tố này để có thể có giải pháp tối ưu khi tiến hành phản ứng thủy phân. Kết quả khảo sát cho thấy protease trùn quắn có hoạt tính yếu ở pH acid và trung tính (Hình 5), hoạt tính mạnh trong khoảng từ pH 8-11 và cao nhất là ở pH 8 và pH 10.



Hình 5: Biểu đồ pH tối ưu protease trùn quắn



Hình 6: Biểu đồ độ bền pH protease trùn quắn

Tuy nhiên, kết quả khảo sát về độ bền pH (Hình 6) cho thấy protease trùn quắn không bền ở các pH từ 2-6 và pH từ 8-10. Bền ở pH trung tính: pH 7 và ở pH kiềm mạnh: pH 11. Nhận thấy là pH tối ưu của enzyme (pH 10) có khác với pH bền (pH 11) vì vậy khi tiến hành phản ứng thủy phân trong thời gian kéo dài nên lưu ý đến điểm này.

Nhìn chung các đặc điểm về nhiệt độ, pH tối ưu và độ bền nhiệt cũng như độ bền pH của protease ở trùn quắn và các loài trùn đã nghiên cứu cũng có nhiều điểm tương đồng. Các protease của các loài trùn này đều có nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt trong khoảng 55°C và hoạt động mạnh trong khoảng pH kiềm (Nguyễn Thị Xuân Uyên, 2006; II Hwan Cho, 2004) .

3.3 Tinh sạch enzyme

3.3.1 Tủa với acetone

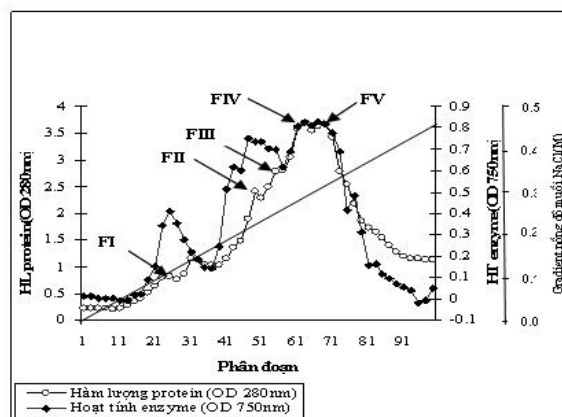
Bảng 3: Hoạt tính đặc hiệu của protease trùn quắn sau khi tủa với acetone

| Mẫu | HT enzyme (U/ml) | HL protein (mg/ml) | HTĐH(U/mg) |
|-------------------|------------------|--------------------|------------|
| Trước tủa acetone | 2,050 | 4,624 | 0,443 |
| Tủa acetone | 1,250 | 1,530 | 0,817 |

Hoạt tính đặc hiệu protease trong trùn quắn sau khi tủa với acetone tăng lên gấp 1,84 lần so với mẫu enzyme thô. Ngoài ra, hàm lượng protein đã giảm xuống sau khi tủa, chứng tỏ tủa bằng acetone đã loại bỏ được một số protein tạp nên làm tăng hoạt tính đặc hiệu của enzyme trong trùn quắn. Vì vậy tủa bằng acetone là phương pháp hiệu quả đối với việc tinh sạch sơ bộ protease từ trùn quắn.

3.3.2 Sắc ký trao đổi ion

Cặn tủa acetone được hòa tan trở lại trong dung dịch đệm tris-HCl pH 8,5 và tiếp tục tinh sạch qua cột sắc ký trao đổi ion Unosphere Q. Các protein của dung dịch enzym thô được phân tách thành 6 phân đoạn (Hình 7) trong đó có 5 phân đoạn có hoạt tính protease được ký hiệu là FI, FII, FIII, FIV, và FV.



Hình 7: Phổ sắc ký trao đổi ion trên cột Unosphere Q enzyme thô

Bảng 4: Hàm lượng protein và hoạt tính enzyme ở các phân đoạn chạy qua cột sắc ký trao đổi ion

| Phân đoạn | Hoạt tính tổng enzyme (U) | HL protein tổng(mg) | HTĐH (U/mg) | % protein thu hồi(%) | Độ tinh sạch |
|-----------|---------------------------|---------------------|-------------|----------------------|--------------|
| SK | 68,8 | 254,3 | 0,270 | 1,00 | 1 |
| FI | 1,44 | 1,946 | 0,742 | 2,09 | 2,74 |
| FII | 2,12 | 2,216 | 0,957 | 3,08 | 3,54 |
| FIII | 5,5 | 5,223 | 1,053 | 7,99 | 3,89 |
| FIV | 2,87 | 0,993 | 2,892 | 4,17 | 10,69 |
| FV | 20,7 | 6,613 | 3,124 | 30,03 | 11,55 |

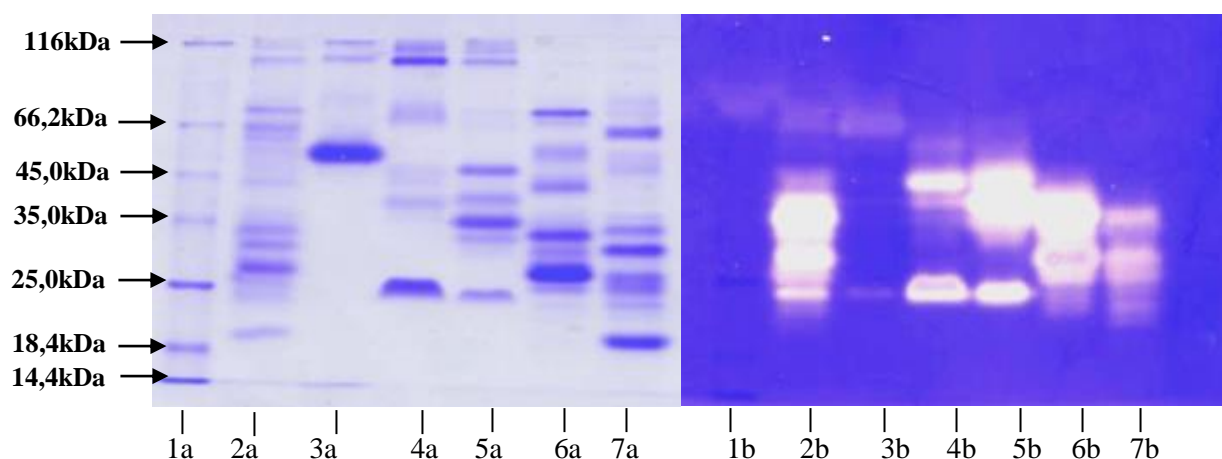
* SK : mẫu trước khi qua cột sắc ký.

Độ tinh sạch của các phân đoạn enzyme sau khi qua cột sắc ký trao đổi ion đều tăng và hoạt tính của các phân đoạn được sắp theo thứ tự FV>FIV>FIII>FII>FI. Tổng hoạt tính của các phân đoạn protease thu được chiếm 47,42% hoạt tính tổng. Phân đoạn FV có hoạt tính cao nhất chiếm 30,08% hoạt tính tổng. Các phân đoạn FI, FII, FIII, FIV, FV được rửa giải lần lượt ở các nồng độ muối 0,11; 0,22; 0,25; 0,28; 0,31 M NaCl tương ứng.

So sánh với nghiên cứu tinh sạch protease trùn quế (*Perionyx excavatus*) (Nguyễn Thị Xuân Uyên, 2006) dung dịch trùn quế thô qua cột trao đổi ion gồm 4 phân đoạn có hoạt tính được rửa giải ở nồng độ muối NaCl từ 0,22-0,35M cao hơn so với trùn quế là 0,11-0,31 M NaCl, nên nếu thay đổi gradient nồng độ muối thấp hơn thì khả năng tách sẽ tốt hơn các phân đoạn đối với trùn quế khi qua cột trao đổi ion.

Phổ điện di nhuộm hoạt tính (Hình 8) thể hiện hoạt tính protease của các phân đoạn sau khi qua cột trao đổi ion. Trong phân đoạn FI (giếng 3) có một băng protein thể hiện hoạt tính với trọng lượng phân tử là 58,3kDa. Trong phân đoạn FII (giếng 4) có 2 băng protein có hoạt tính với trọng lượng phân tử 25,5kDa và 46,7kDa. Phân đoạn FIII (giếng 5) có 3 băng protein thể hiện rõ hoạt tính với trọng lượng là 24,1kDa ; 39kDa ; 47,2kDa. Trong phân đoạn FIV (giếng 6) có 2 băng protein thể hiện rõ hoạt tính với trọng lượng là 27,4kDa; 33,3kDa. Phân đoạn FV (giếng 7) có 3 băng protein có hoạt tính với trọng lượng lần lượt là 24kDa, 26kDa; và 31,8kDa. Kết quả này cho thấy thành phần protease trùn quế phức tạp hơn so

với protease trùn *Lumbricus rubellus* (Cho I., 2004), và protease trùn quế *Perionyx excavatus* (Uyên, 2006) với 4 phân đoạn enzyme gồm 7 băng protein thể hiện hoạt tính với casein có trọng lượng phân tử từ 15,8 đến 44,6kDa.



Hình 8 : Phổ điện di SDS-PAGE nhuộm hoạt tính các phân đoạn protein sau khi qua cột trao đổi ion (không có β -mercaptoethanol)

Giếng: 1a, 1b. Protein chuẩn ; 2a, 2b. Mẫu enzyme thô sau khi tủa acetone ; 3a, 3b. Phân đoạn FI; 4a, 4b. Phân đoạn FII; 5a, 5b. Phân đoạn FIII; 6a, 6b. Phân đoạn FIV; 7a, 7b. Phân đoạn FV

3.3.3 Sắc ký tương tác kỵ nước các phân đoạn FI, FII, FIII, FIV và FV

Do các phân đoạn protease nhận được sau khi qua cột trao đổi ion chưa được tinh sạch hoàn toàn nên chúng được tiếp tục cho qua cột tương tác kỵ nước Phenyl Sepharose.

(a) Phân đoạn FI

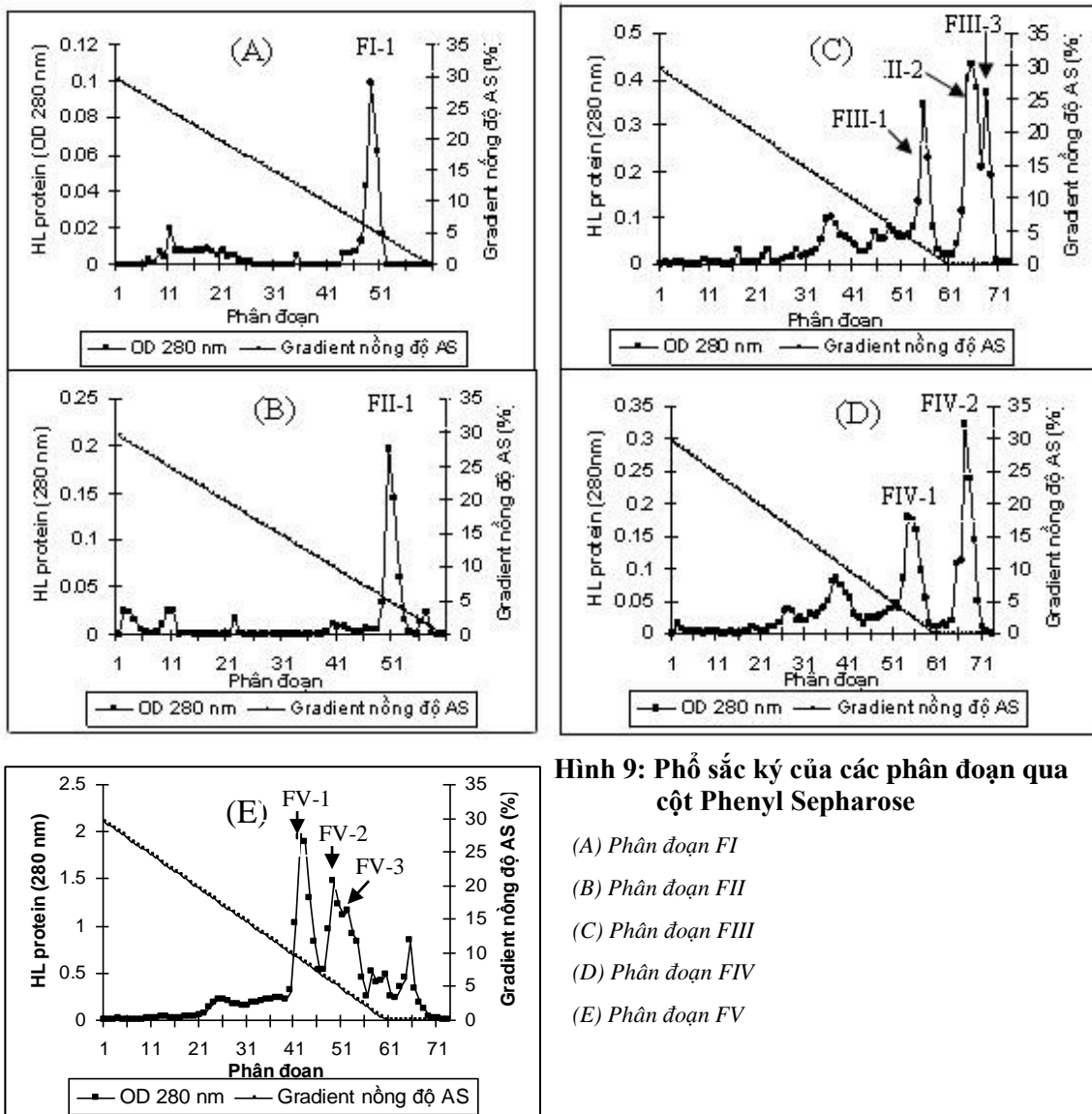
Phổ sắc ký của phân đoạn FI (Hình 9-A) chỉ có một đỉnh protein (FI-1) với hoạt tính là 1,559(U/mg). Phân đoạn này được rửa giải ở nồng độ 5,5% ammonium sulfate bão hoà. Kết quả so sánh với gel nhuộm hoạt tính (giếng 2, hình 8) cho thấy phân đoạn FI có thể hoàn toàn tinh sạch được sau khi qua gel tương tác kỵ nước Phenyl Sepharose.

(b) Phân đoạn FII

Phân đoạn FII cũng chỉ 1 đỉnh protein (FII-1) (Hình 9-B) là có hoạt tính (1,222U/mg) và được rửa giải ở nồng độ 5% ammonium sulfate bão hoà. Trên điện di SDS-PAGE với sự hiện diện của chất khử là β -mercaptoethanol phân đoạn enzyme này có trọng lượng phân tử là 25,5kDa. Băng enzyme với trọng lượng phân tử 45,5kDa như trong gel nhuộm hoạt tính không tìm thấy. Có khả năng đây là dạng dimer do hiện tượng kết dính của hai phân tử enzyme qua các cầu nối disulfit, trong điện di nhuộm hoạt tính do không có chất khử nên có thể phát hiện được.

(c) Phân đoạn FIII

Phổ sắc ký của phân đoạn FIII khá phức tạp, có tất cả thành 6 đỉnh protein (Hình 9-C), trong đó chỉ có 3 đỉnh có hoạt tính cao FIII-1 (1,667 U/mg), FIII-2 (2,041 U/mg), FIII-3 (1,375 U/mg) và được rửa giải ở nồng độ 2,5%, và 0% ammonium sulfate bão hoà. Các phân đoạn protease này cũng tương ứng với thành phần protease trên gel nhuộm hoạt tính (giếng 4, Hình 8)



Hình 9: Phổ sắc ký của các phân đoạn qua cột Phenyl Sepharose

- (A) Phân đoạn FI
- (B) Phân đoạn FII
- (C) Phân đoạn FIII
- (D) Phân đoạn FIV
- (E) Phân đoạn FV

(d) Phân đoạn FIV

Phân đoạn FIV trên cột tương tác kỵ nước có 3 đỉnh protein khác nhau (Hình 9-D), trong đó chỉ có 2 đỉnh có hoạt tính là FIV-1 (0,802 U/mg), FIV-2 (1,343 U/mg), được rửa giải ở nồng độ 2,5% và 0,0% ammonium sulfate bão hoà.

(e) Phân đoạn FV

Tương tự như phân đoạn F3, phân đoạn FV có 6 đỉnh protein (Hình 9-E), trong đó chỉ có 3 đỉnh là có hoạt tính FV-1 (0,705 U/mg), FV-2 (0,903 U/mg), FV-3 (0,843 U/mg) và được rửa giải ở nồng độ tương ứng là 9%, 5,5%, 4% ammonium sulfate bão hòa.

Có thể thấy các phân đoạn enzyme nhận được qua sắc ký trao đổi ion đã được phân tách tiếp tục trên cột sắc kí tương tác kỵ nước, và các thành phần enzyme này tương ứng với kết quả điện di nhuộm hoạt tính trên SDS-PAGE. Tuy nhiên, các phân đoạn enzyme được rửa giải ở các nồng độ muối bão hòa khá thấp, cao nhất ở 9% và thấp nhất ở 0%. Đây cũng là một điểm khác biệt của các protease trùn quắn

so với trùn quế về mức độ tương tác trên gel Phenyl Sepharose. Các protease trùn quế được rửa giải ở nồng độ muối bão hòa cao hơn từ 17,3-6,6%.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Để có dung dịch enzyme với hoạt tính tối đa cần thiết phải tiến hành quá trình tự thủy phân protease của trùn quế trong 4 ngày.

Nhiệt độ và PH tối ưu cho protease trùn quế hoạt động là 55°C và pH 10. Protease trùn quế bền ở các pH 7 và pH 11 và hoạt động ổn định trong khoảng nhiệt độ từ 25-55°C.

Tủa acetone kết hợp với sắc ký trao đổi ion và sắc ký tương tác kỵ nước có thể tinh sạch được các thành phần protease trong trùn quế, có tất cả khoảng 10 phân đoạn enzyme khác nhau với trọng lượng phân tử từ 24,0 kDa đến 58,3 kDa.

Trong các nghiên cứu sau này cần khảo sát cụ thể một số tính chất của từng phân đoạn enzyme như nhiệt độ và pH tối ưu. Khảo sát cơ chế hoạt động của enzyme qua ảnh hưởng của các chất ức chế. So sánh hoạt tính trên đĩa fibrin, chọn ra phân đoạn enzyme có hoạt tính mạnh và độ tinh sạch cao để có thể ứng dụng trong y dược học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cho, I.H., Choi, E.S., Lim,H.G.,and Lee,H.H. Purification and Characterization of Six Fibrinolytic Serine-Protease from earth worm *Lumbricus rubellus*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 37(2), 199-205 (2004)
- Feng Wang, Chao Wang, 2005. Crystal Structure of Earthworm Fibrinolytic Enzym. Component B: A novel, Glycosylated Two-chained Trysin. Journal of molecular biology. Vol 4. pp 671-685.
- Dương Thị Hương Giang, 2006. Bài giảng enzyme học. Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh Học. Đại học Cần Thơ.
- Mihara, H., Nakajima, N. and Sumi, H. Characterization of protein fibrinolytic enzyme in earthworm, *Lumbricus rubellus*. Biosci, Biotechnol, Biochem, 57, 1726-1730, (1993).
- Lý thị Bích Thủy, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Thị Ngọc Dao, 2002. Hoạt tính thủy phân fibrin của enzyme tách từ một số loài giun đất Việt nam. Báo cáo tổng kết đề tài năm 2002.
- Nguyễn Đức Bách *et al.* Tách dòng gen mã hóa enzyme Lumbrokinase từ loài giun quế của Việt Nam (*Perionyx excavatus*). Báo cáo hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà nội (2003).
- Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thị Hiền, Phùng Gia Tường (1997). Thực hành Sinh Hóa. NXB Giáo dục.
- Phan Thị Bích Trâm, Dương Thị Hương Giang, Hà Thanh Toàn và Phạm Thị Ánh Hồng (2006). Nghiên cứu chiết tách và tinh sạch Protease từ Trùn quế ». Hội Nghị Khoa Học lần Thứ 5 – Tóm tắt nội dung báo cáo khoa học, trường Đại học Khoa học Tự Nhiên Thành Phố Hồ Chí Minh.
- Trần Thị Xuân Uyên (2006) Nghiên cứu enzyme protease từ trùn quế. Luận văn tốt nghiệp đại học chuyên ngành Công nghệ sinh học, trường Đại học Cần Thơ.
- Xiu-xia LIANG & et al. Enzymological characterization of FIIa, a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom. Acta Pharmacologica Sinica, 26(12), 1474-1478, (2005).