

## THU NHẬN VÀ TINH SẠCH $\beta$ -GALACTOSIDASE TỪ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

Nguyễn Thị Vân Linh<sup>(1)</sup>, Nguyễn Thị Thùy Dung<sup>(2)</sup>, Trần Bích Lam<sup>(2)</sup>

(1) Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

(2) Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG – HCM

(Bài nhận ngày 18 tháng 12 năm 2012, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 09 tháng 01 năm 2013)

**TÓM TẮT:**  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23) hay còn gọi là lactase, là một enzyme có ứng dụng rất quan trọng trong công nghiệp sữa. Từ nguồn vi khuẩn lactic *Lactobacillus acidophilus* có hoạt tính  $\beta$ -galactosidase cao và ổn định, việc nghiên cứu thu nhận enzyme thô được tiến hành bằng phương pháp trích ly kết hợp xử lý sóng siêu âm và kết tủa bởi các tác nhân là muối trung tính và dung môi hữu cơ. Tác nhân kết tủa tốt nhất là isopropanol với hiệu suất thu hồi 89,93% và độ tinh sạch 4,5lần. Chế phẩm enzyme được tinh chế qua cột Ultrahydrogel 250, độ tinh sạch tăng 14,3 lần. Đã xác định được phân tử lượng của  $\beta$ -galactosidase khoảng 40 kDa. Chế phẩm sau khi tinh sạch có hoạt tính tối ưu ở 40°C, pH 7 – 7,5 có giá trị  $V_{max}$  và  $K_m$  lần lượt là 2,3  $\mu$ mol/phút và 0,73 mM.

**Từ khóa:** thu nhận  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase từ *L. acidophilus*.

### MỞ ĐẦU

$\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23) hay còn gọi là lactase xúc tác phản ứng thủy phân lactose thành glucose và galactose và phản ứng chuyển nhóm galactosyl tạo thành các galacto-oligosaccharide [1, 2]. Đây là một enzyme có nhiều ứng dụng quan trọng trong công nghệ thực phẩm, sinh học cũng như trong kỹ thuật và môi trường [3, 4].  $\beta$ -Galactosidase có thể thu nhận từ nấm mốc, nấm men và vi khuẩn. Tuy nhiên, vi khuẩn lactic là nguồn cung cấp  $\beta$ -galactosidase tiềm năng vì chúng an toàn và là những probiotic, điều kiện lên men dễ dàng, hoạt tính  $\beta$ -galactosidase cao và ổn định [5]. Trong số các vi khuẩn lactic thì giống

*Lactobacillus acidophilus* nhận được nhiều sự quan tâm của các nhà nghiên cứu bởi vi khuẩn này có hoạt tính  $\beta$ -galactosidase rất cao. Mục đích của nghiên cứu này là thu nhận và tinh sạch  $\beta$ -galactosidase từ *L. acidophilus*. Chế phẩm sau khi tinh sạch bằng phương pháp kết tủa và lọc gel được xác định các tính chất  $T_{opt}$ ,  $pH_{opt}$ , sự ổn định nhiệt, sự ổn định pH và hằng số Michaelis  $K_m$  và  $V_{max}$ .

### VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

#### Nguyên vật liệu

Nguồn giống *Lactobacillus acidophilus* AS186 được cung cấp từ Bộ môn Công nghệ Sinh học trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh. Giống được bảo quản trên môi trường thạch nghiêng MRS agar, 4°C, cấy

chuyển định kỳ 1 lần/tháng. Xác định nồng độ protein hòa tan sử dụng thuốc thử Lowry (Merck) và chất chuẩn Albumin huyết thanh bò (Merck), xác định hoạt tính dùng ONP (Merck) và ONPG (Merck). Thiết bị siêu âm (Sonic vibracell – VC750), thiết bị ly tâm (Sigma-Aldrich), hệ thống sắc ký lọc gel (Agilent).

#### **Phương pháp thu sinh khối và thu enzyme $\beta$ -galactosidase thô**

Giống vi khuẩn được hoạt hóa trong môi trường MRS lỏng và được nuôi trong môi trường cảm ứng sinh  $\beta$ -galactosidase gồm: lactose (10 g/l), cao nấm men (60 g/l), cao thịt (10 g/l), Tween 80 (6 g/l),  $K_2HPO_4$  (3 g/l),  $KH_2PO_4$  (1 g/l),  $CH_3COONa$  (3 g/l),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,5 g/l),  $MnSO_4$  (0,15 g/l). Quá trình lên men thực hiện trong erlen 500 ml, ở 37°C, pH 6,0, tốc độ lắc 100 vòng/phút trong 50 giờ. Kết thúc quá trình lên men, ly tâm canh trường 5000 vòng/phút trong 15 phút, ở 4°C thu nhận sinh khối. Rửa sinh khối hai lần bằng dung dịch đệm sodium phosphate 0,05M, pH 7,0. Bảo quản sinh khối ở -20°C cho đến khi cần sử dụng.

Để thu nhận  $\beta$ -galactosidase, tế bào vi khuẩn được phá vỡ bằng phương pháp xử lý sóng siêu âm dịch huyền phù vi sinh vật 5% w/v trong đệm sodium phosphate pH 7,0, công suất siêu âm 396kW, thời gian siêu âm 3,2 phút. Dịch huyền phù sau khi xử lý sóng siêu âm được đem ly tâm ở 6000 vòng/phút, 4°C, 15 phút, để thu dịch enzyme thô.

#### **Phương pháp xác định hoạt tính enzyme**

Hoạt tính  $\beta$ -galactosidase được xác định theo phương pháp Mahoney và Whiteker (Mahoney

et al., 1998). Cơ chất ONPG (Ortho-nitrophenyl- $\beta$ -d-galactopyranoside) được chuẩn bị với nồng độ 3mM trong dung dịch đệm sodium phosphate 0,05M, pH 7,0. Một đơn vị hoạt tính được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng ra 1 $\mu$ mol ONP (O-nitrophenol) trong một phút ở điều kiện phân tích xác định.

#### **Khảo sát sự ảnh hưởng của các tác nhân kết tủa protein enzyme**

Để kết tủa protein enzyme thử nghiệm các tác nhân là muối trung tính và dung môi hữu cơ. Thay đổi nồng độ  $(NH_4)_2SO_4$  (w/v) lần lượt: 25,1%; 31,4%; 39%; 47,2%; 56,1%; 65,7%; 76,1%, nồng độ NaCl (w/v) lần lượt: 15%, 20%, 25%, 30% và 35%, và dung môi hữu cơ (ethanol, isopropanol, acetone) với tỷ lệ giữa thể tích dung môi và thể tích dịch enzyme lần lượt: 50:50, 55:45, 60:40, 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, 85:15 và 90:10. Xác định tác nhân kết tủa protein enzyme hiệu quả nhất.

#### **Tinh sạch enzyme bằng sắc ký lọc gel**

Quá trình tinh sạch thực hiện bằng hệ thống sắc ký lọc gel (GPC – Agilent 1100series) sử dụng cột Ultrahydrogel 250. Cột được cân bằng và rửa giải bằng dung dịch đệm sodium phosphate 0,05M, pH 7,0. Tốc độ dòng là 1ml/phút, áp lực bơm 41 bar. Thu nhận các phân đoạn và xác định hoạt tính  $\beta$ -galactosidase. Xác định phân đoạn có chứa enzyme  $\beta$ -galactosidase.

Khối lượng phân tử của enzyme tinh sạch được xác định bằng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE.

**Công thức xác định hiệu suất thu hồi protein enzyme và độ tinh sạch của chế phẩm**

Hiệu suất thu hồi protein enzyme (H, %) được xác định theo công thức:

$$H(\%) = \frac{U_t}{U_0} \times 100\%$$

Với:  $U_t$  là tổng đơn vị hoạt độ của chế phẩm

$U_0$  là tổng đơn vị hoạt độ của dịch enzyme ban đầu

**Độ tinh sạch của chế phẩm (DTS, lần) được xác định theo công thức**

$$DTS = \frac{U_{r_t}}{U_{r_0}} \times 100\%$$

Với:  $U_{r_t}$  là hoạt độ riêng của chế phẩm

$U_{r_0}$  là hoạt độ riêng của dịch enzyme ban đầu

**Xác định nhiệt độ tối ưu và pH tối ưu**

Để xác định nhiệt độ tối ưu, thay đổi nhiệt độ môi trường phản ứng trong khoảng từ 30 – 70°C và xác định hoạt tính  $\beta$ -galactosidase.

Để xác định pH tối ưu, thay đổi pH môi trường phản ứng từ 3 – 9 sử dụng các dung dịch đệm là: acetate 0,05M, pH 3 – 4,5; phosphate 0,05M, pH 5 – 8, borate, pH 8,5 – 9.

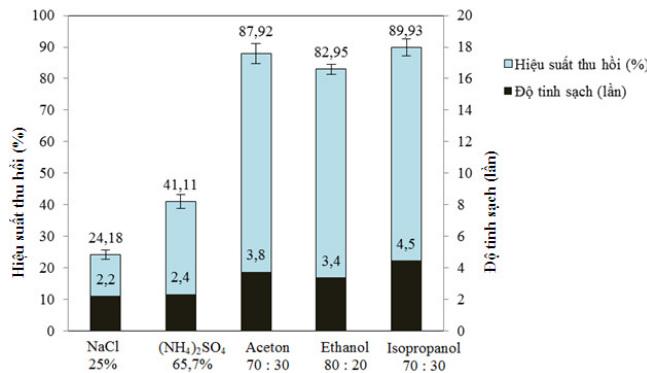
**Xác định hằng số động học phản ứng**

Sử dụng cơ chất ONPG với nồng độ thay đổi trong khoảng 0,6 – 5,4 $\mu$ mol/ml để xác định hằng số động học phản ứng enzyme. Các hằng số Michaeli's Menten  $K_m$  và  $V_{max}$  được tính toán bằng phương trình Lineweaver-Burk.

**KẾT QUẢ - BÀN LUẬN**

**Khảo sát sự ảnh hưởng của các tác nhân kết tủa protein enzyme**

Trên Hình 1 là biểu đồ so sánh các giá trị tối đa thu được về hiệu suất kết tủa protein và độ tinh sạch của chế phẩm enzyme được kết tủa lần lượt bằng các tác nhân muối trung tính (NaCl và  $(NH_4)_2SO_4$ ) và dung môi hữu cơ (acetone, ethanol và isopropanol).



Hình 1. Biểu đồ so sánh tính năng kết tủa protein enzyme của các tác nhân

Kết quả cho thấy tính kết tủa chọn lọc của tác nhân muối trung tính không cao, hiệu suất

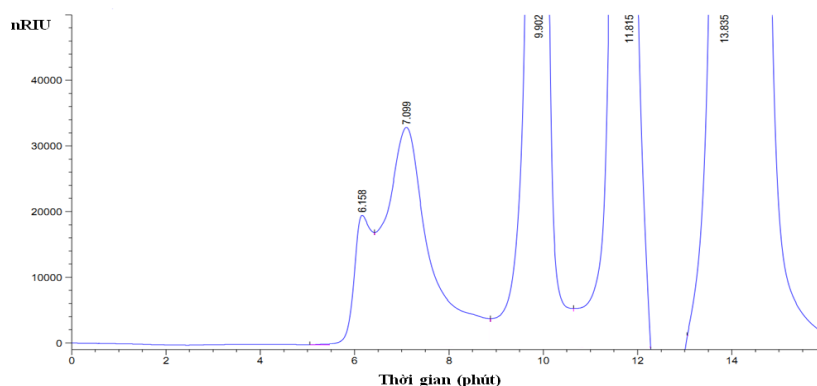
thu hồi và độ tinh sạch cao nhất khi sử dụng NaCl và  $(NH_4)_2SO_4$  lần lượt là 24,18%; 2,2 lần

và 41,11%; 2,4 lần. Trong khi đó việc dùng dung môi hữu cơ cho thấy khả năng kết tủa hiệu quả hơn với hiệu suất thu hồi đều trên 80% (87,92% khi dùng acetone, 82,95% khi dùng ethanol và 89,93% khi dùng isopropanol). Bên cạnh đó, độ tinh sạch enzyme khi dùng dung môi hữu cơ cũng khá cao: 3,8 lần đối với acetone, 3,4 lần đối với ethanol và 4,5 lần đối với isopropanol. Kết quả này là do dung môi hữu cơ có khả năng làm giảm hoạt tính nước cao đã làm phá vỡ lớp màng hydrate hóa hiệu quả hơn so với việc giảm lực đẩy điện tích cùng dấu trên phân tử protein dưới tác dụng của muối trung tính [6]. Mặc dù, khi dùng muối

trung tính thì hoạt tính của enzyme ổn định hơn, nhưng hiệu suất thu hồi protein enzyme không cao. Do đó, chúng tôi chọn tác nhân kết tủa protein enzyme là isopropanol. Kết tủa thu được là chế phẩm enzyme thô tiếp tục được tinh chế bằng sắc ký lọc gel.

**Tinh sạch β-galactosidase bằng sắc ký lọc gel**

Tiến hành lọc gel mẫu enzyme thô trên cột Ultrahydrogen 250 trong 18 phút đã tách được 4 phân đoạn protein (Hình 2). Tuy nhiên, chỉ có phân đoạn có thời gian lưu 6 – 8 phút có hoạt tính β-galactosidase, những phân đoạn còn lại không có hoạt tính.



**Hình 2.** Kết quả phân tích hỗn hợp protein bằng sắc ký lọc gel (GPC – Agilent 1100) trên cột Ultrahydrogel 250 với đầu dò RID

Kết quả về hiệu quả lọc gel được trình bày trong Bảng 1. Sau khi tiến hành lọc gel mẫu enzyme thô, hiệu suất thu hồi protein enzyme

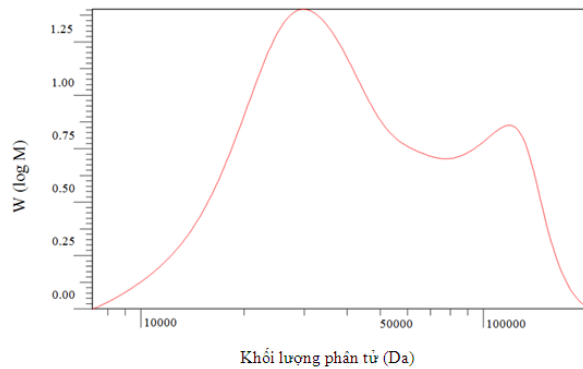
đạt được 58,57% và độ tinh sạch tăng lên 22,6 lần so với enzyme thô trích ly được sau khi phá vỡ tế bào.

**Bảng 1.** Kết quả tinh sạch enzyme qua các công đoạn kết tủa và lọc gel

Mẫu	Thể tích (ml)	Protein (mg)	Hoạt tính		Hiệu suất (%)	Độ tinh sạch (lần)
			U	U/mg		
Enzyme thô	1	0,489	1,534	3,140	100,00	1,0
Enzyme kết tủa	0,25	0,099	1,380	14,005	89,93	4,5
Enzyme sau lọc gel	1,5	0,020	0,899	44,928	58,57	14,3

Thông qua kết quả kết quả nghiên cứu về sự phân bố khối lượng phân tử protein (Hình 3) đã

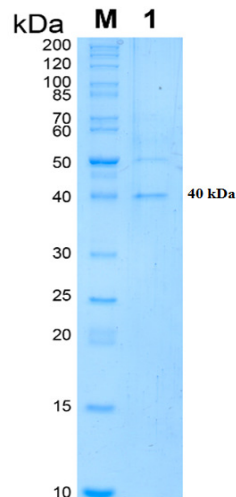
xác định phân tử lượng của  $\beta$ -galactosidase trong khoảng 40 – 50 kDa.



**Hình 3.** Khối lượng phân tử của phân đoạn có thời gian lưu 6 – 8 phút

Tiến hành chạy điện di SDS-PAGE mẫu enzyme tinh sạch, kết quả trình bày ở Hình 4,

$\beta$ -galactosidase tinh sạch thu được sau sắc ký lọc gel có khối lượng phân tử là 40 kDa.

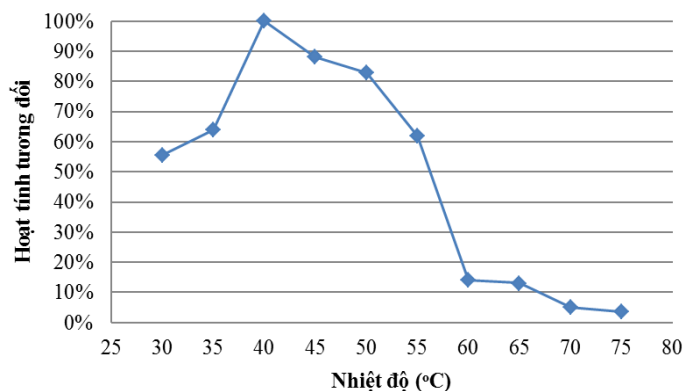


**Hình 4.** Kết quả điện di SDS-PAGE mẫu enzyme tinh sạch với thang chuẩn M (PAGE-Ruler unstained, Fermentas), M là thang chuẩn, 1 là mẫu chế phẩm  $\beta$ -galactosidase tinh sạch

#### Xác định nhiệt độ tối ưu và pH tối ưu

Khi thực hiện phản ứng enzyme ở những nhiệt độ khác nhau từ 30 – 70°C, kết quả cho thấy ở nhiệt độ 40°C hoạt tính  $\beta$ -galactosidase đạt cao nhất, trong khi đó từ khoảng 60 – 75°C hoạt tính enzyme giảm đáng kể. Điều này cho thấy chế phẩm  $\beta$ -galactosidase này có nhiệt độ

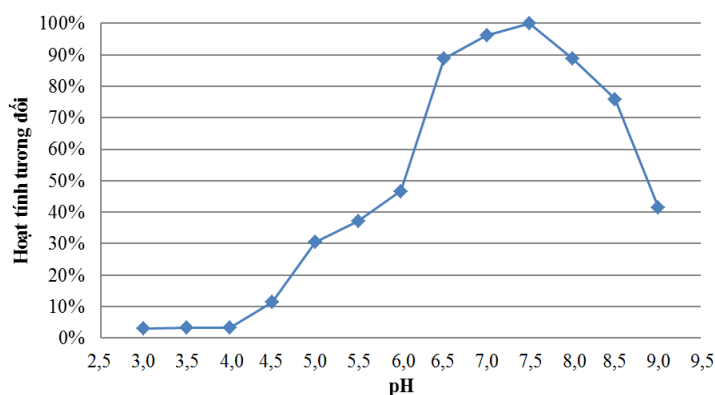
tối ưu ở khoảng 40°C, và dễ dàng vô hoạt ở nhiệt độ trên 70°C. Vì vậy khi ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, sau khi thực hiện phản ứng enzyme thì dễ dàng đình chỉ phản ứng bằng chế độ nhiệt (như thanh trùng...) để đảm bảo chất lượng sản phẩm trong thời gian bảo quản và tiêu thụ.



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hoạt tính  $\beta$ -galactosidase

Khảo sát về pH tối ưu của chế phẩm  $\beta$ -galactosidase cho thấy enzyme có hoạt tính cao nhất ở pH khoảng 7 – 7,5. Ở pH 6,5, hoạt tính tương đối của chế phẩm cũng khá cao, khoảng 90%. Ở pH dưới 4,5 thì hoạt tính còn không

đáng kể. Với khoảng pH hoạt động như vậy thì việc ứng dụng chế phẩm này trong ngành chế biến sữa là khá thích hợp vì pH của sữa tươi khoảng 6,5.



Hình 6. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính  $\beta$ -galactosidase

#### Xác định hằng số động học của enzyme

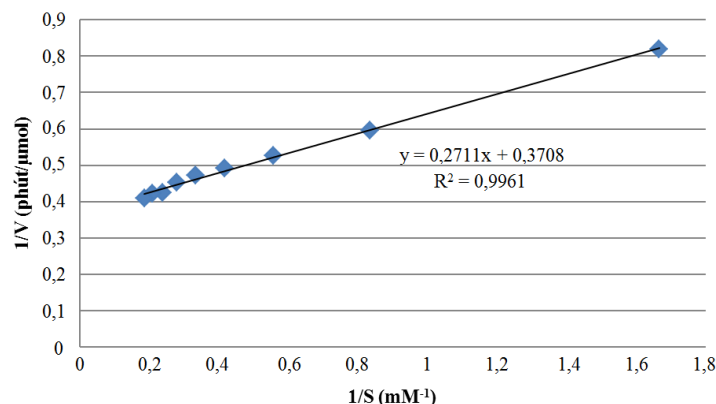
Trong thí nghiệm xác định tính chất động học của enzyme, chúng tôi sử dụng ONPG làm cơ chất phản ứng, nồng độ cơ chất thay đổi từ 0,6 mM – 5,4 mM. Hằng số động học  $V_{max}$  và  $K_m$  được tính toán từ phương trình Lineweaver

– Burk (Hình 7) và giá trị  $V_{max}$  và  $K_m$  lần lượt là 2,3  $\mu$ mol/phút và 0,73 mM.

Trong một số nghiên cứu khác về tính chất động học của galactosidase, thì hằng số Michaelis  $K_m$  của  $\beta$ -galactosidase nguồn gốc từ *Kluyveromyces marxianus* DSM5418 và *Penicillium chrysogenum* lần lượt là 4,7mM

và 1,8mM [7, 8]. So với giá trị  $K_m$  từ trong nghiên cứu này là 0,73mM, điều này cho thấy khả năng tiếp cận cơ chất để thủy phân của enzyme  $\beta$ -galactosidase từ *L. acidophilus* cao hơn so với enzyme nguồn gốc từ *Kluyveromyces marxianus* DSM5418 và

*Penicillium chrysogenum*. Vì enzyme  $\beta$ -galactosidase mà chúng tôi thu nhận có phân tử lượng nhỏ (40 kDa), cho nên sự cản trở tiếp xúc giữa cơ chất và trung tâm hoạt động của enzyme do yếu tố không gian được hạn chế.



Hình 7. Đồ thị xác định  $K_m$  và  $V_{max}$  theo phương pháp Lineaweaver Burk

## KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tác nhân kết tủa enzyme hiệu quả là isopropanol với hiệu suất thu hồi 89,93% và độ tinh sạch là 4,5 lần. Sau khi tinh sạch bằng sắc ký lọc gel chế phẩm enzyme có hoạt tính riêng là 71,05 U/mg với độ tinh sạch là 22,6 lần,

phân tử lượng của enzyme  $\beta$ -galactosidase khoảng 40 kDa. Nhiệt độ tối ưu và pH tối ưu của  $\beta$ -galactosidase sau khi tinh sạch lần lượt là 40°C và 7 – 7,5. Về tính chất động học của phản ứng enzyme, giá trị  $V_{max}$  và hằng số Michaelis  $K_m$  lần lượt là 2,3  $\mu\text{mol/phút}$  và 0,73 mM.

## ISOLATION AND PURIFICATION OF LACTASE FROM *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

Nguyen Thi Van Linh<sup>(1)</sup>, Nguyen Thi Thuy Dung<sup>(2)</sup>, Tran Bich Lam<sup>(2)</sup>

(1) Nguyen Tat Thanh University; (2) University of Technology, VNU-HCM

**ABSTRACT:** The enzyme  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23) commonly known as lactase, has important applications in the dairy industry. From culture of strain

*Lactobacillus acidophilus* having high and stable  $\beta$ -galactosidase activity, the study of crude enzyme isolation were carried out by ultrasonical extraction and precipitation by neutral salts and organic solvents. Best precipitant was isopropanol with enzyme recovery 89,93%, and enzyme purity increased 4,5 folds. Further  $\beta$ -galactosidase purification was carried out using gel permeation chromatography on Ultrahydrogel 250 to increase purity in 14,3 folds. The molecular weight of  $\beta$ -galactosidase was 40 kDa. The purified enzyme had optimum activity at 40°C, pH 7 – 7,5 and kinetic parameters of  $V_{max}$  and  $K_m$  were 2,3  $\mu$ mol/min and 0,73 mM.

**Key words:**  $\beta$ -galactosidase isolation,  $\beta$ -galactosidase from *L. acidophilus*,

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. J.E. Prenosil, E. Stuker, J. R. Bourne, Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis, *State of art. Biotechnol Bioeng*, 30, 1019-1025(1987).
- [2]. Parmjit S. Panesar, Production of  $\beta$ -galactosidase from Whey Using *Kluyveromyces marxianus*, *Research Journal of Microbiology*, 3, 24-29(2008).
- [3]. V. Gekas, M. López-Leiva, Hydrolysis of lactose. A literature review process, *Biochemistry*, 20, 2-12 (1985).
- [4]. T. Vasiljevic, P. Jelen, Production of  $\beta$ -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria, *Innovative Food Sci. & Emerg. Technol.* 2, 75-85 (2001).
- [5]. R.R. Mahoney, Galactosyl-oligosaccharides formation during lactose hydrolysis, *Food Chemistry*, 63, 147-154(1998).
- [6]. R. Hatti-Kaul et al., Isolation and Purification of Proteins, *Marcel Dekker, Inc.* (2003).
- [7]. S. O'Connell, G. Walsh, Purification and Properties of a  $\beta$ -galactosidase with potential application as a digestive supplement, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 141, 1-13 (2007).
- [8]. Nagy et al.,  $\beta$ -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme, *Protein Expres. Pur.* 21, 24-29(2001).