

TINH CHẾ PEROXIDASE TỪ CỦ CẢI TRẮNG *RAPHANUS SATIVUS* VAR *HORTENSIS* VÀ ỨNG DỤNG TRONG XÉT NGHIỆM ETHANOL

Nguyễn Thanh Thủy, Dương Anh Tuấn, Vũ Nguyên Thành

Viện Công nghệ Thực phẩm

TÓM TẮT

Peroxidase là nhóm enzyme chứa heme, oxy hóa cơ chất sử dụng H_2O_2 và được ứng dụng rộng rãi trong xét nghiệm sinh hóa. Peroxidase hiện nay chủ yếu được thu nhận từ cải ngựa *Armoracia rusticana*, một loại cây chỉ mọc ở các vùng ôn đới. Nhằm tạo sự thay thế hợp lý về nguồn nguyên liệu, trong nghiên cứu này, peroxidase từ củ cải trắng *Raphanus sativus* var *hortensis* được khảo sát tinh chế. Dịch củ cải với hoạt tính peroxidase ban đầu 29 U/ml được tinh chế 190 lần sử dụng các phương pháp kết tủa bằng $(NH_4)_2SO_4$, sắc ký trao đổi ion và lọc gel. Enzyme thu nhận được có hoạt tính 810 U/ml, hoạt tính riêng 3237 U/mg protein, kích thước phân tử 43 KDa theo SDS-PAGE. Peroxidase từ củ cải trắng được thử nghiệm ứng dụng trong xét nghiệm ethanol dựa trên hệ alcohol oxidase - peroxidase kết hợp với phản ứng tạo màu sử dụng cơ chất 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. Phương pháp enzyme cho phép phát hiện ethanol ở mức 25 ppm. Tương quan tuyến tính được xác định trong dải nồng độ ethanol từ 50 ppm tới 500 ppm.

Từ khóa: Củ cải trắng, ethanol, peroxidase, *Raphanus sativus*, tinh chế, xét nghiệm

MỞ ĐẦU

Peroxidase (EC 1.11.1.7) là nhóm enzyme chứa heme, oxy hóa cơ chất sử dụng H_2O_2 , trong đó heme đóng vai trò trung tâm xúc tác. Peroxidase được tách chiết và tinh chế từ nhiều nguồn khác nhau trong đó có vi khuẩn, nấm và thực vật bậc cao. Dựa vào đặc điểm trình tự amino acid, đặc điểm phức kim loại, peroxidase được chia làm 3 nhóm chính. Nhóm thứ nhất bao gồm cytochrome-c peroxidase của nấm men, ascorbate peroxidase lục lạp và peroxidase của vi khuẩn. Nhóm thứ hai là lignin, mangan peroxidase ngoại bào của nấm. Nhóm thứ ba bao gồm các peroxidase được tiết ra bởi tế bào thực vật bậc cao (Arnaldos *et al.*, 2001).

Trong số các peroxidase được nghiên cứu kỹ phải nhắc tới horseradish peroxidase (HRP). Đây cũng là loại enzyme được sản xuất ở quy mô tương đối lớn nhằm ứng dụng trong các mục đích khác nhau, ví dụ như trong các xét nghiệm sinh hóa và miễn dịch (Veitch, 2004). Horseradish peroxidase được tách chiết từ cải ngựa *Armoracia rusticana*, một loại cây chỉ mọc ở các vùng ôn đới. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm tách chiết, tinh chế peroxidase từ củ cải trắng *Raphanus sativus* var *hortensis* và ứng dụng trong xét nghiệm ethanol nhằm tạo sự thay thế hợp lý về nguồn nguyên liệu.

NGUYÊN/VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Củ cải trắng *R. sativus* var *hortensis* sử dụng trong nghiên cứu là loại củ cải dùng cho thực phẩm và được mua từ chợ Hà Nội. Phần củ (400 g) được rửa sạch, cắt nhỏ, bổ sung thêm (100 ml) đệm Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 và nghiền mịn bằng máy xay sinh tố. Hỗn hợp được ly tâm ở 10000 g trong 10 phút ở 4°C để thu nhận phần dịch trong (dịch enzyme gốc).

Kết tủa bằng $(NH_4)_2SO_4$ và loại muối

Enzyme thô được kết tủa bằng cách bổ sung từ từ $(NH_4)_2SO_4$ đã nghiền mịn cho tới khi nồng độ đạt 80% (w/v) và để qua đêm ở nhiệt độ 4°C trong điều kiện khuấy nhẹ. Hỗn hợp được ly tâm ở 10000 g trong 10 phút ở 4°C. Phần kết tủa được hòa tan lại trong 2 ml đệm Tris-HCl 20 mM, pH 7,5. Dung dịch enzyme thô được loại muối (chủ yếu là ammonium sulphate) bằng sắc ký lọc gel sử dụng Sephadex™ G-25 Medium (Amersham Biosciences, Thụy Điển), kích thước cột gel 2 cm × 10 cm đã được cân bằng với đệm Tris-HCl 20 mM, pH 7,5. Quá trình sắc ký được thực hiện trên trên thiết bị AKTA Prime (Amersham Biosciences, Thụy Điển), rửa dải bằng Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 với tốc độ dòng 0,5 ml/phút. Quá trình rửa dải được theo dõi bằng cảm biến UV (280 nm) và độ dẫn điện sử dụng phần mềm PrimeView 1.0 (Amersham Biosciences, Thụy Điển).

kết hợp với SDS-PAGE (Sambrook *et al.*, 1989), định lượng protein tổng số (Lowry *et al.*, 1951) và phân tích hoạt tính.

Sắc ký trao đổi ion DEAE Sepharose

Các phân đoạn mang hoạt tính (xấp xỉ 20 ml) được dồn lại và nạp vào cột trao đổi ion DEAE Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences, Thụy Điển) (kích thước cột gel 2,5 cm × 20 cm) đã cân bằng với Tris HCl 20 mM, pH 7,5 với tốc độ nạp 1 ml/phút. Enzyme peroxidase được rửa dài bằng gradient NaCl (từ 0 đến 1M) trong đệm Tris HCl 20 mM, pH 7,5 với tốc độ 0,5 ml/phút trên thiết bị AKTA Prime.

Sắc ký lọc gel Superdex 200

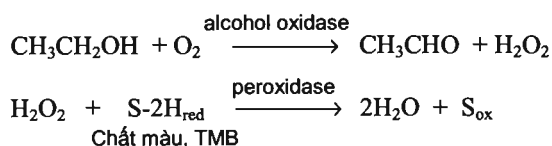
Các phân đoạn mang hoạt tính từ công đoạn trên được dồn và cô tới dung tích 1,5 ml sử dụng màng ly tâm Centriprep 10 (Amicon, Mỹ) ở 5000 g và nạp vào cột Superdex™ 200 (Prep Grade, Amersham Biosciences, Thụy Điển; kích thước cột gel 2 cm × 80 cm). Enzyme được rửa dài bằng đệm Sodium Acetate 10 mM, pH 5,0 với tốc độ 0,5 ml/phút. Những phân đoạn mang hoạt tính cao nhất được thu nhận.

Xác định hoạt tính peroxidase

Hoạt tính peroxidase được xác định thông qua khả năng oxy hóa cơ chất 3,3',5'5'-tetramethylbenzidine (TMB) (MP Biomedicals, Pháp) với sự có mặt của H₂O₂. Phản ứng oxy hóa được theo dõi thông qua sự thay đổi mật độ quang ở bước sóng 652 nm của dung dịch phản ứng chứa TMB 0,3 mM, H₂O₂ 1 mM, CaCl₂ 5 mM trong đệm Sodium Acetate 100 mM, pH 5,0 sử dụng thiết bị UV-1650PC (Shimadzu, Nhật). Một đơn vị enzyme (U) được xác định bởi số micromole TMB oxy hóa trong một phút ở 25°C. Hệ số hấp thụ (ε) cho dạng oxy hóa của TMB ở bước sóng 652 nm là 3,9×10⁴ M⁻¹cm⁻¹ (Arnaldos *et al.*, 2001).

Xác định nồng độ ethanol bằng phản ứng oxidase-peroxidase

Ethanol được định lượng theo nguyên lý của phản ứng:



Phản ứng được tiến hành trong đệm SPB (sodium phosphate buffer 50 mM, pH 7,0). TMB dùng trong phản ứng tạo màu không tan trong nước. Để tạo dạng tan, TMB đầu tiên được hòa trong DMSO tới nồng độ 50 mM sau đó được pha loãng bằng dung dịch β-cyclodextrin (Wako Pure Chemicals, Nhật) 0,25% trong SPB tới nồng độ 0,5 mM. Để xác định ethanol, 0,5 ml dung dịch mẫu pha trong SPB 50 mM, pH 7,0 được bổ sung vào 1 ml dung dịch chứa TMB 0,45 mM, alcohol oxidase (MP Biomedicals, Pháp) 0,2 U/ml; peroxidase 1,5 U/ml trong SPB. Phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong thời gian 20 phút. Để dừng phản ứng, 0,5 ml HCl 0,8M được bổ sung và mật độ quang được đo ở bước sóng 450 nm sử dụng thiết bị UV-1650PC. Nồng độ ethanol trong mẫu được tính toán dựa trên đường chuẩn xây dựng với các nồng độ ethanol khác nhau.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tinh chế peroxidase từ củ cải trắng *R. sativus* var *hortensis*

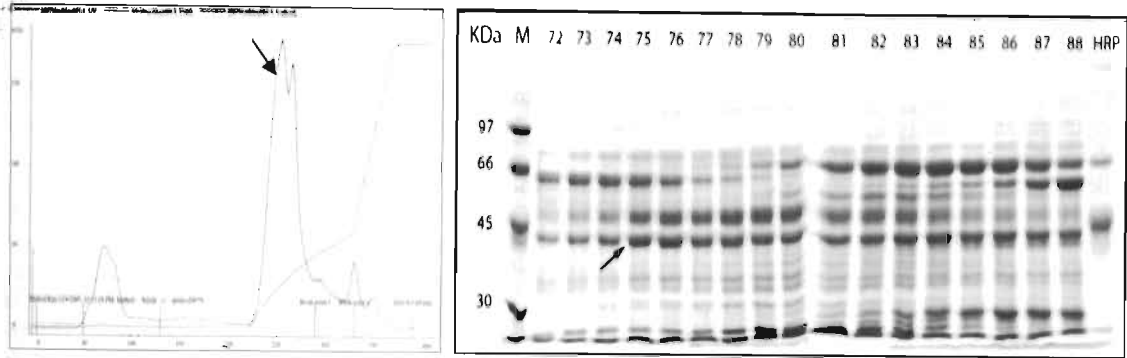
Khi kiểm tra với dịch chiết từ củ cải trắng sẵn có trên thị trường chúng tôi nhận thấy loại củ này mang hoạt tính peroxidase khá cao. Việc khai thác nguồn enzyme từ củ cải trắng có thể hạn chế sự phụ thuộc vào enzyme nhập khẩu, đặc biệt khi nhu cầu ứng dụng cao. Hoạt lực peroxidase phụ thuộc khá lớn vào chất lượng củ và thời gian bảo quản sau thu hoạch. Dịch chiết củ cải (đã bổ sung đệm) có hoạt tính peroxidase 29 U/ml, hàm lượng protein 1,73 mg/ml (Bảng 1). Nếu không tính lượng đệm bổ sung, bản thân dịch củ cải có hoạt tính 38 U/ml và hàm lượng protein tương ứng là 2,3 mg/ml. Kết tủa bằng (NH₄)₂SO₄ và loại muối có thể nâng hoạt lực enzyme lên 126 U/ml với mức độ tinh chế 14 lần. Trên thực tế, peroxidase thu nhận bằng kết tủa phân đoạn từ củ cải trắng có thể ứng dụng trực tiếp trong một số test như xác định hàm lượng thủy ngân trong nước thải (Trần Thị Hồng *et al.*, 2008).

Peroxidase từ củ cải trắng có thể được hấp phụ và tinh chế sử dụng cột anion yếu DEAE. Hoạt lực peroxidase được phát hiện ở các phân đoạn từ 72-88 tương ứng với pic lớn nhất trong phổ rửa dài (Hình 1). Điện di SDS-PAGE cho thấy hàm lượng quan tâm chỉ chiếm dưới 20% protein tổng số. Mức độ tinh chế của peroxidase của dịch enzyme sau cột DEAE đạt 39 lần, tăng 2,7 lần so với dịch sau kết tủa và loại muối (Hình 1, Bảng 1).

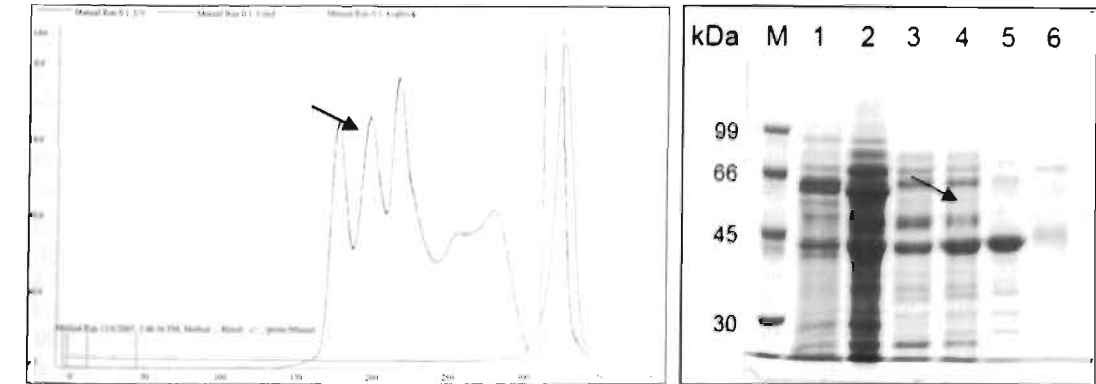
Lọc gel sử dụng cột Superdex 200 cho độ phân giải cao hơn so với phương pháp trao đổi ion sử dụng DEAE. Phổ rửa dải tạo 3 pic khá rõ nét, trong đó hoạt tính peroxidase tập trung ở pic đầu tiên (Hình 2). Cũng giống như nhiều loại peroxidase khác, peroxidase củ cải trắng ở nồng độ nhất định có màu nâu hồng. Sự khác biệt lớn về màu sắc so với đa số các protein khác trong nguyên liệu là yếu tố thuận lợi trong quá trình tinh chế. Sản phẩm enzyme peroxidase cuối cùng có hoạt lực 810 U/ml, hoạt tính riêng 3237 U/mg protein, độ tinh sạch 190 lần (gấp 4,9 lần so với sản phẩm sau trao đổi ion) (Bảng 1) và chỉ chứa một lượng nhỏ protein nhiễm tạp (Hình 2). Peroxidase từ củ cải trắng *R. sativus* var *hortensis* có trọng lượng phân tử xấp xỉ 43 kDa, thấp hơn một

chút so với horse radish peroxidase (44 kDa) (Veitch, 2004).

Như vậy peroxidase từ củ cải trắng có thể được thu nhận với độ tinh khiết và hoạt lực cao bằng các phương pháp kết tủa, trao đổi ion và lọc gel. Kết quả này tương đương với những công bố tinh chế peroxidase trước đây từ mô thực vật. Arnaldos và cộng sự (2001) đã tinh chế được sản phẩm peroxidase có độ sạch gấp 141,9 lần so với dịch enzyme thô từ mô dâu tây bằng trao đổi ion và lọc gel. Sử dụng công nghệ màng, Guo và Ruckenstein (2003) cũng đã thu nhận horse radish peroxidase với mức độ tinh chế 142 lần so với dịch chiết ban đầu.



Hình 1. Phổ rửa dải peroxidase từ củ cải trắng qua cột trao đổi ion DEAE Sepharose (trái) và SDS-PAGE của những phân đoạn mang hoạt tính peroxidase (phải). Mũi tên chỉ pic mang hoạt tính peroxidase (hình trái) và băng peroxidase dự kiến (hình phải). HRP - Horse radish peroxidase thương phẩm.



Hình 2. Phổ rửa dải peroxidase từ củ cải trắng qua cột lọc gel Superdex 200 (trái). SDS-PAGE của sản phẩm tinh chế theo các công đoạn. 1 - dịch chiết củ cải; 2 - dịch sau kết tủa và loại muối; 3, 4 - sản phẩm thu hồi sau DEAE, 5 - sản phẩm sau lọc gel Superdex 200, 6 - Horse radish peroxidase thương phẩm. Mũi tên chỉ pic mang hoạt tính peroxidase (hình trái) và băng peroxidase dự kiến (hình phải).

Bảng 1. Hoạt tính enzyme peroxidase từ củ cải trắng sau các bước tinh chế.

Tên mẫu	Hoạt tính peroxidase (U/ml)	Tổng protein (mg/ml)	Hoạt tính riêng, (U/mg protein)	Mức độ tinh chế (lần)
Dịch chiết củ cải	29	1,73	17	1
Sau lọc gel G-25	126	0,52	241	14
Sau trao đổi ion DEAE	156	0,24	663	39
Sau lọc gel Superdex 200	810	0,25	3237	190

Ứng dụng peroxidase thu nhận được trong xác định ethanol

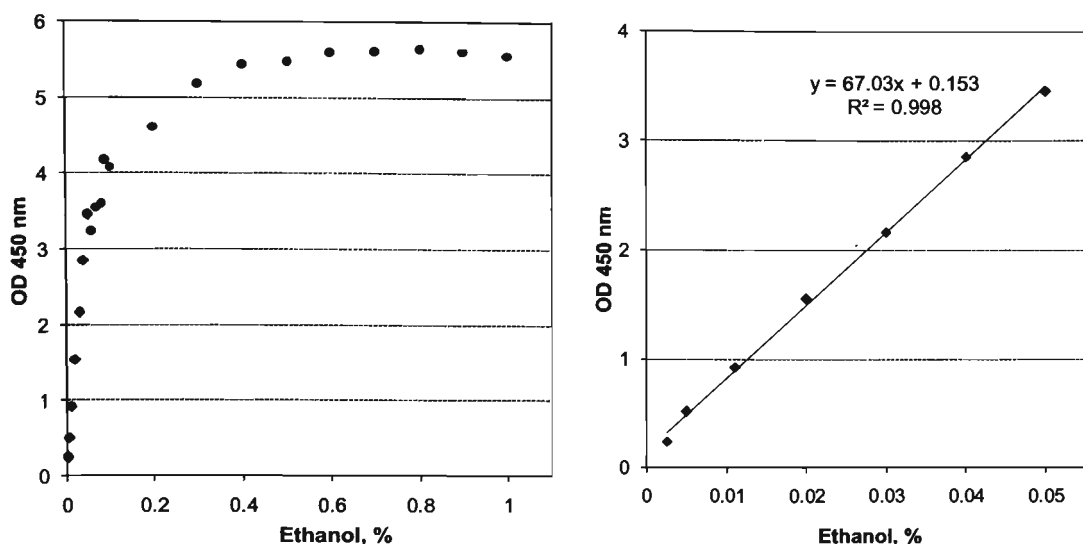
Hiện nay trong công nghệ lên men, nồng độ ethanol thường được tính toán thông qua việc xác định nhiệt độ sôi của dung dịch. Tuy nhiên, phương pháp này thường chỉ được áp dụng đối với dung dịch có nồng độ cồn tương đối cao (>2%). Với nồng độ cồn thấp hơn, phương pháp phổ biến là sử dụng sắc ký lỏng cao áp (HPLC). HPLC cho kết quả chính xác nhưng giá thành cao và khó thực hiện đối với một lượng mẫu lớn. Trong trường hợp này, xác định ethanol bằng phương pháp enzyme là lựa chọn thích hợp bởi quy trình phân tích đơn giản, không đòi hỏi thiết bị đắt tiền, thời gian phân tích ngắn, độ nhạy và độ chính xác cao.

Phần lớn các kit xác định ethanol hoạt động dựa trên phản ứng xúc tác bởi alcohol dehydrogenase với sự có mặt của NAD. Sản phẩm NADH tạo ra được đo bằng sự thay đổi mật độ quang trong vùng ánh sáng tử ngoại. Nguyên lý này có nhược điểm là phản ứng không quan sát được bằng mắt thường và thành phần môi trường có thể ảnh hưởng tới kết quả nếu hấp thụ ánh sáng tử ngoại. Do đó chúng tôi lựa chọn phương pháp định lượng ethanol sử dụng hệ enzyme alcohol oxidase, peroxidase và chất màu TMB theo Gonchar và đồng tác giả (2001). Tuy nhiên, trong công bố này nồng độ oxidase và peroxidase không được thông báo cụ thể. Sau khi thử nghiệm ở các nồng độ enzyme khác nhau, thành phần phản ứng thích hợp được xác định bao gồm TMB 0,3 mM, alcohol oxidase 0,13 U/ml, peroxidase 1 U/ml (xem phần phương pháp). Sản phẩm oxy hóa của TMB hình thành dạng phức truyền điện tích (charge-transfer complex) có màu xanh dương, hấp thụ cao nhất ở bước sóng 370 nm và 652 nm. Ở điều kiện trung tính phức này chuyển sang dạng dimer của diimine, tạo màu cam-nâu và chuyển dần thành nâu. Việc dừng phản ứng bằng HCl sẽ chuyển các dạng oxy hóa của TMB thành diimine bền và có bước sóng

hấp thụ cao nhất ở 450 nm (Josephy *et al.*, 1982).

Sự phụ thuộc của mật độ quang ở bước sóng 450 nm ($OD_{450\text{ nm}}$) và nồng độ ethanol trong mẫu được thể hiện trong hình 3. Với nồng độ ethanol trong mẫu vượt quá 0,4%, mật độ quang đạt trạng thái bão hòa. Bằng phương pháp enzyme chúng tôi có thể xác định sự có mặt của ethanol trong mẫu ở nồng độ 0,0025% (25 ppm). Quan hệ tuyến tính được xác định trong dải nồng độ từ 0,005% (50 ppm) tới 0,05% (500 ppm) với hệ số tương quan hồi quy tuyến tính $R^2 = 0,998$. Thời gian phản ứng được xác định tối ưu là 20 phút ở 25°C. Với thời gian phản ứng dài hơn (>30 phút) chúng tôi thu nhận được hệ số tương quan hồi quy R^2 thấp hơn 0,97. Thời gian phản ứng ngắn hơn ít ảnh hưởng tới độ tuyến tính của kết quả, tuy nhiên gây khó khăn trong việc đảm bảo độ đồng đều về thời gian giữa các mẫu. Phương pháp phân tích ethanol bằng enzyme có thể được thực hiện ở quy mô 200 μ l/phản ứng sử dụng các khay vi đĩa.

Do có độ nhạy cao, phương pháp phân tích ethanol bằng enzyme có thể được ứng dụng một cách hiệu quả đối với các mẫu phẩm có nồng độ ethanol thấp khi phương pháp đo nhiệt độ sôi không đảm bảo độ tin cậy và các phương pháp sắc ký như HPLC, GC có giá thành quá cao. Trong một nghiên cứu sàng lọc các chủng nấm men có khả năng lên men đường xylose từ thiên nhiên Việt Nam, khả năng lên men được chúng tôi xác định thông qua nồng độ ethanol trong canh trường nuôi cấy chứa đường xylose. Từ 1177 chủng nấm men đồng hóa đường xylose có 117 chủng nấm men được xác định là có khả năng sinh ethanol từ đường xylose. Nồng độ ethanol tạo ra trong canh trường nuôi cấy của các chủng dao động trong khoảng từ 0.01% tới 1.67%. Cũng trong nghiên cứu này, ngoài enzyme peroxidase từ củ cải trắng chúng tôi đã tiến hành tinh chế alcohol oxidase từ nấm men *Pichia pastoris* và cho thấy cả hai enzyme thu nhận được đều có thể thay thế enzyme thương phẩm (kết quả chưa công bố).



Hình 3. Đường chuẩn thể mối tương quan giữa mật độ quang học (OD_{450 nm}) của hỗn hợp sau phản ứng và nồng độ ethanol trong mẫu.

KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp kết tủa, sắc ký trao đổi ion, lọc gel chúng tôi đã thu nhận được enzyme peroxidase từ củ cải trắng *R. sativus* var *hortensis* với mức độ tinh chế 190 lần, hoạt tính peroxidase 810 U/ml, hoạt tính riêng 3237 U/mg protein. Enzyme peroxidase thu nhận được có thể ứng dụng trong xét nghiệm ethanol.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp Nhà nước KC.04.07/06-10.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amaldos TL, Ferrer MA, Munoz R, Calderon AA (2001) Purification and stability of a basic peroxidase from strawberry callus culture. *Plant Physiol Biochem* 39: 479-486.
- Gonchar MV, Maidan MM, Pavlishko HM, Sibirny A (2001) A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in

alcoholic beverages. *Food Technol Biotechnol* 39: 7-42.

Guo W, Ruckenstein E (2003) Separation and purification of horseradish peroxidase by membrane affinity chromatography. *J Membr Sci* 211: 101-111.

Joseph PD, Mason RP, Eling T (1982) Coxydation of the clinical reagent 3,5,3'-tetramethylbenzidine by prostaglandin synthase. *Cancer Res* 42: 2567-70.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

Trần Thị Hồng, Trần Hoàng Thanh, Nguyễn Thị Hà Giang (2008) Nghiên cứu phương pháp sử dụng enzyme peroxidase tách chiết từ củ cải trắng để xác định hàm lượng thủy ngân trong nước ô nhiễm. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 24: 23-27.

Veitch NC (2004) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65: 249-259.

PURIFICATION OF PEROXIDASE FROM WHITE RADISH *RAPHANUS SATIVUS* VAR *HORTENSIS* AND APPLICATION IN ETHANOL ASSAY

Nguyễn Thanh Thùy, Duong Anh Tuan, Vu Nguyen Thanh*

Food Industries Research Institute

SUMMARY

Peroxidases are a group of heme-containing enzymes that oxidase substrates at the expense of H_2O_2 . Peroxidases have found wide application in organic synthesis, biotransformation, immunoassays, and enzyme assays. The main commercial peroxidase is obtained from horse radish *Armoracia rusticana*, a cultivar of temperate zone. In this study, peroxidase from white radish *Raphanus sativus* var *hortensis* was extracted and purified for application in enzymatic assay of ethanol. Peroxidase from tissue extract of white radish with initial activity of 29 U/ml was purified 190 times using precipitation with $(NH_4)_2SO_4$, ion exchanger and size exclusion chromatographies. The final peroxidase preparation has activity of 810 U/ml and specific activity of 3237 U/mg protein. Peroxidase from white radish was tested in enzymatic assay for ethanol using an alcohol oxidase peroxidase system with 3,3',5'5'-tetramethylbenzidine as a chromogen. The detection limit for ethanol was 25 ppm and linear correlation was obtained at the ethanol concentration range from 50 ppm to 500 ppm.

Keywords: *Enzymatic assay, enzyme purification, ethanol, peroxydas, Raphanus sativus, white radish*

* Author for correnspondence: Tel: 84-4-35589004; Fax: 84-4-38584554; E-mail: thanh@firi.ac.vn