

# KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN THU NHẬN CHẾ PHẨM PROTEASE TỪ QUẢ VỎ (*FICUS AURICULATA* L.)

Võ Văn Quốc Bảo, Nguyễn Thành Trung, Đoàn Thị Lệ Trinh  
Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

Liên hệ email: [vovanquocbao@huaf.edu.vn](mailto:vovanquocbao@huaf.edu.vn)

## TÓM TẮT

Mục tiêu của công trình là xác định các điều kiện thích hợp để thu nhận chế phẩm protease từ quả vả. Các yếu tố được khảo sát trong nghiên cứu này gồm tỷ lệ nguyên liệu/ethanol 96%, thời gian và nhiệt độ kết tủa. Để thực hiện quá trình nghiên cứu, hoạt độ protease trong các mẫu thí nghiệm được xác định theo phương pháp Amano và hàm lượng protein được xác định theo phương pháp của Bradford. Kết quả cho thấy, hoạt độ protease đạt 1,02 Hp/mL và hàm lượng protein đạt 2,21 mg/mL khi tỷ lệ dịch mù quả vả/ethanol 96% là 1/4, nhiệt độ kết tủa protein 3°C trong 60 phút.

**Từ khóa:** quả vả, enzyme, hoạt độ protease, ethanol.

Nhận bài: 17/08/2017

Hoàn thành phản biện: 05/09/2017

Chấp nhận bài: 16/09/2017

## 1. MỞ ĐẦU

Protease có nhiều trong các loại quả cây họ Sung (Moraceae), được sử dụng nhiều nhất trong một số ngành sản xuất như: chế biến thực phẩm (làm fromage, làm mềm thịt, bổ sung để chống lại hiện tượng tủa protein trong quá trình làm trong bia, ngăn cản sự hóa nâu trong rau củ, xử lý phế phụ phẩm trong chế biến phế thực phẩm), trong y học như làm thuốc hỗ trợ tiêu hóa, tẩy giun. Ngoài ra, có nhiều ứng dụng đang được nghiên cứu như sản xuất thuốc làm tan máu bầm, trị bệnh ngoài da, mụn nhọt (Nguyễn Thị Cẩm Vi, 2011; Turk, 2006; Vander Hoorn, 2008).

Nước ta nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới nên các loại cây họ Sung nói chung và cây vả nói riêng phát triển rất thích hợp. Tuy nhiên, sản phẩm từ cây vả chỉ được biết đến qua các món thực phẩm được dùng hằng ngày như: vả trộn, vả kho thịt, hay dùng làm rau mà chưa có nhiều nghiên cứu về enzyme protease trên loại cây này. Lá và quả vả, nguồn nguyên liệu để sản xuất enzyme tự nhiên, đều chứa một lượng lớn enzyme protease trong đó chủ yếu là enzyme ficin. Bên cạnh hai loại enzyme đã được nghiên cứu tương đối rõ ràng và có nhiều ứng dụng cụ thể là bromelain từ dứa và papain từ đu đủ, việc nghiên cứu khảo sát các điều kiện tách chiết protease từ quả vả sẽ có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

Trong nghiên cứu này, các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thu nhận chế phẩm ficin từ quả vả như tỷ lệ dung môi cho vào, nhiệt độ và thời gian kết tủa sẽ được xác định.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Dịch mù quả vả (*Ficus auriculata* Lour.) được thu nhận tại các nhà vườn trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế. Để tránh ảnh hưởng đến hoạt tính của protease, dịch mù quả vả được bảo quản ở -20°C.

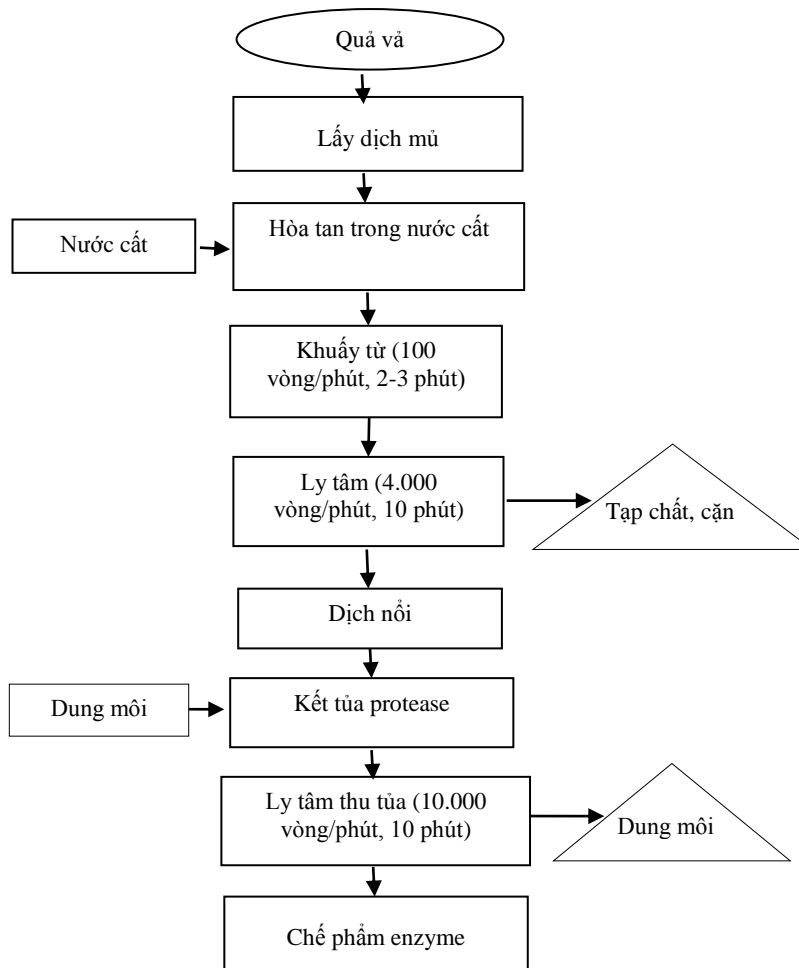


**Hình 1.** Dịch mủ quả vả.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Bố trí thí nghiệm

#### 2.2.1.1. Sơ đồ quy trình tách enzyme protease



**Hình 2.** Sơ đồ quy trình thu nhận chế phẩm protease từ dịch mủ quả vả.

### 2.2.1.2. Thuyết minh quy trình thí nghiệm

Để thu nhận chế phẩm protease đạt chất lượng cao, quá trình thí nghiệm luôn tiến hành trong điều kiện lạnh. Hòa tan 5 g dịch mủ quả và với nước cất theo tỉ lệ 1/2. Sử dụng máy khuấy từ (100 vòng/phút), trong thời gian 2 – 3 phút để tạo điều kiện cho quá trình hòa tan được triệt để. Tiếp theo, dung dịch được tách tạp chất và các phần không tan bằng máy ly tâm lạnh (4.000 vòng/phút, trong 10 phút). Sau khi ly tâm, loại bỏ lớp cặn dưới đáy và 1 phần dịch trắng đục nổi lên trên bề mặt, chỉ thu phần dịch ở giữa để tiến hành kết tủa protein. Sử dụng dung môi ethanol 96% để kết tủa, tiến hành khảo sát lựa chọn tỷ lệ dịch mủ/ethanol 96% (1/1; 1/2; 1/3; 1/4 và 1/5), thời gian (30, 60 và 90 phút) và nhiệt độ kết tủa (1; 3 và 5°C). Dựa vào phương pháp loại suy để chọn các thông số thích hợp cho quá trình kết tủa protein có trong dịch mủ. Để thu nhận tủa protein chúng tôi tiến hành ly tâm lạnh (10.000 vòng/phút, 10 phút). Lượng tủa lắng xuống dưới sẽ được làm khô từ 2 – 3 giờ, sau đó hòa trong dung dịch đệm phosphat để tiến hành đo hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford và hoạt độ protease bằng phương pháp Amano.

### 2.2.2. Các phương pháp phân tích

#### 2.2.2.1. Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp của Bradford. Phương pháp này dựa trên sự thay đổi bước sóng hấp thụ cực đại và sự thay đổi màu xảy ra khi Coomassie Brilliant Blue (CBB) liên kết với protein trong dung dịch acid. Trong dung dịch mạnh tính acid, khi không kết nối với protein thì thuốc nhuộm có bước sóng cực đại ở 465 nm. Khi kết hợp với protein thì thuốc nhuộm hấp thụ bước sóng cực đại ở 595 nm. Nhờ đó mà xác định được nồng độ protein. Dạng proton hóa của thuốc nhuộm CBB có màu xanh. Thuốc nhuộm liên kết chặt chẽ với các protein, tương tác với tất cả các nhóm kỵ nước và các nhóm mang điện tích dương trên phân tử protein. Trong môi trường của gốc mang điện tích dương, sự proton hóa không xảy ra và màu xanh xuất hiện. Màu sẽ xuất hiện sau 2 phút và ổn định trong gần 1 giờ (Đỗ Thị Bích Thủy, 2011).

Tổng hàm lượng protein trong V (mL) chế phẩm thô được tính theo công thức:

$$mg_{protein} = b * 10^{-3} * m * V$$

Trong đó:

b: nồng độ protein trong mẫu suy ra từ đường chuẩn (mg/mL).

m: hệ số pha loãng.

V: thể tích dung dịch chế phẩm enzyme thô (mL).

#### 2.2.2.2. Xác định hoạt độ protease

Hoạt độ protease được xác định theo phương pháp Amano. Xác định độ hoạt động phân giải protein của enzyme trên cơ sở xác định lượng sản phẩm được tạo thành trong phản ứng, bằng phản ứng màu với thuốc thử folin – ciocalteu. Dựa vào đồ thị đường chuẩn, định lượng tyrosin tương ứng với lượng sản phẩm thủy phân dưới tác dụng của enzyme (Đỗ Thị Bích Thủy, 2011). Tính số đơn vị hoạt động proteolytic của 0,2 mL dung dịch enzyme đã lấy xác định hoạt độ theo công thức:

$$Hp/mL = \frac{\mu\text{gtyrozin} \times 0,8}{t} \text{ (đơn vị)}$$

Trong đó:

0,8: thể tích toàn bộ hỗn hợp phản ứng (0,2 mL cơ chất, 0,2 mL dung dịch enzyme, 0,4 mL dung dịch TCA (acid trichloroacetic)).

t: thời gian để enzyme tác dụng với cơ chất (30 phút).

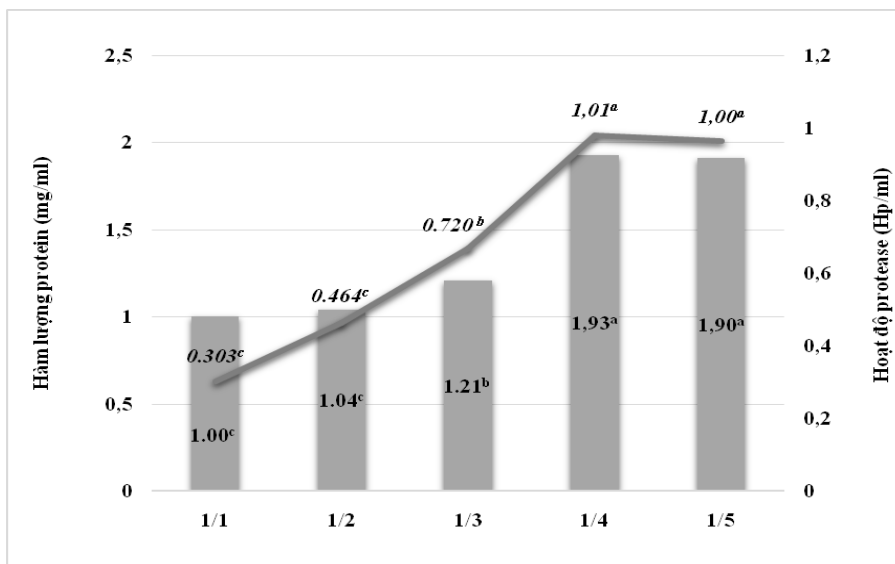
### 2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần. So sánh sự khác biệt về giá trị trung bình bằng thuật toán phân tích phương sai (ANOVA) theo mô hình một yếu tố. Số liệu được xử lý bằng phần mềm tiêu chuẩn Minitab 16.2.3.0.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Khảo sát tỷ lệ dịch nhựa/ethanol

Để tiến hành khảo sát năm mức tỷ lệ giữa dịch mù/ethanol 96% khác nhau: 1/1; 1/2; 1/3; 1/4 và 1/5 chúng tôi cố định thời gian kết tủa trong 1 giờ và nhiệt độ kết tủa là 5°C. Sau đó, ly tâm thu tủa và tiến hành đo hàm lượng protein và hoạt độ protease bằng thiết bị UV – Vis, kết quả nhận được thể hiện ở Hình 3.



**Hình 3.** Hàm lượng protein và hoạt độ protease biến thiên theo tỷ lệ dịch mù/ethanol 96%.

Chú thích: các chữ cái a, b, c thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê trên từng dạng biểu đồ của đồ thị.

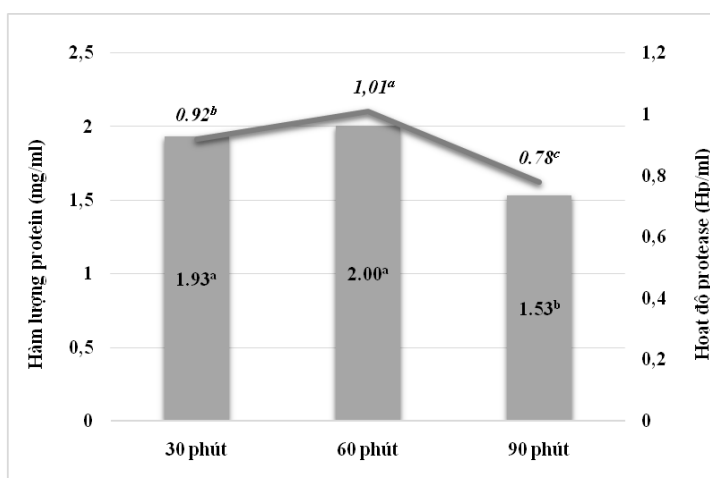
Theo các số liệu thực nghiệm ở Hình 3, chúng tôi nhận thấy hàm lượng protein và hoạt độ protease có xu hướng tăng tỷ lệ thuận so với lượng ethanol sử dụng trên cùng một loại nguyên liệu. Cụ thể hàm lượng protein ở các mẫu 1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 lần lượt là 1,00; 1,04; 1,21; 1,93 và 1,90 mg/mL, và hoạt độ protease lần lượt là 0,30; 0,46; 0,72; 1,01 và 1,00 Hp/mL. Kết quả cho thấy hàm lượng protein và hoạt độ protease tăng dần theo chiều tăng của lượng ethanol từ mẫu có tỷ lệ 1/1 đến mẫu có tỷ lệ 1/4 và đạt giá trị cực đại ở mẫu có tỷ

lệ 1/4 lần lượt là 1,93 mg/mL; 1,01 Hp/mL tương ứng. Sau đó, hàm lượng protein và hoạt độ protease không tăng nữa cho dù tăng lượng dung môi sử dụng.

Theo lý thuyết, khi tăng lượng dung môi, quá trình thu nhận protease sẽ trở nên nhiều hơn do khi phân tử dung môi tăng chúng sẽ tách triệt để hơn lớp phân tử nước bao lấy xung quanh phân tử protein, làm giảm tính tan của protein, tăng khả năng kết tủa của chúng (Polaina, 2007). Tuy nhiên, khi tăng lượng ethanol 96% lên nhiều hơn so với tỷ lệ dịch dịch mũ/ethanol = 1/4, hàm lượng protein không có sự sai khác về mặt thống kê còn hoạt độ protease ở tỷ lệ 1/5 có sự giảm nhẹ. Điều này được giải thích, khi tỷ lệ dung môi sử dụng tăng vượt quá 1/4, hằng số điện môi thay đổi quá mức, thúc đẩy sự phá hủy enzyme, gây biến tính không thuận nghịch, dẫn đến hiệu quả thu nhận chế phẩm protease giảm. Kết quả này phù hợp với công bố của nhóm tác giả Nguyễn Thị Thụy Vy và Nguyễn Văn Mười (2016), khi khảo sát ảnh hưởng của dung môi ethanol đến hiệu quả thu nhận protease từ đầu tôm, hoạt độ protease đạt giá trị cao nhất khi sử dụng tỷ lệ dịch enzyme thô/ethanol là 1/3 (1,98 U/mg protein) nhưng ở tỷ lệ 1/4 chỉ đạt 1,44 Hp/mL và tỷ lệ 1/5 đạt 1,00 Hp/mL. Từ những nhận định trên, chúng tôi chọn tỷ lệ dịch mũ/ethanol 96% là 1/4 để tiến hành các bước tiếp theo.

### 3.2. Khảo sát thời gian kết tủa protease

Sau khi chọn được tỉ lệ dịch mũ/ethanol 96% là 1/4, chúng tôi tiếp tục khảo sát thời gian ở 3 mức: 30 phút, 60 phút và 90 phút; ở nhiệt độ 5°C. Kết quả thu nhận được trình bày ở Hình 4.



**Hình 4.** Hàm lượng protein và hoạt độ protease biến thiên theo thời gian.

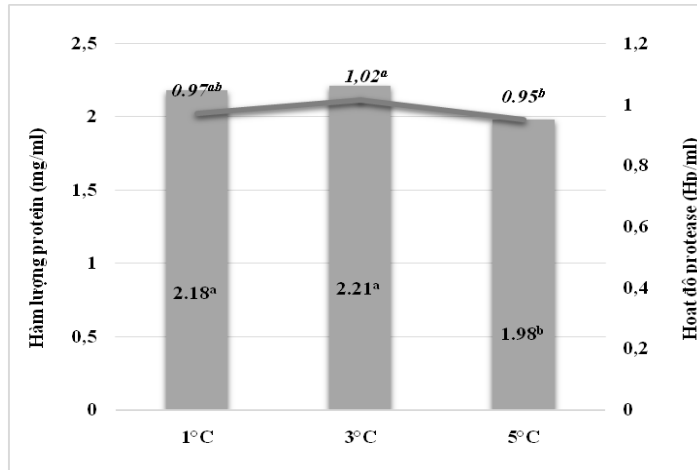
*Chú thích: các chữ cái a, b thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê trên từng dạng biểu đồ của đồ thị*

Qua kết quả thể hiện trên Hình 4, xét về mặt thời gian chúng tôi nhận thấy mẫu 1 (30 phút) tiến hành nhanh hơn mẫu 2 (60 phút) nên sẽ rút ngắn thời gian thí nghiệm. Tuy nhiên, phân tích sâu về quá trình nghiên cứu và thu nhận kết quả chúng tôi thấy rằng biên độ kết quả của 3 lần lặp lại đối với mẫu 1 dao động rất lớn (lần 1: 1,71 mg/mL; lần 2: 2,19 mg/mL và lần 3: 1,89 mg/mL) trong khi đó biên độ kết quả của 3 lần lặp lại ở mẫu 2 ổn định hơn (lần 1: 1,91 mg/mL; lần 2: 1,99 mg/mL; lần 3 và 2,09 mg/mL), ngoài ra hoạt độ protease còn

thể hiện giá trị hoạt độ cao nhất 1,01 Hp/mL. So sánh kết quả khảo sát thời gian từ 0 đến 160 phút để tách chiết ficin từ nhựa quả vả (*Ficus carica* cv.) của nhóm tác giả Hamid Zare và cs. (2012) cho thấy protease đạt giá trị cao nhất khi thời gian xử lý từ 60 đến 80 phút. Từ những lập luận trên chúng tôi chọn thời gian kết tủa protease là 60 phút để thực hiện các bước nghiên cứu tiếp theo.

### 3.3. Khảo sát nhiệt độ kết tủa protease

Tiến hành tương tự chúng tôi khảo sát 3 mức nhiệt độ là 1°C, 3°C và 5°C, ở tỷ lệ dịch mù/ethanol 96% là 1/4, thời gian 60 phút. Kết quả khảo sát được thể hiện ở Hình 5.



**Hình 5.** Hàm lượng protein và hoạt độ protease biến thiên theo nhiệt độ.

*Chú thích:* các chữ cái a, b, c thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê trên từng dạng biểu đồ của đồ thị.

Qua kết quả khảo sát chúng tôi thấy rằng, khả năng kết tủa enzyme protease từ dịch mù quả vả phụ thuộc vào nhiệt độ. Khi tăng nhiệt độ từ 1°C lên 3°C, khả năng khuếch tán cũng như kết tủa protease trong dịch mù có sự tăng nhẹ nhưng không thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê, hàm lượng protein tăng tương ứng từ 2,18 mg/mL lên 2,21 mg/mL, nhưng hoạt độ protease của dịch mù quả vả tăng có thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê từ 0,97 Hp/mL lên 1,02 Hp/mL. Khi tăng nhiệt độ kết tủa lên 5°C, hàm lượng protein và hoạt độ protease có xu hướng giảm đi chỉ còn 1,98 mg/mL và 0,95 Hp/mL, tương ứng. Chúng tỏ rằng trong môi trường có dung môi hữu cơ (ethanol 96%), khi nhiệt độ càng cao khả năng biến tính protease càng lớn dẫn đến hoạt độ giảm. Những kết quả đạt được trong nghiên cứu này cũng phù hợp với công bố của Nguyễn Văn Thành và cs. (2013) khi khảo sát nhiệt độ đến sự kết tủa của enzyme bromelain, ở 4°C hiệu suất thu hồi hoạt tính tổng đạt 82,59% và hiệu suất thu hồi protein đạt 59,53% trong khi đó 72,59% và 56,16% ở 28°C, tương ứng.

#### 4. KẾT LUẬN

Trong công trình này, để thu nhận được dịch chiết enzyme protease từ nhựa quả vả, chúng tôi nghiên cứu và chọn được tỷ lệ dịch mù/ethanol 96% là ¼, nhiệt độ kết tủa protein thích hợp là 3°C trong 60 phút để thu nhận được hàm lượng protein là 2,21 mg/mL và hoạt độ protease là 1,02 Hp/mL là cao nhất.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

##### 1. Tài liệu tiếng Việt

- Nguyễn Đức Lượng (chủ biên), Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết, Lê Thị Thủy Tiên, Huỳnh Ngọc Oanh, Nguyễn Thúy Hương, Phan Thị Huyền, Tạ Thu Hằng, (2012). *Công nghệ enzyme*. NXB Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Thị Minh, Lê Hà Ny và Lê Trung Hiếu, (2013). Trích ly enzymze bromelain từ phế phẩm khóm cầu đúc - Hậu Giang. *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, 28: 21-23.
- Đỗ Thị Bích Thủy, Trần Thị Xô, (2006). Nghiên cứu quy trình thu nhận và khảo sát một số tính chất của chế phẩm proteinase Bacillus subtilis. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 87: 41-42.
- Đỗ Thị Bích Thủy, (2011). *Hóa sinh thực phẩm*. NXB Đại học Huế.
- Nguyễn Thị Cẩm Vi, (2011). Khảo sát sự biến đổi hàm lượng protein hòa tan và hoạt tính bromelain trong quá trình phát triển của quả dứa. *Tạp chí Khoa học - Ứng dụng*, 14-15: 28-31.
- Hà Thị Thụy Vy, Trần Thanh Trúc và Nguyễn Văn Mười, (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*, 1: 9-17.

##### 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Devaraj, K.B., Kumar, P.R., Prakash, V., (2008). Purification, characterization and solvent-induced thermal stabilization of ficin from Ficus carica. *J. Agric. Food Chem.*, 56(23): 11417–11423.
- Hamid Zare, Ali Akbar Moosavi-Movahedi, Maryam Salami, Morteza Mirzaei, Ali Akbar Saboury, Nader Sheibani, (2013). Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (Ficus carica cv. Sabz) latex. *Phytochemistry*, 87: 16-22.
- Polaina, J., and MacCabe, A.P., (2007). *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Valencia, Spain.
- Singh, V.K., Patel, A.K., Moir, A.J., Jagannadham, M.V., (2008). Inducain, a dimeric serine protease from Morus indica cv. K2. *Phytochemistry*, 69: 2110–2119.
- Turk, B., (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5: 785–799.
- Van der Hoorn R.A., (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 191–223.

## INVESTIGATION OF CONDITIONS FOR PROTEASE EXTRACTION FROM FIG FRUIT (*FICUS AURICULATA* L.)

**Vo Van Quoc Bao, Nguyen Thanh Trung, Doan Thi Le Trinh**  
University of Agriculture and Forestry, Hue University

Contact email: [vovanquocbao@huaf.edu.vn](mailto:vovanquocbao@huaf.edu.vn)

### ABSTRACT

This study aims to investigate the conditions for the protease activity from fig fruit latex. The rate of material/ethanol 96%, the time and the temperature of precipitation were investigated. To carry out the research, the protease activity in the samples was determined according to the Amanos method and the protein content was determined by Bradford's method. The results show that the protease activity is 1.02 Hp/mL and the protein content is 2.21 mg/mL when the ration of ethanol 96%/fig fruit latex is  $\frac{1}{4}$  and the temperature of protein precipitation is 3°C for 60 minutes.

**Key words:** enzyme, ethanol, fig fruit, protease activity.

*Received:* 17<sup>th</sup> August 2017

*Reviewed:* 5<sup>th</sup> September 2017

*Accepted:* 16<sup>th</sup> September 2017