Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ 24 (2008) 23-27

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

Trần Thị Hồng*, Trần Hoàng Thanh, Nguyễn Thị Hà Giang

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 29 tháng 12 năm 2007

Tóm tắt. Bài báo đã tiếp thu những thành tựu trong lĩnh vực công nghệ enzyme và xử lý môi trường nước, nghiên cứu sử dụng Enzyme Peroxidase (POD) tách chiết từ củ cải trắng để xác định hàm lượng thủy ngân trong nước ô nhiễm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng protein trong củ cải là 0,1269 mg/g; Enzyme POD hoạt động mạnh nhất tại giá trị pH = 6,5; Ion Hg^{2+} ảnh hưởng đến hoạt tính của POD, enzyme hoàn toàn mất hoạt tính tại giá trị nồng độ 5mg/l Hg^{2+}. Đây là hướng nghiên cứu thân thiện với môi trường, có giá trị thực tiễn cao với phạm vi áp dụng rộng rãi.

1. Mở đầu

Củ cải trắng tên khoa học là Raphanus sativus L., thuộc họ cải Brassicaceae. Củ cải trắng chứa 92% nước, 1,5% protit, 3,7% glucit, 1,8% cellulose. Trong củ cải tươi có chứa glucose, pentosan, adenin, arginin, histidin, cholin, trigonellin, diastase... vitamin A, B, C. Rễ chứa glucosit enzyme và methyl mercaptan. Củ cải có vị ngọt hơi cay, đắng, tính bình không có độc, có tác dụng long đờm, trừ viêm...[1].

Enzyme Peroxidase (POD) là enzyme có nhiều trong củ cải trắng và các loại cây họ Đậu. POD được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt trong xử lý môi trường. POD được sử dụng để xúc tác cho quá trình xử lý các chất ô nhiễm khó phân hủy như phenol thường có mặt trong nước thải công nghiệp của các nhà máy lọc dầu, sản xuất sản phẩm cao su, chưng cất than đá này...[2].

Nước bị ô nhiễm thủy ngân là một vấn đề môi trường rất được quan tâm nghiên cứu do độc tính và các tác động của thủy ngân đối với thủy sinh vật và con người.

Trong bài báo này chúng tôi nghiên cứu sử dụng enzyme peroxidase tách chiết từ củ cải trắng để xác định hàm lượng thủy ngân trong nước ô nhiễm nhằm phát triển phương pháp sinh học dùng enzyme để phát hiện ion Hg^{2+} trong môi trường, một trong những ứng dụng có giá trị của loại củ cải được trồng phổ biến ở Việt Nam.

2. Thực nghiệm

2.1. Hóa chất và thiết bị nghiên cứu

a. Hóa chất

+ $(NH_4)_2SO_4$ tinh khiết.

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-5583001
E-mail: tthong@vnu.edu.vn

+ Dung dịch Na_2SO_3 0,05%.

+ Dung dịch đệm photphat (pH = 5,7 - 8,0).

+ Dung dịch chuẩn Casein 0,1%.

+ Chỉ thị Indigocacmin (Ind) 0,1%.

+ Dung dịch H_2O_2 3%.

b. Thiết bị

Máy xay sinh tố

Máy li tâm, Ranetki T30 (Nga)

Máy đo pH Hanan (Đức)

Máy UV - VIS (Labomed, INC)

2.2. Phương pháp chiết dung dịch enzyme

Cân 100g củ cải tươi, thái nhỏ, cho vào máy xay sinh tố, thêm 20 ml nước cất, xay nhuyễn thành dung dịch keo đặc. Thêm 100ml dung dịch Na_2SO_3 0,05%, khuấy đều, lọc bỏ cặn thô. Sau đó, đem ly tâm dung dịch lọc với tốc độ 3000 vòng/phút trong vòng 10 phút. Thu lấy dịch trong và loại bỏ cặn, xác định thể tích dung dịch (V) sau ly tâm, ta được dung dịch enzyme.

2.3. Phương pháp tách enzyme [3]

Cân 20g $(NH_4)_2SO_4$ tinh khiết, hòa tan dần vào 80ml dung dịch enzyme thu được ở trên cho đến khi $(NH_4)_2SO_4$ tan hết, ta được dung dịch enzyme chứa 20% $(NH_4)_2SO_4$. Sau đó, để lạnh 30 phút và ly tâm như trên. Thu được dịch trong I và kết tủa I.

Cho thêm $(NH_4)_2SO_4$ vào dịch trong I thu được ở trên đến nồng độ 40%, để lạnh 30 phút, li tâm thu được dịch trong II và kết tủa II. Thêm $(NH_4)_2SO_4$ vào dịch trong II cho đến nồng độ 60%, để lạnh 30 phút, li tâm, gạn lấy dịch trong III và kết tủa III.

Sau khi kết thúc quá trình kết tủa tiến hành xác định hoạt tính của POD để xem POD tách tốt ở giai đoạn nào. Tiến hành thẩm tích các kết tủa thu được trong túi xelophan với môi trường đệm axetat Na 0,01N. Sau 2h lại thay đổi dung dịch đệm Na. Tiếp tục như vậy cho đến khi không còn phản ứng của NH_4^+ trong dung dịch đệm sau quá trình thẩm tích thì kết thúc.

2.4. Phương pháp xác định hoạt độ của enzyme [4,5]

Sử dụng dung dịch enzyme tách được tại nồng độ $(NH_4)_2SO_4$ thích hợp để xác định hoạt độ của enzyme. Lấy 2 dãy bình tam giác 100ml, dãy đối chứng và dãy thí nghiệm cho vào mỗi bình 2ml nước cất, 2ml đệm photphat (pH = 6,0), thêm 3ml dung dịch enzyme, 1ml thuốc thử Indigocacmin 0,1%, lắc đều. Sau đó cho 2ml H_2O_2 3% và theo dõi quá trình mất màu của Indigocacmin tính theo thời gian từ khi bắt đầu cho H_2O_2 đến khi dung dịch chuyển sang màu vàng hơi xanh.

2.5 Phương pháp xác định hàm lượng Protein [6]

Lấy dãy ống nghiệm 10 ml, sử dụng dung dịch Casein chuẩn (0,01%) pha thành các dung dịch có nồng độ khác nhau. Đo độ hấp thụ của dãy dung dịch chuẩn ở bước sóng 280 nm. Dựa vào độ hấp thụ của dãy dung dịch chuẩn, xây dựng đường chuẩn để xác định hàm lượng protein trong mẫu.

2.6. Phương pháp xác định hàm lượng Hg^{2+} [3]

Peroxidase xúc tác cho quá trình oxy hóa Ind khi có mặt H_2O_2:

$$\underset{\text{(màu xanh)}}{\text{Ind}} + H_2O_2 \rightarrow \underset{\text{(màu vàng)}}{\text{Ind}} + H_2O + O_2$$

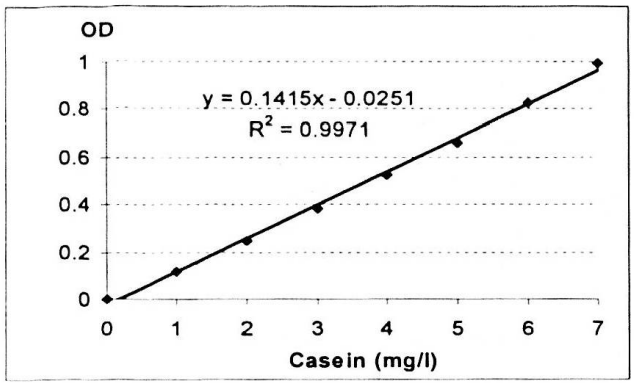
Khi enzyme bị ức chế bởi Hg^{2+}, tốc độ oxy hóa cơ chất sẽ nhỏ đi, thời gian mất màu dài hơn. Như vậy, thời gian mất màu tỉ lệ thuận với nồng độ Hg^{2+} ức chế enzyme.

Chuẩn bị dãy bình tam giác 100ml, cho vào mỗi bình 10ml dung dịch enzyme, 2ml dung dịch Hg^{2+} có nồng độ từ 0,5 đến 5mg/l và 1ml dung dịch thuốc thử Ind 0,1% rồi lắc đều. Sau đó, cho 2ml H_2O_2 3% . Tiến hành đo mật độ quang của dãy dung dịch tại bước sóng 670nm và theo dõi quá trình mất màu của dãy dung dịch. So sánh thời gian mất màu của dãy dung dịch với thời gian mất màu của bình đối chứng.

3. Kết quả

3.1. Khảo sát hàm lượng protein trong củ cải trắng

Xây dựng đường chuẩn để xác định hàm lượng protein trong dịch chiết của quá trình tách enzyme. Đồ thị chuẩn được xây dựng với dung dịch Casein có các nồng độ: 1; 2; 3; 4; 5; 6 và 7 mg/l. Sử dụng đồ thị chuẩn để xác định hàm lượng enzyme trong dịch chiết.



Hình 1. Đồ thị xác định hàm lượng protein theo lượng Casein

Phương trình đường chuẩn Casein là: y = 0,1415x - 0,0251

Trong đó: y là mật độ quang; x là hàm lượng protein.

Mật độ quang của dung dịch enzyme trong mẫu đo được là $y_1 = 0,574$.

Hàm lượng protein trong 10 ml mẫu phân tích là:

$$m_1 = \frac{10 \times (0,574 + 0,0251)}{(0,1415 \times 1000)} = 0,0423(mg)$$

Thể tích dung dịch chiết thu được từ 200g nguyên liệu là 300ml.

Hàm lượng protein trong trong 1g nguyên liệu được xác định theo công thức:

$$m_{protein} = \frac{V_1 . m_1 . N}{V_2 . a}$$

Trong đó:

V_1: Thể tích dịch chiết thu được sau ly tâm;

V_2: Thể tích mẫu đem đo.

m_1: Khối lượng protein trong V_2 ml mẫu đo;

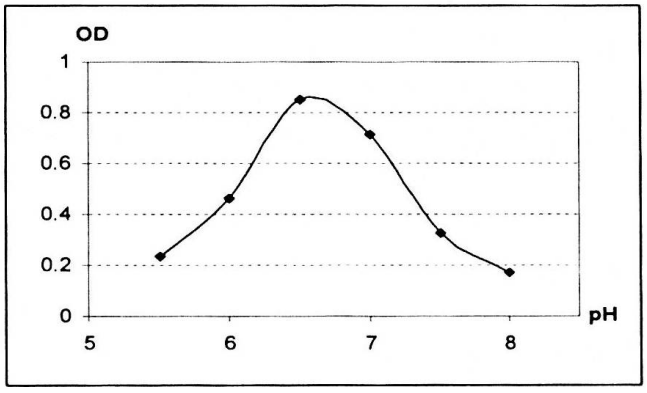
N: Hệ số pha loãng.

a: Khối lượng nguyên liệu chiết tách ban đầu (g).

$$m_{protein} = \frac{300 \times 0,0423 \times 20}{10 \times 200} = 0,1269(mg/g)$$

3.2. Xác định pH tối ưu cho hoạt độ của POD

Tiến hành xác định hoạt độ của enzyme POD trong môi trường đệm photphat có pH khác nhau (pH = 5,5 - 8,0). Kết quả hoạt độ của POD chỉ ra trong hình 2.

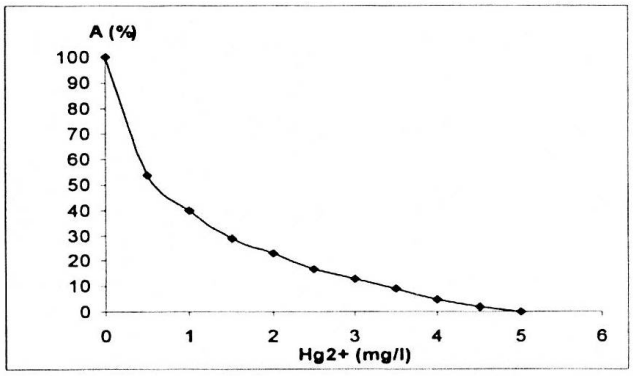


Hình 2. Ảnh hưởng pH đến hoạt độ của POD.

Qua hình 2 ta thấy, pH tối ưu cho phản ứng xúc tác của POD khoảng 6,5. Chúng tôi tiến hành các nghiên cứu tiếp theo tại giá trị pH = 6,5.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ Hg^{2+} đến hoạt độ của POD

Để đánh giá ảnh hưởng của Hg^{2+} đến hoạt độ của POD, chúng tôi tiến hành phản ứng ức chế với các nồng độ Hg^{2+} từ 0,5 - 5,0 mg/l. Kết quả được chỉ ra trong hình 3.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc hoạt độ của peroxidase vào nồng độ Hg^{2+}

Kết quả phân tích trong hình 3 cho thấy, hoạt độ của enzyme (A) tỷ lệ nghịch với hàm lượng ion Hg^{2+} trong khoảng nồng độ 0,5 - 5mg/l, khi nồng độ Hg^{2+} đạt đến 5 mg/l, enzyme hoàn toàn bị mất hoạt tính (A = 0%).

Thử nghiệm xác định nồng độ Hg^{2+} trong mẫu nước thải

Để thử nghiệm sử dụng POD xác định hàm lượng ion Hg^{2+} trong nước ô nhiễm, chúng tôi lấy mẫu nước thải chưa qua xử lý của Nhà máy khóa Việt Tiệp, tiến hành phản ứng ức chế enzyme POD theo các bước tương tự như với dung dịch chuẩn Hg^{2+}. Dựa vào thực nghiệm và đường chuẩn, chúng tôi tính toán được nồng độ Hg^{2+} trong mẫu nước thải chưa qua xử lý của Nhà máy khóa Việt Tiệp là 0.8 mg/l, phù hợp với kết quả phân tích tại Bộ môn Hóa học phân tích, Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy:

- Hàm lượng protein trong củ cải là 0,1269 mg/g. Enzyme POD hoạt động mạnh nhất tại giá trị pH = 6,5.

- Ion Hg^{2+} ảnh hưởng đến hoạt tính của POD, tại giá trị nồng độ Hg^{2+} là 5 mg/l, enzyme hoàn toàn mất hoạt tính.

Kết quả cũng chỉ ra rằng, có thể dùng POD để xác định hàm lượng ion Hg^{2+} trong nước ô nhiễm với nồng độ 0,5 - 5,0 mg/l.

Củ cải trắng là nguồn nguyên liệu phổ biến, rẻ và sẵn có. Ngoài ra, hóa chất sử dụng trong quá trình nghiên cứu không mang tính chất độc hại. Vì vậy, đây là hướng nghiên cứu thân thiện với môi trường, có giá trị thực tiễn cao, phạm vi áp dụng rộng.

Công trình được hoàn thành dưới sự hỗ trợ kinh phí của Chương trình Nghiên cứu cơ bản trong Khoa học Tự nhiên.

Tài liệu tham khảo

[1] Báo Khoa học Phổ thông 8/2004

[2] Kwang-SooShinI, Young Hwan Kimz, Long-Soon Lim3, Purification and Characterization of Manganese Peroxidase, *The Journal of Microbiology*, Vol. 43, No.6 (2005) 503.

[3] Trần Đình Toại, Đỗ Ngọc Lanh, Mai Hữu Tuyên, Nguyễn Thị Vân Hải, Nguyễn Thu Hoài, 1998, Nghiên cứu phương pháp sinh học sử dụng enzyme để đánh giá môi trường bị ô nhiễm bởi kim loại nặng, *Tuyển tập báo cáo khoa học - Trung tâm nhiệt đới Việt - Nga, quyển 4 - sinh thái nhiệt đới và công nghệ sinh học*, 1998, tr.155-167.

[4] Nguyễn Văn Mùi, *Xác định hoạt độ Enzyme*, NXB Khoa học và Kĩ thuật, Hà Nội, 2002.

[5] Trần Đình Toại, Nguyễn Thị Vân Hải, *Động học các quá trình xúc tác sinh học*, NXB Khoa học và Kĩ thuật, Hà Nội, 2005.

[6] Н.П. Мешкова; Северина С.Е., Практикум по биохимии. *Издательство Московского Университет*, 1979, 87-88.

Study of the application of peroxidase enzyme extracted from white radish in determination of mercury in contaminated water

Tran Thi Hong, Tran Hoang Thanh, Nguyen Thi Ha Giang

College of Science, VNU, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

We report the study of the application of peroxidase enzyme (POD) extracted from the white radish in determination of the mercury in contaminated water. The results showed that the amount of protein in white radish was 0,1269 mg/g; the activation of POD was achieved at the pH = 6,5 and the concentration of Hg^{2+} ions that deactivated the POD was 5 mg/l Hg^{2+}. This study is environment-friendly and has direct application in wide aspects.