

NGHIÊN CỨU THU NHẬN VÀ KHẢO SÁT ĐẶC TÍNH LIPASE TỪ MỦ ĐU ĐỦ (*CARICA PAPAYA LATEX*)

EXTRACTION OF LIPASE FROM PAPAYA LATEX AND EXAMINATION OF ITS CHARACTERISTICS

Phan Thị Việt Hà¹, Đặng Minh Nhật², Trần Thị Bích Hà²

¹Đại học Duy Tân; viethabk99@gmail.com

²Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng; dangminhnhat@dut.udn.vn

Tóm tắt - Lipase thu nhận từ thực vật có nhiều tính năng hấp dẫn có thể được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Trong nghiên cứu này, lipase thô được thu nhận từ phần không tan trong nước của mủ đu đủ. Một vài đặc tính hóa sinh của enzyme lipase này đã được xác định bằng phương pháp đo quang và phương pháp chuẩn độ. Kết quả cho thấy lipase thu được có hoạt tính cao và hoạt động tốt nhất ở nhiệt độ 45°C và pH tối thích là 8,5. Sự có mặt của ion Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, EDTA đều làm giảm hoạt độ của lipase, tuy nhiên mức độ kìm hãm enzyme của Ca²⁺, Mg²⁺ cao hơn nhiều so với Na⁺ và EDTA. Nghiên cứu này cũng đã tiến hành giải phóng thành công enzyme lipase ra khỏi “lớp vỏ bọc” nhựa cao su tự nhiên của nó. Hoạt động thủy phân của lipase này trên dầu cá lớn hơn nhiều so với dầu oliu.

Từ khóa - lipase; mủ đu đủ; đặc tính; đo quang; kìm hãm.

1. Đặt vấn đề

Lipase hay Triacylglycerol acylhydrolases (E.C. 3.1.1.3) là loại enzyme có khả năng xúc tác phản ứng thủy phân triacylglyceride có mạch dài tạo thành diacylglyceride, monoacylglyceride, glycerol và các acid béo tự do tại các bề mặt liên pha giữa nước và dung môi hữu cơ [13]. Lipase được ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành khác nhau như công nghệ thực phẩm, chất tẩy rửa, tổng hợp các chất hữu cơ, được phẩm và cả trong sản xuất nhiên liệu sinh học như biodiesel [15]. Lipase có thể được thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau như thực vật, động vật và vi sinh vật. Trong đó, lipase từ thực vật có nhiều ưu điểm như giá thành thấp, dễ dàng sử dụng như chất xúc tác sinh học ở dạng chế phẩm thô, nên gần đây loại enzyme này đã được quan tâm và nghiên cứu khá nhiều [3]. Đặc biệt, đu đủ được biết đến là loại trái cây thuộc vùng khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt giàu nguồn enzyme papain và chymopapain và caricain [4]. Các loại enzyme này được chiết ra như protein tan trong nước từ mủ, trong khi phần không tan trong nước có chứa lipase được coi như chất thải [11]. Cho đến nay đã có một số nỗ lực tìm cách hòa tan enzyme này nhưng chưa thành công [4]. Nhằm mục đích khai thác lipase từ các nguồn thực vật để kiểm, rẽ tiền này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu thu nhận lipase từ mủ đu đủ và khảo sát đặc tính của nó. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng nhằm thử nghiệm giải phóng lipase ra khỏi lớp “vỏ” cố định.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu, hóa chất

Mủ đu đủ: được thu từ giống đu đủ (*Carica papaya L.*) trồng tại Đại Lộc, tỉnh Quảng Nam. Mủ đu đủ lấy ở quả xanh khi còn trên cây. Dùng dao inox có đầu nhọn rạch dọc theo quả ở phần đường kính quả to nhất. Hứng lấy mủ chảy ra

Abstract - Lipase from plants, which possesses various interesting features, could be utilized for application in different fields. In this study, the crude lipase is obtained from the insoluble fraction of papaya latex. Some biochemical properties of this lipase are studied by two methods: titrimetric and photometric one. The results show that the catalytic activity of the lipase from papaya latex is high and optimized at the temperature 45 °C and the pH 8.5. The presence of Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, EDTA decreases the activity of lipase. However, the inhibition degree of Ca²⁺ and Mg²⁺ is much higher than Na⁺ and EDTA. This research also aims at successfully releasing lipase out of “its natural rubber covering”. This lipase hydrolyzes fish oil at much larger activity than olive oil.

Key words - lipase; papaya latex; characteristics; photometric; inhibit.

bằng lọ nhựa miệng rộng, mủ được làm lạnh đông ở -20°C, sau đó được đem sấy thăng hoa ở 40°C trong 8 giờ, thu được mẫu ở dạng bột. Mẫu được bảo quản lạnh ở 4°C trong chai nhựa đầy kín đến khi sử dụng cho nghiên cứu [1].

- Dầu oliu, dầu cá.

- Hóa chất cho phương pháp chuẩn độ: Gum Arabic, natri benzoat, acetone, cồn 96%, Tris Base, Na₂HPO₄.12H₂O, NaH₂PO₄.7H₂O, HCl 0,5%; NaOH 0,05N, CH₃COOH, CH₃COONa, Na₂CO₃, NaHCO₃, CaCl₂, MgCl₂, KCl, NaCl.

- Hóa chất cho phương pháp đo quang: 2-propanol, p-nitrophenyl pamtate (p-NPP), p-Nitrophenol (p-NP), gum Arabic, Triton-X 100, Tris-HCl.

- Hóa chất thử nghiệm hòa tan nhựa đu đủ: 2-propanol, natri lauroyl sarcosinate, n-hexan, Tris-HCl 0,1M, pH=8. Hóa chất sử dụng thuộc hãng Sigma, Merk, Trung Quốc và đạt chuẩn phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp hóa học

Thành phần hóa học của mủ đu đủ được xác định theo các phương pháp sau:

- Xác định độ ẩm và hàm lượng tro theo phương pháp của AOAC 952.08 và AOAC 938.08 (1990) [8].

- Xác định hàm lượng protein thô: Bằng phương pháp Kjeldahl [2].

- Xác định hàm lượng chất béo: Bằng phương pháp chiết Soxhlet [2].

2.2.2. Phương pháp thu nhận enzyme thô từ mủ đu đủ

Cân 1,63g mủ khô cho vào 55ml nước cất, khuấy 3 phút. Ly tâm lạnh mẫu 6000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Loại bỏ dịch nổi, thu tủa. Quá trình này được lặp lại 3 lần.

Tủa được làm lạnh đông ở -20°C , sau đó được sấy bằng phương pháp sấy thăng hoa ở 40°C trong 8h. Nghiền mịn mẫu, ta thu được chế phẩm lipase dạng thô, bảo quản trong bình thủy tinh đầy kín [5], [14].

Hiệu suất thu nhận chế phẩm lipase thô = $(\text{Khối lượng lipase sau sấy} / \text{khối lượng mẫu khô}) \times 100\%$.

2.2.3. Phương pháp chuẩn độ

Hoạt độ enzyme lipase được xác định theo phương pháp chuẩn độ [4]: Chuẩn bị hệ nhũ tương gồm 180 ml nước cất, 0,4g natri benzoat, 20 ml dầu olive và 4g gum arabic. Sau đó đánh tan bằng máy đồng hóa siêu âm trong 5 phút, thu được hệ nhũ tương đồng nhất. Mỗi mẫu phân tích bao gồm 5ml dầu olive đã được nhũ hóa, 5ml dung dịch đệm Tris - HCl 0,1M (pH=8) và lượng enzyme phù hợp, lắc đều và ủ ở 35°C trong 30 phút. Dừng phản ứng bằng cách cho thêm 15ml hỗn hợp acetone: etanol (1:1). Mẫu thu được đem chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,05N với chỉ thị phenolphthalein 1%. Thể tích dung dịch NaOH 0,05N dùng để chuẩn độ mẫu phân tích là b, mẫu trắng là a.

Hoạt độ lipase (U/g hoặc U/ml) được tính theo công thức:

$$\text{Hoạt độ} = \frac{(b-a)0,05.1000}{t.m}$$

Trong đó: t là thời gian phản ứng thủy phân xảy ra (phút), m: lượng enzyme tham gia phản ứng (g hoặc ml); 0,05 là nồng độ đương lượng gam của NaOH.

2.2.4. Phương pháp đo quang

+ Xây dựng đường chuẩn:

Hòa tan cơ chất chuẩn *p*-NP vào dung dịch gồm 4860μl dung dịch B và 540 μl dung dịch A sao cho có nồng độ *p*-NP tăng dần: 0.01, 0.03, 0.06, 0.09, 0.012, 0.015, 0.021. Đem đo giá trị OD và xây dựng đường chuẩn.

+ Hoạt độ của enzyme được đo như sau:

- Chuẩn bị 2 dung dịch:

Dung dịch A: Cho 0,03g *p*-NPP vào 10ml 2-propanol, đánh siêu âm 2 phút.

Dung dịch B: Cho 0,18g gum Arabic, 720μl triton-X 100 vào bình tam giác 250ml có chứa 180ml tris-HCl, hòa tan trên máy lắc.

- Tiến hành:

Dung dịch gồm 4860 μl dung dịch B và 540 μl dung dịch A được nâng lên nhiệt độ cần khảo sát. Cho 0.0015g enzyme vào. Để phản ứng xảy ra trong vòng 5 phút. Dừng phản ứng bằng cách lọc enzyme qua xilanh có bông không thấm.

Đo độ hấp thụ ở bước sóng 410 nm với mẫu trắng là mẫu chuẩn bị tương tự như mẫu khảo sát hoạt độ enzyme, chỉ khác là bỏ 540 μl 2-propanol thay cho 540 μl dung dịch A.

Hoạt độ enzyme: một đơn vị hoạt độ được tính là lượng enzyme cần thiết để giải phóng ra 1 μmol *p*-nitrophenol trong một phút [7].

2.2.5. Nghiên cứu tách lipase ra khỏi cấu trúc nhựa đu đủ

+ Chuẩn bị dung dịch:

- Dung dịch A: dung dịch gồm n-hexan: 2-propanol tỉ lệ 1:1.

- Dung dịch B: dung dịch gồm Tris-HCl 0.1M pH=8, muối Natri lauryl sarcosine 0,5%.

+Tiến hành tinh sạch:

Cân 1g enzyme thô cho vào 50ml dung dịch A ở 4°C , lắc 30 phút, đem ly tâm tốc độ 7500 vòng ở 4°C , 20 phút, thu lấy phần cặn và lỏng riêng biệt, đem cô quay chân không để tách dung môi trong phần cặn. Sau đó, tiếp tục hòa vào dung dịch B nhiệt độ 4°C sao cho nồng độ 0,02g/ml, lắc 30 phút, rồi đem ly tâm 7500 vòng, 4°C , trong 20 phút. Phần cặn và phần lỏng đều được giữ lại và để riêng biệt, phần cặn đem sấy thăng hoa, phần lỏng được giữ lạnh trong bình [14].

Đem phần lỏng đi sấy khô đến khối lượng không đổi, đo hoạt độ của enzyme ở cả phần cặn sau ly tâm và phần rắn thu được sau khi sấy khô mẫu lỏng bằng phương pháp đo quang như mục 2.2.4.

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả phân tích được thể hiện là giá trị trung bình của 3 thí nghiệm lặp. Sai khác ý nghĩa giữa các mức được đánh giá bằng phân tích ANOVA, sử dụng phần mềm Minitab 16.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Thu nhận và xác định thành phần mẫu đu đủ

Tiến hành thu nhận enzyme lipase thô từ mẫu đu đủ theo quy trình mô tả ở mục 2.2.2. Hiệu suất thu nhận chế phẩm lipase thô từ mẫu đu đủ khô được xác định là 17,91%.

Độ ổn định của nguyên liệu ban đầu có vai trò quan trọng, đánh giá chất lượng enzyme thu nhận được. Do đó thành phần hóa học của mẫu đu đủ được xác định theo mục 2.2.1 và kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

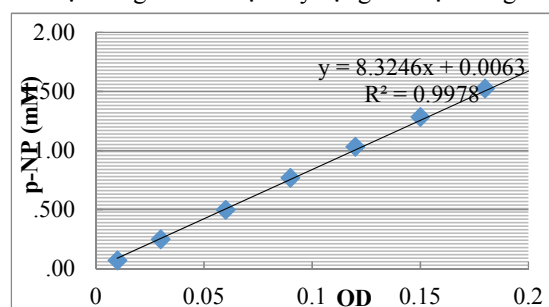
Bảng 1. Thành phần hóa học của mẫu đu đủ

STT	Thành phần	Hàm lượng (%)
1	Hàm lượng ẩm	77,53
2	Tro toàn phần	3,07
3	Protein	6,23
4	Chất béo	1,86

Độ ẩm trong mẫu đu đủ tương đối cao, do đó mẫu đu đủ sau khi thu nhận từ vườn phải đưa đi bảo quản lạnh ngay để tránh bị hư hỏng làm giảm hoạt độ của enzyme. Hàm lượng protein trong mẫu đu đủ khá cao, đây là chỉ tiêu đánh giá hàm lượng lipase, vì bản chất của enzyme là protein. Trong khi đó hàm lượng tro thấp chứng tỏ tạp chất ít và chất béo thấp là điều kiện thuận lợi cho việc tinh sạch enzyme mà không cần loại chất béo.

3.2. Xây dựng đường chuẩn xác định *p*-NP

Đồ thị đường chuẩn được xây dựng thể hiện trong Hình 1.



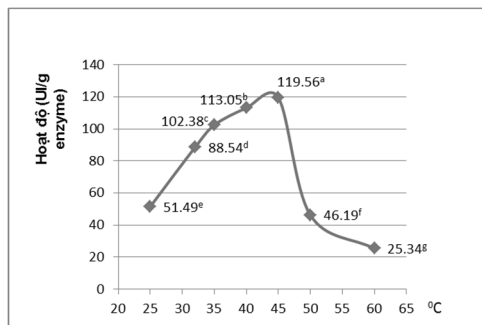
Hình 1. Đồ thị đường chuẩn

Đường chuẩn thể hiện mối quan hệ tuyến tính giữa nồng độ p -NP và độ hấp thụ tại bước sóng 410nm. Dựa trên đồ để xác định được nồng độ p -NP tương ứng sau phản ứng giữa enzyme lipase và cơ chất p -NPP, từ đó xác định được hoạt độ của lipase.

3.3. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ lipase từ mù ấu ấu

3.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính lipase từ mù ấu ấu

Cố định hàm lượng cơ chất và pH môi trường ở giá trị 8, theo dõi hoạt độ lipase ở các điều kiện nhiệt độ môi trường phản ứng thay đổi từ 25°C đến 60°C với bước nhảy 5°C nhờ bể ổn nhiệt [4]. Hoạt độ lipase được xác định theo mục 2.2.4. Kết quả khảo sát được thể hiện trên đồ thị Hình 2.



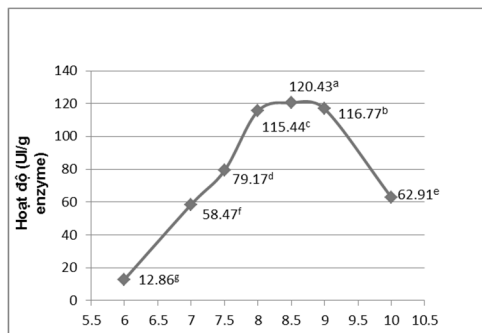
Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ của lipase từ mù ấu ấu

*Ghi chú: Các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa ($p>0,05$).

Đồ thị trên cho thấy rằng hoạt độ của lipase tăng dần khi nhiệt độ tăng từ 25°C đến 45°C, sau đó giảm dần khi tiếp tục tăng nhiệt độ từ 45°C đến 60°C. Hoạt độ lipase đạt giá trị cao nhất là 119,56 UI/g ở 45°C. Điều này tuân theo quy luật của phản ứng enzyme, nghĩa là khi nhiệt độ tăng thì tốc độ phản ứng enzyme tăng và nếu nhiệt độ tăng cao quá thì protein của enzyme bị biến tính làm cho enzyme bị vô hoạt. Nhiệt độ tối ưu này thấp hơn công bố trong nghiên cứu của Abdelkafi S và cộng sự, với nhiệt độ hoạt động tối ưu của lipase thu từ mù ấu ấu là 50°C [4]. Nguyên nhân có thể do sự khác biệt về giống ấu ấu sử dụng trong nghiên cứu.

3.3.2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ lipase từ mù ấu ấu

Cố định nhiệt độ phản ứng ở 45°C và hàm lượng cơ chất, sử dụng hệ đệm, thay đổi giá trị pH môi trường phản ứng từ 6 đến 10 [4]. Kết quả theo dõi ảnh hưởng của pH đến hoạt độ phân giải lipid được thể hiện trên đồ thị của Hình 3.



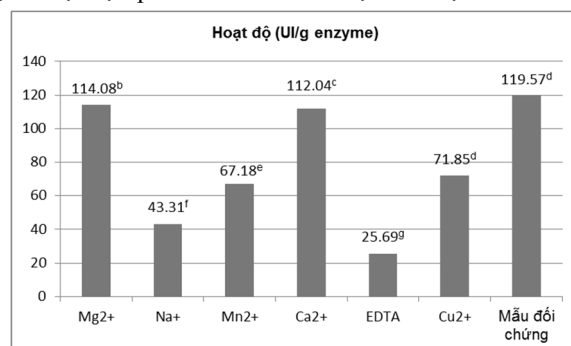
Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ của lipase từ mù ấu ấu

*Ghi chú: Các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa ($p>0,05$).

Kết quả trên Hình 3 cho thấy khi pH tăng dần từ 6 đến 8,5 thì hoạt độ lipase cũng tăng dần, sau đó hoạt độ lipase giảm dần khi pH tăng từ 8,5 đến 10. Điều này cũng dễ thấy rằng mỗi enzyme hoạt động tốt nhất tại giá trị pH xác định, nếu thay đổi pH của môi trường sẽ làm thay đổi điện tích của enzyme dẫn đến làm thay đổi hình dạng của enzyme vì vậy sẽ làm giảm hoạt động của enzyme. Trên Hình 3, chúng ta dễ dàng nhận thấy lipase từ mù ấu ấu hoạt động trong khoảng pH 8-9 với hoạt độ lớn nhất đạt được là 120,43 UI/g tại giá trị pH=8,5. Giá trị pH này thấp hơn kết quả của Abdelkafi S và cộng sự khi nghiên cứu lipase từ mù ấu ấu, với pH tối ưu ở giá trị 9 [4].

3.3.3. Ảnh hưởng của các ion đến hoạt độ lipase

Lipase được ứng dụng nhiều trong ngành công nghiệp sản xuất bột giặt nên khả năng giữ được hoạt tính khi có mặt các ion trong hỗn hợp rất quan trọng. Tùy vào nồng độ và loại ion mà sẽ làm tăng hay giảm hoạt độ của enzyme. Trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của sự có mặt các ion Mg^{2+} , Na^{+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , EDTA, Cu^{2+} , sử dụng các mẫu có chứa dung dịch chứa Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ở dạng muối clorua 0,1M sao cho nồng độ trong dung dịch cơ chất là 1mM và mẫu đối chứng được thay dung dịch muối bằng nước cất 2 lần [9]. Kết quả xác định hoạt độ lipase của các mẫu được thể hiện trên Hình 4.



Hình 4. Ảnh hưởng của ion kim loại và EDTA đến hoạt độ enzyme

*Ghi chú: Các giá trị được đánh dấu bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa ($p>0,05$).

Kết quả trên cho thấy, tất cả các ion đều làm giảm hoạt độ lipase từ mù ấu ấu. Tuy nhiên, Mg^{2+} , Ca^{2+} ít ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme, trong khi đó, Cu^{2+} , Mn^{2+} làm giảm gần 2 lần và EDTA, Na^{+} ảnh hưởng mạnh nhất đến hoạt độ của loại lipase này. Kết quả trên tương tự như nghiên cứu của Kanmani và cộng sự [10]. Điều này có thể giải thích là do các ion kim loại trên có thể tương tác với các nhóm mang điện trên phân tử enzyme theo các cách khác nhau, làm thay đổi hình dạng trung tâm hoạt động của enzyme theo hướng có lợi hoặc bất lợi cho sự tiếp xúc với cơ chất và sự xúc tác của enzyme.

3.4. Thử nghiệm ứng dụng dùng lipase ấu ấu thủy phân dầu cá và so sánh mức độ thủy phân trên dầu oliu

Tiến hành khảo sát hoạt độ trên dầu oliu và dầu cá theo quy trình đã nêu ở mục 2.2.3. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2:

Bảng 2. Hoạt độ lipase trên dầu oliu và dầu cá

Cơ chất	Dầu oliu	Dầu cá
Hoạt độ (UI/g)	268.9 ^b	1408.9 ^a

Kết quả cho thấy hoạt độ lipase trên dầu cá cao hơn nhiều so với trên dầu oliu, nguyên nhân là do tính đặc hiệu cơ chất của lipase. Ứng với mỗi cơ chất khác nhau cho khả năng thủy phân chất béo khác nhau [6].

Nghiên cứu chứng minh lipase đu đủ có khả năng thủy phân dầu cá cao, đây là một nguồn cơ chất đầy tiềm năng trong công nghệ làm giàu hàm lượng DHA, bổ sung vào các sản phẩm thực phẩm và dược phẩm [12].

3.5. Nghiên cứu tách lipase ra khỏi cấu trúc nhựa đu đủ

Sau tinh sạch, từ 1g enzyme thô ban đầu ta thu được 45ml dịch lỏng và 0,5g cặn khô, khảo sát nhận thấy không có hoạt độ lipase trong dịch lỏng. Tiếp tục xử lý 0,5g phần cặn đó như mục 2.2.5 thì thu được 22,5 ml dịch lỏng và 0,2815g cặn khô. Khối lượng chất khô trong dung dịch lỏng sau khi sấy là 0,2105g. Hoạt độ lipase thể hiện ở Bảng 3:

Bảng 3. Hoạt độ enzyme thô và enzyme sau xử lý hòa tan

	Enzyme từ phần rắn	Enzyme từ phần lỏng	Enzyme thô
Hoạt độ (UI/g)	17,30 ^c	20,07 ^b	108,55 ^a

Kết quả cho thấy cả phần rắn và lỏng đều có hoạt độ lipase, điều đó chứng tỏ một phần enzyme lipase đu đủ vốn dĩ được cố định tự nhiên trong “lớp bọc cao su tự nhiên” của nó đã được giải phóng ra bên ngoài dung dịch lỏng. Đây là một phát hiện có ý nghĩa lớn, làm cơ sở để thu nhận enzyme lipase đu đủ tinh khiết. Từ đó, tạo điều kiện thuận lợi cho việc nghiên cứu các đặc tính và cấu trúc của enzyme này. Tuy nhiên, tổng hoạt độ của enzyme thu được từ phần lỏng và phần rắn là 47,37 UI/g nhỏ hơn nhiều so với hoạt độ enzyme thô ban đầu (108,55 UI/g). Chứng tỏ một phần đáng kể enzyme đã bị biến tính trong quá trình này.

4. Kết luận

Qua quá trình nghiên cứu chúng tôi đã xác định được thành phần hóa học của mù đu đủ, thu nhận được chế phẩm lipase thô từ mù đu đủ. Lipase từ mù đu đủ là một enzyme chịu kiềm, chịu nhiệt tốt. Hoạt động tối ưu ở nhiệt độ 45°C và pH = 8,5. Ion Ca²⁺, Mg²⁺ ít ảnh hưởng đến hoạt độ lipase từ mù đu đủ. Trong khi đó, ion Mn²⁺, Cu²⁺ làm giảm gần 2 lần và Na⁺, K⁺ ức chế mạnh đến khả năng thủy phân chất béo

của lipase. Lipase thu được hoạt động trên cơ chất là dầu cá tốt hơn là dầu oliu. Bên cạnh đó, đây là nghiên cứu đầu tiên tiến hành giải phóng được lipase ra khỏi lớp nhựa cao su bao bọc bên ngoài. Đó là tiền đề cho việc nghiên cứu sâu hơn với cấu trúc và thành phần của lipase của mù đu đủ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Đức Lương, *Công nghệ enzyme*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh (2004).
- [2] Nguyễn Văn Mùi, *Thực hành Hóa sinh học*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội (2001).
- [3] Đặng Thị Thu, *Nghiên cứu công nghệ sản xuất một số loại dầu béo bằng lipase*, Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật, Đề tài cấp nhà nước, Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Công nghệ thực phẩm Hà Nội (2004).
- [4] Abdelkafi S., et al (2011), “Carica papaya lipase: A naturally immobilized enzyme with interesting biochemical properties”, *Plant foods human nutrition*, 66(1), pp 34-40.
- [5] Carla Tecelao, et al (2012) “Carica papaya latex: A low-cost biocatalyst for human milk fat substitutes production”, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(3), pp. 266-276.
- [6] Christoph Brunschweiler, et al (2013), “Direct measurement of rice bran lipase activity for inactivation kinetics and storage stability prediction”, *Journal of Cereal Science*, 58(2), pp. 272-277.
- [7] Frederic Beisson, et al (2000), “Methods for lipase detection and assay: a critical review”, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102 (2), pp. 133-153.
- [8] Helrich K- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990.
- [9] Kanmani P., et al (2015), “Rice Bran Lipase: Partial Purification, Immobilization in Calcium Alginate Beads, Characterization and Application as a Detergent Additive”, *World Applied Sciences Journal*, 33(6), pp. 1052-1058.
- [10] Muhannad I., et al (2011), “Production and characterization of lipase from *Bacillus stearothermophilus*”, *African Journal of Biotechnology*, 10(61), pp. 13139-13146.
- [11] Nathalie Barouth, Slim Abdelkafi (2010), “Neutral lipid characterization of Non – water – soluble fractions of Carica papaya latex”, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87 (9), pp 987–995.
- [12] Patrícia de Oliveira Carvalho, et al (2002), “Enzymic Enhancement of ω 3 Polyunsaturated Fatty Acids Content in Brazilian Sardine Oil”, *Acta Farm. Bonaerense* 21 (2), pp. 85-88.
- [13] Raja Noor Zaliha Abdul Rahman, et al (2012), *New lipase and Protease*, Nova Science Publishers, Inc, pp 1- 22 (2006).
- [14] Rivera I, Mateos-Diaz JC, Sandoval G (2012), “Plant lipases: partial purification of Carica papaya lipase”, *Methods Mol Bio*, 861, pp. 115-122.
- [15] Sonali Seth, et al (2014), “An insight into plant lipase research - challenges encountered”, *Protein Expression and Purification*, 95, pp 13-21.

(BBT nhận bài: 05/10/2016, phản biện xong: 07/11/2016)