

KHẢO SÁT TINH SẠCH ENZYME CHYMOPAPAIN TRONG MỦ TRÁI ĐU ĐỦ VIỆT NAM

Lê Thị Phú, Nguyễn Thị Thu Sang

Khoa Khoa Học Ứng Dụng, Đại học BC Tôn Đức Thắng, Tp HCM

(Bài nhận ngày 26 tháng 12 năm 2005)

TÓM TẮT: *Khảo sát hàm lượng các enzyme thành phần trong mủ trái đu đủ tươi qua các giai đoạn sinh trưởng của trái bằng sắc kí trao đổi ion CM-Cellulose cho thấy chymopapain luôn chiếm tỉ lệ cao nhất về hàm lượng và hoạt tính tổng cộng. Kết quả tương tự với mủ đông khô. Tinh sạch chymopapain từ mủ đông khô qua giai đoạn phân đoạn muối tích sunphat amon cho thấy chymopapain còn lẫn peptidase, tiếp tục tinh sạch qua giai đoạn sắc kí trao đổi ion CM-Cellulose và kiểm tra qua điện di SDS-PAGE cho thấy sơ bộ đã phân tách riêng được enzyme này.*

1. MỞ ĐẦU

Trong mủ đu đủ có ba enzyme chính bao gồm papain, chymopapain và peptidase. Trong đó chymopapain chiếm tỉ lệ nhiều nhất và gần đây enzyme này đang được quan tâm nhiều về việc sử dụng vào chữa trị hữu hiệu các bệnh nhân bị lệch đệm cột sống mà không cần phải giải phẫu, bệnh về xương hông. Đặc biệt, ứng dụng rất có giá trị trong lĩnh vực y học là sử dụng chymopapain tinh khiết tiêm vào vùng đệm cột sống bị lệch, sau một thời gian ngắn bệnh hoàn toàn khỏi hẳn. Vấn đề này có nhiều công trình đề cập tới và đang tiếp tục được nghiên cứu. [1][4][5] [9]

Tại Mỹ, dược phẩm Chimodiatin chữa chứng đau thần kinh tọa, được sử dụng tiêm trực tiếp vào chỗ đĩa đệm bị thoát vị để tiêu hoá phần thoát vị này, làm giảm cơn đau và những vấn đề khác do đĩa nén ép lên dây thần kinh. Qua phân tích Chimodiatin chứa 70% chymopapain, 20% caricain, 4% glycy endopeptidase và 0,1% papain. Nghiên cứu đã đề nghị nên tách caricain, glycy endopeptidase và papain ra khỏi dược phẩm này để giảm những phản ứng dị ứng trong quá trình điều trị.[5]

Các loại đu đủ phát triển ở Việt Nam chưa được nghiên cứu nhiều. Đặc biệt chưa có công trình nào đi sâu nghiên cứu việc tinh sạch tách riêng các enzyme thành phần để ứng dụng trong các ngành công nghiệp cũng như trong Y-Dược ở tại điều kiện Việt Nam, trong khi nguồn đu đủ ở Việt Nam rất nhiều, phong phú về số lượng, chủng loại đồng thời chất lượng (hoạt tính enzyme) trong mủ cao [1][8]

Trên cơ sở đó, nghiên cứu này bước đầu tiến hành khảo sát thành phần hóa học và thành phần các enzyme trong mủ tươi và mủ đông khô của trái đu đủ trồng tại Việt Nam bằng các phương pháp hoá lý, hoá sinh, tập trung vào khảo sát tinh sạch enzyme chymopapain.

2. NGUYÊN LIỆU & PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Mủ trái đu đủ thu nhận tại Lâm Đồng và Long An ở 3 giai đoạn sinh trưởng của trái:

- Trái non (N) – dưới 40 ngày tuổi
- Trái bánh tẻ (BT) – 50 -100 ngày tuổi
- Trái già (G) – 100 -120 ngày tuổi
- Latex đông khô (LK) – (sấy từ các mủ tươi trên)

2. 2. Phương pháp nghiên cứu

- **Kiểm tra nguyên liệu:** độ ẩm, độ tro, protein thô, protein tan, hoạt lực proteolitic.

- **Xác định thành phần các enzyme:** khảo sát các mẫu nguyên liệu tươi (ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau của trái) và mẫu đông khô qua sắc kí trao đổi ion với CM-Cellulose với dung môi rửa giải là dung dịch đệm pH5 acetate nồng độ từ 0,4M -1,5M.

- **Khảo sát chiết xuất và tinh sạch enzyme chymopapain từ mẫu đông khô:** phân đoạn $(NH_4)_2SO_4$ bão hòa ở 45% để loại trừ papain, thu nhận chymopapain tại 65% sau đó tinh sạch tiếp theo bằng sắc kí trao đổi ion CM-Cellulose và kiểm tra qua điện di SDS-PAGE.

- **Các phương pháp phân tích:** protein thô (Kjendahl); protein tan (quang phổ, Bradford); hoạt lực proteolytic (Kunitz); điện di SDS-PAGE.

2. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

2.1. Khảo sát các mẫu mủ (latex)

2.1.1. Kết quả phân tích sơ bộ thành phần

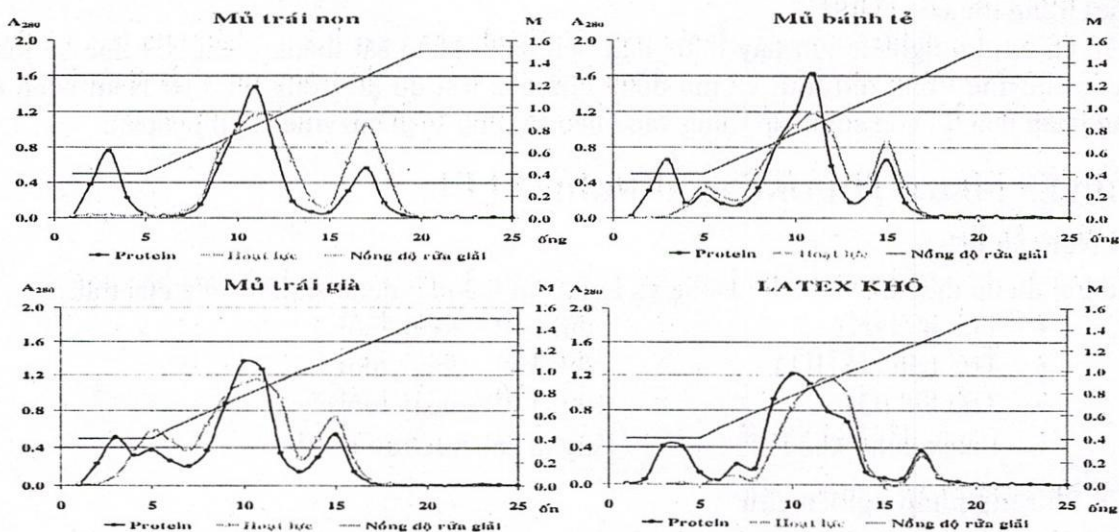
Bảng 1. Kết quả phân tích sơ bộ các mẫu mủ tươi

Loại mủ	Chất khô %	Protein thô %		Protein tan %		Tro (%)		Hoạt tính	
		CP	CK	CP	CK	CP	CK	UI/mg protein	UI/mg CP
N	17,43	9,35	53,64	5,88	33,73	1,44	8,26	4,14	0,24
BT	18,00	9,85	54,72	6,17	34,28	1,25	6,94	5,26	0,38
G	16,97	9,67	56,98	6,61	38,95	1,17	6,89	4,26	0,29
LK	93,13	38,18	41,0	35,91	38,56	6,49	6,97	4,57	1,64

Mẫu tươi có hàm lượng chất khô 16,97-18,0%, tương đối cao, cao nhất ở trái bánh tẻ. Protein tan giảm dần từ trái già đến trái non. Hoạt lực proteolytic cao nhất ở giai đoạn bánh tẻ. Latex đông khô có hàm lượng protein tan (35,91%) gấp 5-6 lần so với mẫu tươi ban đầu (khoảng 5,8-6,6%), hoạt lực riêng gần bằng hoạt lực của chế phẩm Merck.

2.1.2. Kết quả chạy sắc kí trao đổi ion

Qua đồ thị 1 ta thấy các peak protein ở các vị trí 1,2,3,4 được rửa giải lần lượt ở 0,4M; 0,42-0,46M; 0,62-0,91M; 1,1- 1,20M. Peak 1 không có hoạt tính; peak 2 không có ở trái non, peak 3 luôn chiếm hàm lượng cao nhất trong quá trình phát triển của trái cũng như trong latex khô. Dựa vào trình tự và lực rửa giải, cũng như thành phần ở bảng 2, tham khảo [1],[6],[8] chúng tôi nhận định peak 2,3,4 lần lượt là papain, chymopapain, peptidase.

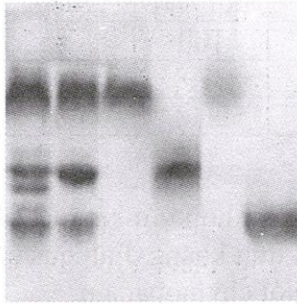


Hình 1. Sắc kí đồ các loại mủ trái đu đủ

Bảng 2. Tỷ lệ protein và hoạt lực các peak trong các mẫu latex tươi

Thứ tự peak	Tỷ lệ Protein %				Tỷ lệ Hoạt lực %			
	N	BT	G	LK	N	BT	G	LK
Peak 1	20,0	12,3	10,2	12,9	0	0	0	0,0
Peak 2	0,0	7,6	13,4	3,7	0	7,4	14,3	2,3
Peak 3	62,7	60,6	60,2	72,6	57,5	50,8	51,3	59,6
Peak 4	15,3	14,1	13,8	6,8	27,0	16,5	15,1	5,2

2.1.3. Kiểm chứng qua điện di SDS-PAGE



1 2 3 4 5 6

Hình 2. Điện di đồ SDS-PAGE latex và phân đoạn

- 1_ Latex đông khô
- 2_ Chế phẩm Merck
- 3,5_ peak 2 (papain)
- 4_ peak 3 (chymopapain)
- 6_ peak 4 (peptidase)

So sánh kết quả với các nghiên cứu [3][7], latex đông khô (cột 1) xuất hiện vạch đầu tiên - vạch papain thành phần, 3 vạch kế là chymopapain, vạch cuối cùng peptidase, thấy kết quả hoàn toàn phù hợp. Chế phẩm Merck cũng có 3 vùng tương ứng tuy nhiên chymopapain không đủ 3 vạch, có thể quá trình sản xuất chế phẩm làm thay đổi thành phần chymopapain.

Ở cột 3,4,5,6 là các vạch tương ứng với 3 phân đoạn sau sắc kí CM-cellulose. Các vạch xuất hiện trên điện di đồ cho thấy gần như qua cột sắc kí trao đổi ion các enzyme thành phần được tách ra riêng biệt. Như vậy lại một lần nữa các kết quả khẳng định trong các loại mù đừ đủ khảo sát chứa 3 loại enzyme có hoạt tính proteolytic là papain, chymopapain và peptidase.

Các kết quả khảo sát trên cho thấy latex tươi cũng như khô đều có hàm lượng chymopapain rất cao. Tiếp theo là quá trình khảo sát thu nhận enzyme chymopapain từ chế phẩm latex đông khô.

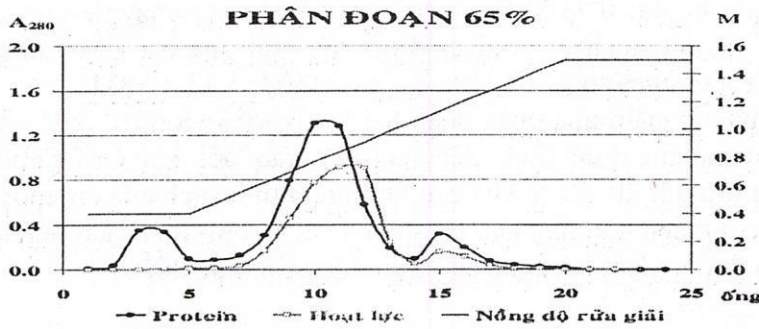
2.2. Tinh sạch enzyme chymopapain từ latex đông khô

2.2.1. Phân đoạn bằng (NH₄)₂SO₄ (xem kết quả bảng 3)

Sản phẩm sau khi phân đoạn sunphat amon cho qua sắc kí trao đổi ion CM-Cellulose

2.2.2. Kết quả chạy sắc kí phân đoạn 65% (NH₄)₂SO₄

Kết quả rửa giải thể hiện trên đồ thị 2. Có 3 peak protein rửa giải lần lượt tại 0,4M; 0,62-0,99M; 1,13-1,21M nhưng chỉ 2 trong 3 peak có hoạt lực proteolytic. So với kết quả khảo sát ở phần trước cho phép chúng tôi kết luận peak 2 là enzyme chymopapain và peak 3 là peptidase. Phân đoạn muối đã loại bỏ papain, tuy nhiên vẫn còn lẫn peptidase.



Hình 3. Sắc kí đồ phân đoạn 65% (NH₄)₂SO₄

Bảng 3. Tỷ lệ protein và hoạt lực phân đoạn 65% $(NH_4)_2SO_4$

Thứ tự peak	Tỷ lệ Protein %	Tỷ lệ Hoạt lực %
Peak 1	13,6	0,0
Peak 2	75,7	74,9
Peak 3	8,5	5,9

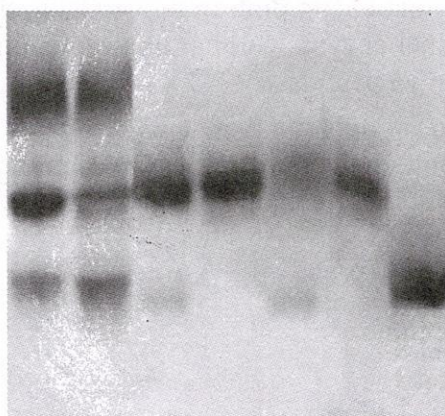
Qua bảng 3 ta thấy peak chymopapain chiếm 75,7% protein tổng và 74,9% hoạt lực tổng ban đầu. Kết quả đánh giá hiệu quả thu hồi thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Đánh giá hiệu quả thu hồi chymopapain

Phân đoạn	Protein (mg)	Hoạt lực (UI)	HLR (UI/mg protein)	Tỷ lệ hoạt tính	HS thu hồi (%)	Độ tinh sạch
Dịch lọc thô	1795,5	8205,4	4,57	59,6	100	1
Dịch 65%	433,8	2281,5	5,26	74,9	27,8	1,45
Peak 2	328,5	1710,0	5,21	100	20,8	1,91

2.2.3. Kiểm chứng qua điện di SDS-PAGE

Phân đoạn 65% chymopapain còn lẫn peptidase, kết quả điện di phù hợp với kết quả sắc kí trao đổi ion phân đoạn 65% ở đồ thị 2. Peak 2 và 3 có 1 vạch tương ứng khẳng định qua sắc kí trao đổi ion trên cột CM-Cellulose đã tách riêng được peptidase ra khỏi chymopapain.



Hình 3 - Điện di SDS-PAGE latex và phân đoạn

- 1 - Chế phẩm Merck
- 2 - Latex đông khô;
- 3,5 - phân đoạn 65% ;
- 4,6 - peak 2 (chymopapain);
- 7 - peak 3 (peptidase)

1 2 3 4 5 6 7

3. KẾT LUẬN

Trong mù trái đu đủ non không có enzyme papain, chỉ ở trái ở giai đoạn trưởng thành thì mới xuất hiện enzyme papain và hàm lượng này tăng dần lên khi trái ở giai đoạn lớn hơn. Enzyme chymopapain chiếm tỷ lệ khá cao trong tổng lượng enzyme của trái. Các enzyme thành phần papain, chymopapain, peptidase được rửa giải qua cột CM-Cellulose với hệ đệm acetate pH 5 lần lượt ở gradient 0,4 – 0,47M; 0,62 - 0,99M; 1,13-1,28M.

Khi tinh sạch chymopapain qua phân đoạn hai lần ở 45% và 65% $(NH_4)_2SO_4$ bão hòa loại trừ được hoàn toàn papain, tinh sạch tiếp qua cột trao đổi ion CM-Cellulose để loại trừ peptidase. Hiệu suất thu hồi 20,1% là khá cao nhưng độ tinh sạch của chymopapain đạt 1,91 là chưa cao. Từ kết quả nghiên cứu này làm cơ sở cho các hướng tinh sạch tiếp theo, khảo sát các yếu tố ảnh hưởng và thử nghiệm tác dụng của chymopapain tinh khiết.

STUDYING THE PURIFICATION OF ENZYME CHYMOPAPAIN IN VIETNAMESE *CARICA PAPAYA L.* FRUIT LATEX

Le Thi Phu, Nguyen Thi Thu Sang

Applied Science Faculty, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City

ABSTRACT: *Studying the compositions of the individual enzymes in the fresh fruit papaya latex through the different growing periods of the fruit by CM-Cellulose ion exchange chromatography revealed that chymopapain is always the most abundant protease for the portion and the activity in total. The result was the same with the freeze-dried papaya latex. The purification of chymopapain from the freeze-dried papaya latex in the ammonium sulfate fraction step showed that chymopapain is still contaminated with peptidase. Continuing to next ion exchange chromatography step and then examining by SDS-PAGE electrophoresis shows that this enzyme can preliminarily be isolated.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Đức Lượng (cb), *Công nghệ enzyme*, NXB ĐHQG Tp HCM, 2004.
- [2]. Barrett, Alan J; Buttle, David J.; Rich, Daniel H., *Pharmaceutical composition of purified chymopapain*, Patent No. 5468480. 1995.
- [3]. ВохонгНьан, ЛеТхиФу, Т.А.Валуева,Л.И.Григорьева, В.В.Мосолова, *Протеолитические ферменты из плодов Дынного дерева (Carica papaya.L.), прорастающего в условиях Вьетнама*, Москва, 1994.
- [4]. Dando PM et al. Department of Biochemistry, Strangeways Research Laboratory, Cambridge, UK, *unoglobulin E antibodies to papaya proteinases and their relevance to chemonucleolysis*, Spine. 1;20(9):981-5, May 1995 .
- [5]. Eugene J. Nordby, Manucher J.Javid, Winconsin university, US, *Continuing Experience with Chemonucleolysis*, 2000.
- [6]. Mitsuo Ebata and Kerry T.Yasunobu, *ymopapain, isolation, crystallization and preliminary characterization*, The Journal of Biological Chemistry, vol. 237, No.4 4/1962, p1086-1094.
- [7]. Rubens Monti et al. Biological Faculty, Estadual Paulista university, Brasil, *Purification of papain from fresh latex of Carica papaya*, Brazilian Archives of Biology and Technology, v.43, n.5, p. 501-507, 2000.
- [8]. Sidney P. Colowick, Nathan O.Kaplan, *Methods in Ezymology*, vol II, vol XIX, McCollum-Pratt Institute, the Jonh Hopkins university, Baltimore, Maryland.
- [9]. Staley Zucker et al, *The proteolytic activities of chymopapain, papain and papaya proteinase III.*, *Biochim. Biophys. Acta* 828,196-204, 1985.

