



NGHIÊN CỨU TINH SẠCH CÁC ENZIM PROTEASE TỪ MŨ ĐU ĐỦ (*Carica papaya*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LÔNG

Nguyễn Thị Hà¹

¹ Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 03/08/2014

Ngày chấp nhận: 09/06/2015

Title:

Purification of enzyme proteases from papaya (*Carica papaya*) latex by liquid chromatography

Từ khóa:

Enzim protease, Sắc ký trao đổi ion, sắc ký tương tác kỵ nước

Keywords:

Proteases, papaya latex, Ion-exchange chromatography, Hydrophobic interaction chromatography

ABSTRACT

Enzyme proteases with high yield and activity could be extracted from the latex of the papaya fruits of 8-10 weeks maturity. Ion-exchange chromatography on gel SP-Streamline in combination with Hydrophobic Interaction Chromatography on gel Phenyl Sapharose could be applied to obtain one of the enzyme components in papaya latex with high purity. The advantages of the procedures were producing a wide range of enzyme without spending many stages of Preliminary precipitation with organic solvents: ammonium sulfat, acetone and ethanol. As a result, enzyme would be more purified and environmentally friendly. In addition, papain sources was various and gel could be reused. So, the price was lower compared to commercial papain. However, because enzyme concentration was very diluted, it was better to combine ultrafilter to separate salt. Treating enzyme solution with 2-PDS before throughout ion exchange chromatography column could prevent enzyme from autolyzing during the process of purification of enzyme.

TÓM TẮT

Mủ đu đủ được thu hoạch từ trái trong khoảng từ 8-10 tuần tuổi để thu được enzyme protease với hoạt tính và hiệu suất cao. Sắc ký trao đổi ion với giá thể gel SP-Streamline kết hợp với sắc ký tương tác kỵ nước với giá thể gel Phenil-Sepharoz có thể tinh sạch được một trong các thành phần enzyme trong mủ đu đủ. Thuận lợi của quy trình tinh sạch là có thể sản xuất nhiều mà không cần phải qua nhiều công đoạn như tủa bằng ammonium sulfat hay bằng cồn, sản phẩm tinh sạch hơn và không gây ô nhiễm môi trường. Thêm vào đó, do nguồn papain dồi dào, gel dùng để chạy sắc ký có thể tái sử dụng nhiều lần, vì vậy giá thành thấp hơn papain thương mại. Tuy nhiên phương pháp này khó tách rửa enzyme có hàm lượng lớn và phải sử dụng một lượng lớn dung dịch đệm để tách rửa nên nồng độ enzyme thu được sau khi qua cột rất loãng, có thể nên kết hợp sử dụng phương pháp siêu lọc để tách muối đồng thời có hoạt tính enzyme tốt hơn. Xử lý dung dịch enzyme với 2-PDS trước khi cho qua cột sắc ký trao đổi ion có thể bảo vệ enzyme tránh tình trạng tự phân giải trong quá trình tinh sạch.

1 GIỚI THIỆU

Papain được trích ly từ mủ trái đu đủ *Carica papaya* và được ứng dụng phổ biến trong công

nghệ chế biến thực phẩm, trong công nghiệp hóa chất, bảo chế dược phẩm, kỹ nghệ tơ sợi dệt may và trong công nghiệp thuộc da (Phan Xi Păng,

2002). Thành phần enzym của papain thu được từ trái đu đủ xanh khá phức tạp và không đồng nhất, dùng phương pháp kết tủa bằng muối ammonium sulfat hay trích ly bằng cồn (Nguyễn Đức Lương, 2002), cho sản phẩm thô có hoạt tính không cao. Tinh sạch bằng phương pháp sắc ký lỏng trên các giá thể khác nhau như cột trao đổi ion, cột sắc ký ái lực hấp phụ hay cột sắc ký tương tác kỵ nước (Zucker và ctv. 1984, Dekeyser và ctv. 1994) có thể tinh sạch các enzym từ mù đu đủ.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Mù đu đủ

2.2 Phương pháp

– Sắc ký trao đổi ion

Trong phương pháp này sự phân tách dựa vào nguyên lý tương tác của các điện tích trên bề mặt của phân tử protein trong dung dịch với các nhóm trao đổi ion (nhóm mang điện tích) trên chất rắn (giá thể) ở các mức độ khác nhau. Có hai loại giá thể dùng trong sắc ký trao đổi ion: Chất trao đổi ion âm (anion exchanger) là những chất mang nhóm điện tích dương (+) sẽ tương tác với các ion âm (-). Ngược lại, chất trao đổi ion dương (cation exchanger) là những chất mang nhóm điện tích âm (-) sẽ tương tác với các ion dương (+). Trong quá trình sắc ký, các phân tử protein trong dung dịch sẽ liên kết trao đổi ion thuận nghịch với giá thể. Các protein không bám sẽ đi ra trước theo dòng dung dịch đậm, các protein tạo liên kết ion bám lại trên giá thể sẽ được rửa giải hoặc bằng dung dịch đậm với gradien nồng độ muối hoặc gradien pH tăng dần (continuous gradient) hay tuần tự được rửa giải bằng các dung dịch đậm có nồng độ muối hay pH khác nhau (stepwise).

Các protein sẽ được đẩy ra tuần tự dựa vào mức độ tích điện của protein, nói một cách khác dựa vào sự tương tác mạnh hay yếu giữa protein và giá thể. Các protein có độ tích điện thấp, mức độ tương tác yếu sẽ được đẩy ra trước. Các protein có độ tích điện cao, mức độ tương tác mạnh hơn sẽ được đẩy ra sau.

– Sắc ký ái lực hấp phụ (Affinity chromatography - AC)

Sắc ký ái lực hấp phụ được thực hiện dựa trên nguyên lý tương tác đặc hiệu thuận nghịch giữa protein cần tinh sạch trong hỗn hợp với nhóm chức năng của giá thể. Các tương tác đặc hiệu có thể là tương tác giữa enzym - cơ chất, enzym-chất ức chế, kháng nguyên - kháng thể, DNA-protein... Phương

pháp này dùng để phân tích rất hiệu quả khi hàm lượng protein cần phân tách trong hỗn hợp có ở hàm lượng rất thấp. Các protein bám lại trên giá thể có thể rửa giải bằng nhiều cách như thay đổi pH, nồng độ muối hay dùng chất cạnh tranh, do có cùng bản chất với nhóm chức năng của giá thể, chất cạnh tranh sẽ đẩy protein tách khỏi giá thể.

– Sắc ký tương tác kỵ nước (Hydrophobic Interaction Chromatography -HIC)

Sắc ký tương tác kỵ nước được thực hiện dựa trên nguyên lý tương tác kỵ nước giữa các nhóm kỵ nước trên bề mặt của protein cần phân tách với các nhóm kỵ nước trên giá thể sử dụng. Dung dịch protein trong môi trường nước sẽ được bao quanh bởi một lớp áo nước do các nhóm ưa nước hydrophobic hướng ra ngoài và tạo liên kết hydro với các phân tử nước, các gốc kỵ nước hydrophilic sẽ hướng vào trong. Trong môi trường có nồng độ muối cao, phân tử protein bị mất lớp áo nước bao quanh, các nhóm kỵ nước lộ ra bên ngoài và sẽ tương tác với các gốc kỵ nước của giá thể. Protein bám lại trên giá thể sẽ được rửa giải bằng cách dùng gradien nồng độ muối giảm dần hay dùng gradien nồng độ tăng dần của chất hữu cơ như ethylen glycol (50-80%), trong thực nghiệm thường người ta phối hợp cả hai gradien này để rửa giải hết các protein bám trên cột.

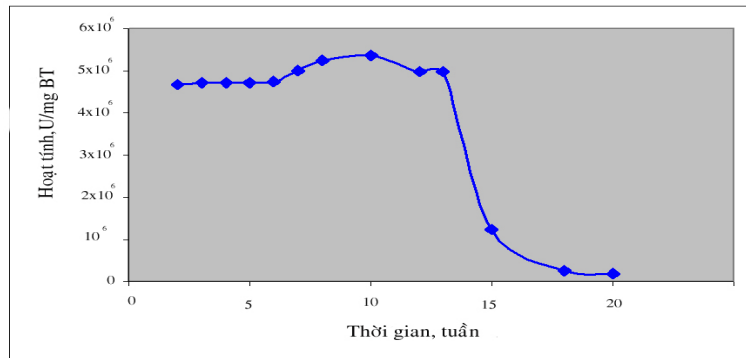
– Sắc ký lọc gel hay sắc ký rây phân tử (Gel filtration hay Size Exclusion Chromatography)

Phương pháp sắc ký lọc gel dùng để phân tách protein dựa vào khả năng khác nhau về kích thước phân tử của chúng. Nguyên lý của sắc ký lọc gel là dựa trên sự phân bố của protein giữa dung môi tự do và dung môi nằm trong các lỗ của các hạt. Dung môi tự do là pha động, còn dung môi nằm trong các lỗ là pha tĩnh. Mức độ khuếch tán của phân tử chất tan phụ thuộc chủ yếu vào kích thước và cấu hình của chúng. Gel là các hạt xốp có cấu trúc mạng lưới không gian ba chiều khâu ghép hờ tạo các lỗ hổng bên trong hạt. Các lỗ này có kích thước không cho các phân tử lớn chui lọt, chúng chỉ có thể khuếch tán vào các kẽ hở giữa các hạt và do đó bị rửa ra khỏi cột rất sớm, trong khi đó các phân tử bé hơn có khả năng xâm nhập vào lỗ. Khi dòng pha động liên tục đi qua, các phân tử nhỏ lại ra khỏi các lỗ và di chuyển cùng pha động và như vậy ta sẽ tách được từng phân đoạn các phân tử có kích thước phân tử khác nhau, lớn ra trước, nhỏ ra sau. Tùy theo trọng lượng phân tử của chất cần phân tách mà các loại gel có kích thước lỗ khác nhau sẽ được sử dụng.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khảo sát hoạt tính của enzym papain theo thời gian tăng trưởng của trái đu đủ

Mủ đu đủ thu được trên trái từ 2-20 tuần tuổi,



Hình 1: Biến đổi hoạt tính của enzym trong quá trình tăng trưởng của trái đu đủ

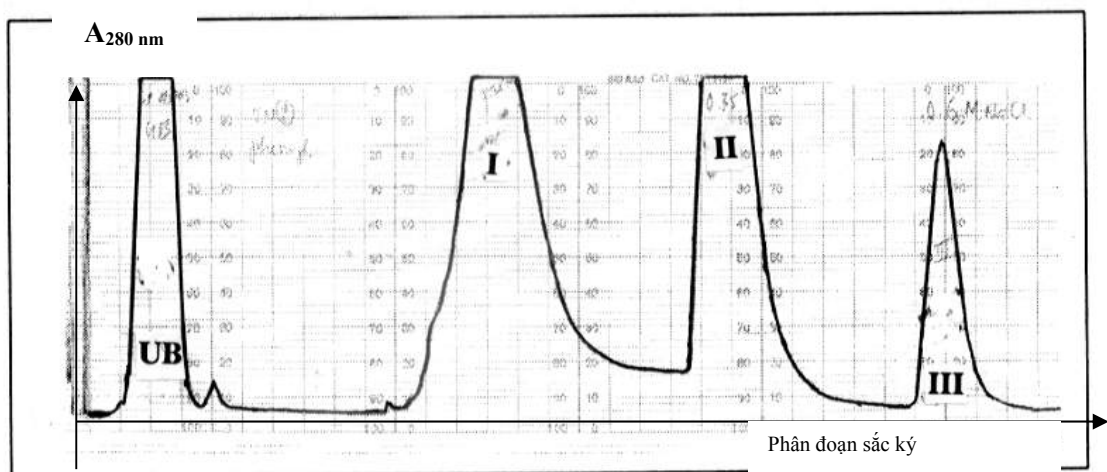
Kết quả ở Hình 1 cho thấy ở trái hai tuần tuổi hoạt tính của enzym papain trong mủ đã cao tuy nhiên do trái lúc này còn nhỏ lượng mủ rất ít. Hoạt tính enzym tăng dần và cao nhất khi trái đu đủ 10 tuần tuổi. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Đức Lương (2000) sử dụng phương pháp kết tủa với cồn 70°. Papain thu được có hoạt tính cao nhất khi trái ở giai đoạn 10 tuần tuổi.

3.2 Sắc ký trao đổi ion trên cột SP-Streamline

Dung dịch enzym trích ly từ mủ đu đủ được xử

trích ly enzym bằng nước cất với tỉ lệ 1 :10 :w :v và xác định hoạt tính theo phương pháp Kunitz cải tiến với cơ chất là casein (Kunitz, 1947), kết quả nhận được như ở Hình 1.

lý với 2-PDS sau khi qua cột sắc ký với giá thể trao đổi ion SP-Streamline. Kết quả cho thấy tính đa dạng của thành phần các enzym trong mủ đu đủ (Hình 2). Các protein được phân tách thành bốn phân đoạn, phân đoạn UB là các protein không bám trên giá thể, phân đoạn này không có hoạt tính enzym và lượng protein rất ít. Các phân đoạn I, II và III được rửa giải với các dung dịch đệm với nồng độ muối tương ứng là 0.25M, 0.35M và 0.6M NaCl.



Hình 2: Sắc ký dò của dung dịch enzym papain trích ly từ mủ đu đủ được xử lý với 2-PDS trên cột SP-Streamline, dung dịch đệm ammonium acetat 0.1M, pH 5.0 có chứa 5mM EDTA và 0.5mM phenylmercuric acetat

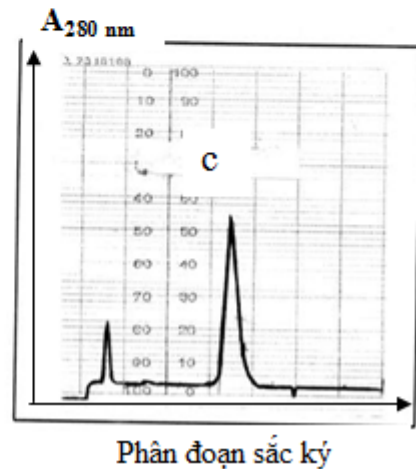
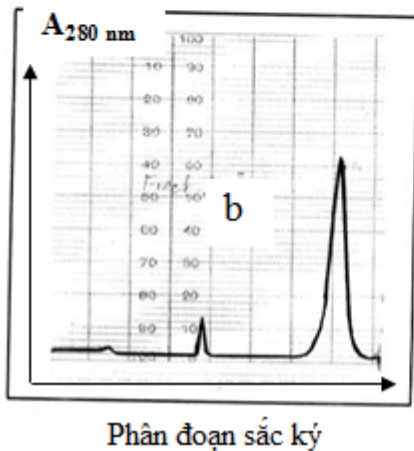
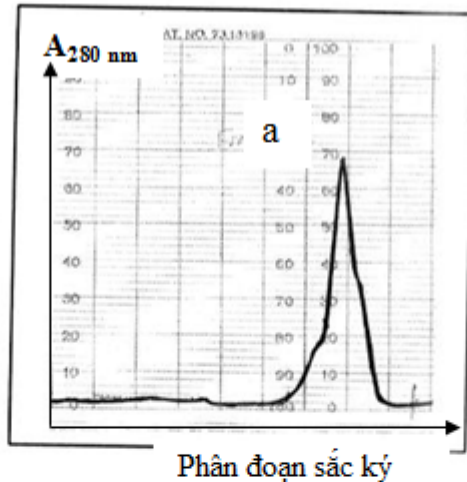
Ghi chú: UB: phân đoạn protein không bám trên giá thể. I: phân đoạn 0.25M NaCl. II: phân đoạn 0.35M NaCl. III: phân đoạn 0.6M NaCl

Kết quả này tương tự như kết quả của Dekeyser (1994) với giá thể trao đổi ion là Mono S 5/5. Phân đoạn I ứng với enzym papain với hàm lượng thấp chỉ khoảng 11% tổng protein, phân đoạn II ứng với enzym chymopapain chiếm phần lớn trong tổng protein, khoảng 60% ; trong phân đoạn này có lẫn enzym papaya proteinaz IV. Phân đoạn III ứng với enzym papaya proteinaz III, chiếm

29% trong protein tổng số.

3.3 Sắc ký ái lực hấp thụ với giá thể là gel Bacitracin-Eupergit C

Do các phân đoạn protein nhận được sau khi qua cột trao đổi ion còn khá phức tạp. Để tách các enzym ra khỏi các protein tạp, dùng phương pháp sắc ký ái lực hấp thụ với giá thể là gel Bacitracin-Eupergit C.



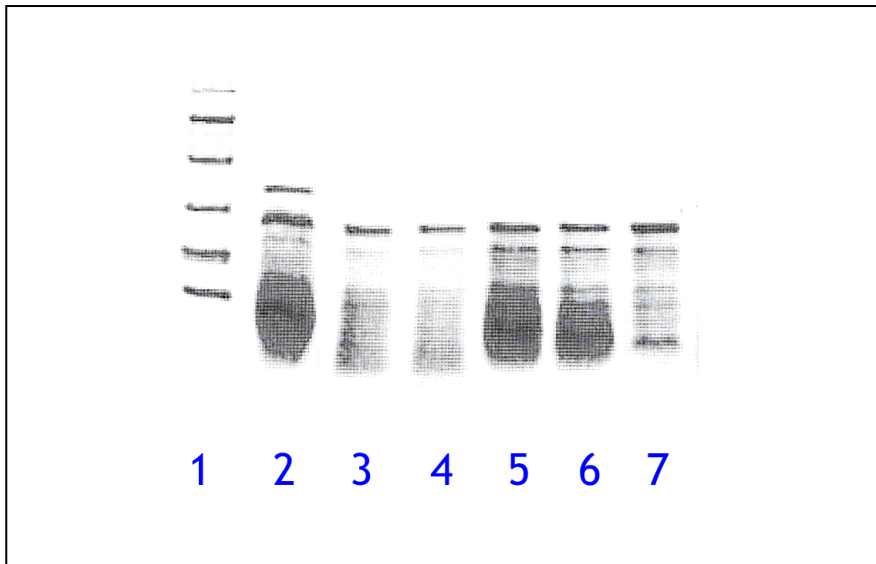
Hình 3: Sắc ký đồ của các phân đoạn enzym papain trên cột sắc ký Bacitracin-Eupergit C

Chú thích. a: phân đoạn I, 0.25M NaCl. b: Phân đoạn II, 0.35M NaCl. c: phân đoạn III, 0.6M NaCl.

Các phân đoạn enzym I, II, III nhận được qua cột sắc ký trao đổi ion được tiếp tục cho qua cột sắc ký ái lực hấp thụ Bacitracin-Eupergit C.

Kết quả trên sắc ký đồ cho thấy cả ba phân đoạn sau khi qua cột ái lực hấp thụ bacitracin-Eupergit đều cho một phân đoạn duy nhất (Hình 3), tương tự như kết quả nhận được của Stepanov

(1983). Tuy nhiên, khi phân tích điện di trên gel SDS-PAGE (Laemmli, 1970) cho thấy enzym chưa tách được ra khỏi các protein tạp (Hình 4), các protein tạp lẫn enzym trong phân đoạn đều bám vào giá thể và được rửa giải cùng một lúc. Có thể do tính đặc hiệu của Bacitracin không cao để có thể tách được các enzym ra khỏi hỗn hợp.



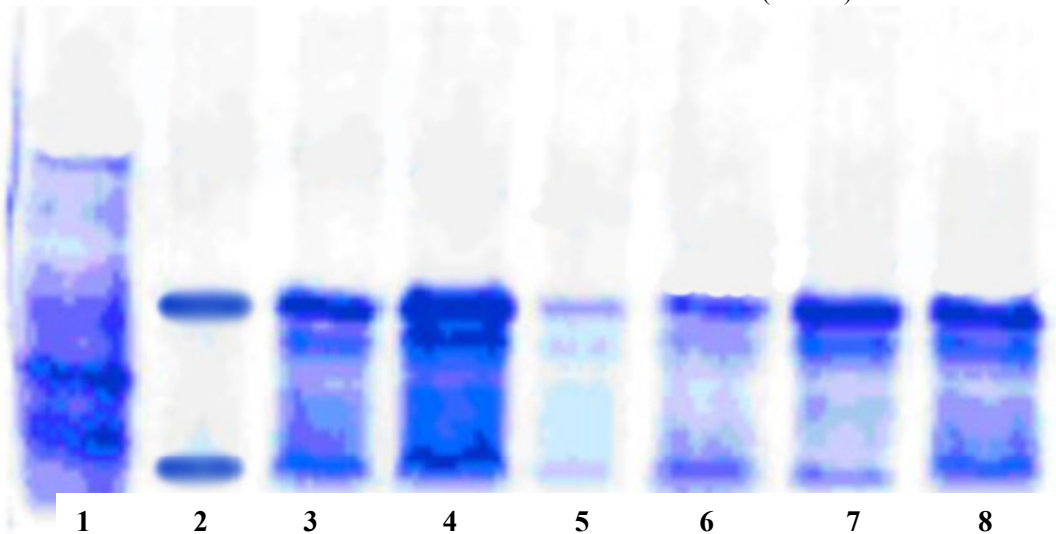
Hình 4: Điện di đồ các phân đoạn enzym papain nhận được sau khi qua cột sắc ký Bacitracin-Eupergit C

Chú thích: 1: protein chuẩn. 2, 9 và 10: phân đoạn 0.6M NaCl. 3 và 4: phân đoạn 0.25M NaCl. 5, 6, 7 và 8: phân đoạn 0.35M NaCl.

3.4 Sắc ký lọc gel với giá thể gel Sephadex G25

Theo Kyden (1998) có khả năng các protein tạp là sản phẩm phân giải của enzym có mang nhóm –SH tự do trong phân tử sẽ liên kết với enzym qua các cầu nối disulfit, vì vậy các phân đoạn enzym sẽ được xử lý trước với hợp chất có tính khử là Dithiothreitol để phá vỡ các cầu nối disulfit này và

sau đó cho qua cột sắc ký lọc gel nhằm tách các protein có khối lượng phân tử thấp. Tuy nhiên, kết quả nhận được trên sắc ký lọc gel cũng chỉ có một phân đoạn protein duy nhất, điện di trên gel SDS-PAGE cho thấy là các enzym vẫn chưa tách được ra khỏi các protein tạp. Các dải băng protein khối lượng phân tử thấp vẫn hiện diện trong phân đoạn có chứa enzym (Hình 5).



Hình 5: Điện di đồ các phân đoạn enzym nhận được sau khi qua cột sắc ký Sephadex G 25

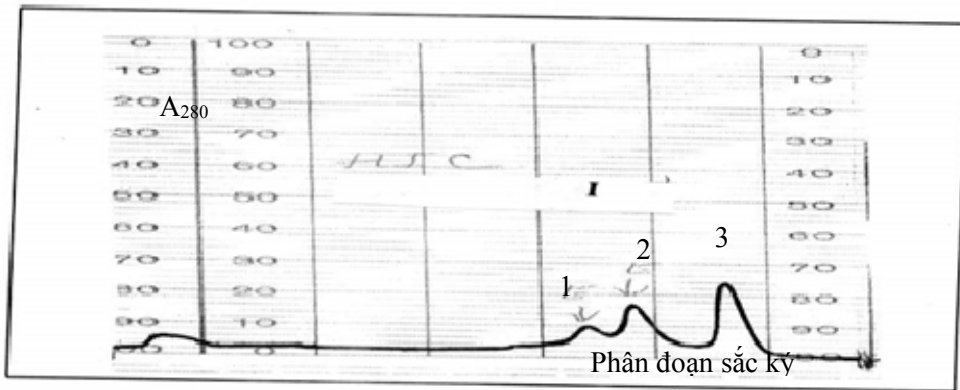
Chú thích: 1. protein chuẩn. 2, 3 và 4: phân đoạn 0.25M NaCl. 5 và 6: phân đoạn 0.35M NaCl. 7 và 8: phân đoạn 0.6M NaCl

3.5 Sắc ký tương tác kỵ nước với giá thể Phenil –Sepharoz

Do các phương pháp như trên không đạt hiệu quả trong việc tinh sạch enzym, cần có một phương pháp thích hợp và đặc hiệu để có thể tách được enzym ra khỏi hỗn hợp, phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước với giá thể là Phenil –Sepharoz đã được áp dụng. Dung dịch enzym sau khi qua cột sắc ký tương tác kỵ nước, các protein bám vào giá thể được rửa giải bằng các gradien nồng độ muối khác nhau.

3.5.1 Rửa giải protein với nồng độ muối từ 1.0M-0.0M ammonium sulfat

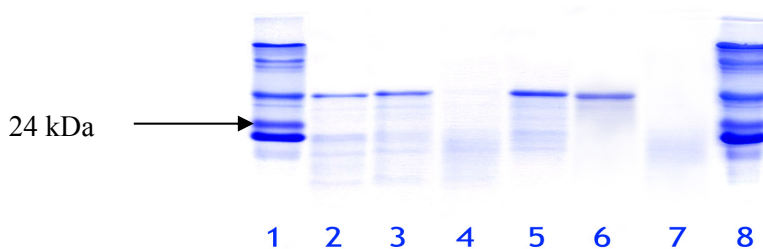
Phân đoạn 0.35M NaCl thu được sau khi qua cột SP-Streamline, là phân đoạn có chứa enzym chymopapain và papaya proteinaz III, được cho qua cột sắc ký tương tác kỵ nước Phenil –Sepharoz với nồng độ ammonium sulfat ban đầu trong dung dịch protein là 1,0M. Các protein bám lại trên giá thể được rửa giải với gradien nồng độ muối giảm dần từ 1.0-0.0M ammonium sulfat. Qua sắc ký đồ (Hình 6) nhận thấy có 3 phân đoạn protein được tách ra, trong đó phân đoạn 1 và 2 có hoạt tính enzym.



Hình 6: Sắc ký đồ phân đoạn 0.35M NaCl qua cột Phenil –Sepharoz, gradien nồng độ ammonium sulfat 1.0M-0.0M

Tuy nhiên, kết quả điện di trên gel SDS-PAGE (Hình 7) cho thấy trong các phân đoạn enzym vẫn còn lẫn protein tạp. Có thể muối ammonium sulfat

ở nồng độ 1.0M chưa đủ cao để tách lớp áo nước của phân tử enzym và đưa các phần có tính kỵ nước của phân tử enzym ra bên ngoài.



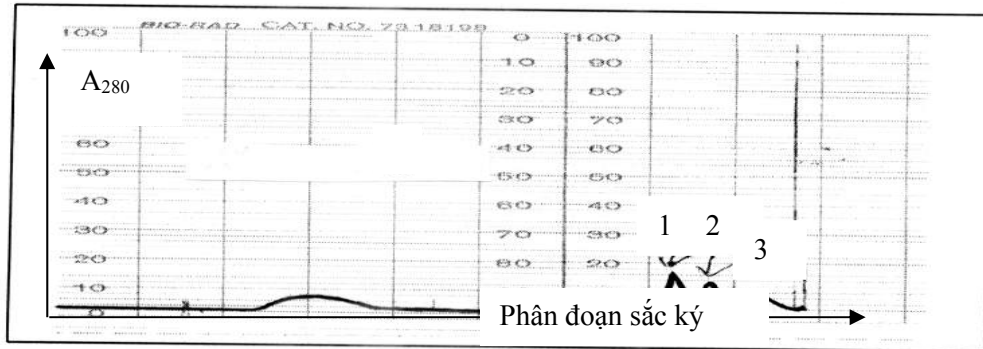
Hình 7: Điện di đồ phân đoạn 0.35M NaCl qua cột Phenil –Sepharoz, gradien nồng độ ammonium sulfat 1.0M-0.0M

Chú thích: 1 và 8: protein chuẩn. 2 và 5: phân đoạn 1. 3 và 6: phân đoạn 2. 4 và 7: phân đoạn 3

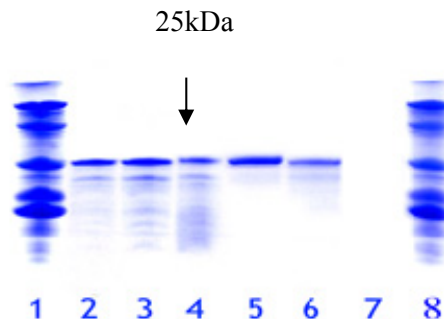
3.5.2 Rửa giải protein với gradien nồng độ muối ammonium sulfat từ 1.5-0.0M.

Kết quả trên sắc ký đồ (Hình 8) cho thấy khi tăng nồng độ muối đến 1.5M ammonium sulfat

trong dung dịch protein trước khi qua cột và rửa giải protein với gradien Ammonium sulfat từ 1,5-0,0M, thành phần protein sau khi qua cột HIC cũng phân tách thành 3 phân đoạn.



Hình 8: Sắc ký đồ phân đoạn 0.35M NaCl qua cột Phenil–Sephroz với gradien (NH₄)₂SO₄ từ 1.5M-0.0M



Hình 9: Điện di đồ phân đoạn 0.35M NaCl qua cột Phenil–Sephroz, với gradien nồng độ ammonium sulfat 1.5M-0.0M

Chú thích: 1 và 8: protein chuẩn. 2,3 và 4: phân đoạn 0.35M NaCl trước khi qua cột HIC. 5: phân đoạn 1. 6: phân đoạn 2. 7: phân đoạn 3

Kết quả điện di trên gel SDS-PAGE cho thấy enzym trong trường hợp này đã được tinh sạch, trên điện di đồ (Hình 9, cột 5) chỉ có một băng protein.

Như vậy, kết hợp hai phương pháp sắc ký trao đổi ion trên giá thể SP-Streamline và sắc ký tương tác kỵ nước trên giá thể Phenil-Sephroz phân đoạn enzym 0.35M NaCl, có khả năng đây là phân đoạn enzym chymopapain đã được tinh sạch từ mù đừ đừ. Tuy nhiên, do các enzym trong mù đừ đừ có

khối lượng phân tử như nhau chỉ khác nhau về điểm đẳng điện cho nên cần kiểm tra lại bằng phương pháp điện di điểm đẳng điện để có thể chắc chắn rằng chỉ có một enzym duy nhất và đã được tinh sạch hoàn toàn. Bên cạnh đó, cần phải nghiên cứu thêm về việc nâng qui trình tinh sạch lên phạm vi lớn hơn, đối với cột trao đổi ion, việc nâng cấp lên phạm vi tinh sạch lớn đã được nghiên cứu và có thể thực hiện được, tuy nhiên đối với cột sắc ký

trương tác kỵ nước cần phải được nghiên cứu tiếp tục.

4 KẾT LUẬN

Mủ đu đủ có thể thu hoạch từ trái trong khoảng từ 8-10 tuần tuổi để thu được enzym với hoạt tính và hiệu suất cao. Sắc ký trao đổi ion với giá thể gel SP-Streamline kết hợp với sắc ký tương tác kỵ nước với giá thể gel Phenil-Sepharoz có thể được dùng để tinh sạch enzym trong mủ đu đủ. Thuận lợi của qui trình tinh sạch là có thể sản xuất nhiều mà không cần phải qua nhiều công đoạn như rửa bằng ammonium sulfat hay bằng cồn, sản phẩm sẽ tinh sạch hơn và không gây ô nhiễm môi trường. Thêm vào đó, do nguồn papain của chúng ta dồi dào, gel dùng để chạy sắc ký có thể tái sử dụng nhiều lần, vì vậy giá thành sẽ thấp hơn papain thương mại. Nhưng phương pháp này khó tách rửa enzym có hàm lượng lớn. Mặt khác, ta sử dụng một lượng lớn dung dịch đệm để tách rửa nên nồng độ enzym thu được sau khi qua cột rất loãng, có thể nên kết hợp sử dụng phương pháp siêu lọc để tách muối đồng thời có hoạt tính enzyme tốt hơn. Xử lý dung dịch enzym với 2-PDS trước khi cho qua cột sắc ký trao đổi ion có thể bảo vệ enzym tránh tình trạng tự phân giải trong quá trình tinh sạch.

LỜI CẢM ƠN

Cám ơn Viện Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện vật chất cho thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dekeyser, P.M.1994. Fractionation and purification of the thiol proteinases papaya latex. University of Ghent, Wolterslaan 16,9000 ghent, Belgium.
2. Janson, J.C and Kyden L.1998. Protein purification, 2nded. A John Willey & Con, Inc, Puplicatation.
3. Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. Part II. General properties. J. General Physiology. 30: 291-296.
4. Leamli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.
5. Nguyễn Đức Lượng và ctv. 2002. Nghiên cứu thu nhận và tinh chế papain từ quả đu đủ trồng ở Việt Nam và Một số ứng dụng papain trong y học và trong công nghệ thực phẩm. Hội nghị khoa học và công nghệ lần 8. Trường Đại học Bách Khoa TP.Hồ Chí Minh. 1-12.
6. Phanxipăng 2003. Đu đủ lạ hay quen. Kiến thức ngày nay. Liên hiệp các hội Văn học nghệ thuật TP. Hồ Chí Minh. (457).
7. Stanley Zucker và ctv. 1984. the proteolytic activities of chymopapain, papain, and papaya proteinase III. Departement of Biochemistry, Strangeways Research Laboratory, Worts causeway, Cambridge CB1 4RN, U.K.