

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG THU NHẬN VÀ CỐ ĐỊNH ENZYM GLUCOAMYLASE TỪ *Asp.niger* VÀ *Asp.awamori* TRÊN CHẤT MANG KAOLIN

Ngô Minh Nhã ⁽¹⁾, Đồng Thị Thanh Thu ⁽²⁾

(1) Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM

(2) Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 11 tháng 8 năm 2008, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 04 tháng 12 năm 2009)

TÓM TẮT: Ngày nay enzym cố định được sử dụng rất rộng rãi trong các ngành công nghiệp nhờ vào khả năng tái sử dụng và khả năng điều khiển quá trình sản xuất bằng enzym. Nghiên cứu này khảo sát khả năng thu nhận và cố định enzym glucoamylase từ *Asp.niger* và *Asp.awamori* trên chất mang Kaolin. Hoạt độ của chế phẩm enzym (CPE) glucoamylase thu nhận từ *Asp.niger* là 143325,62 UI/g-CPE và *Asp.awamori* là 133418,20 UI/g-CPE. Thời gian cố định enzym glucoamylase từ *Asp.niger* đạt hiệu suất cố định cao nhất sau 50 phút và đối với *Asp.awamori* là 40 phút. Khối lượng chất mang cho hiệu suất cố định enzym glucoamylase cao nhất là 1g/0,1g enzym. Khả năng tái sử dụng của enzym glucoamylase từ *Asp.niger* sau khi được cố định trên kaolin cao hơn khả năng tái sử dụng của enzym glucoamylase từ *Asp.awamori* sau khi được cố định trên kaolin.

1. MỞ ĐẦU

Glucoamylase là một enzym quan trọng thuộc hệ enzym amylase [7]. Enzym này đang thu hút sự quan tâm của nhiều nhà sản xuất nhờ vào khả năng thủy phân liên kết α -1,4 glycoside và α -1,6 glycoside thậm chí cả liên kết α -1,3 glycoside trong mạch amylose và amylopectin để thu được sản phẩm triệt để là glucose [1]. Nhờ vào đặc tính này, glucoamylase được sử dụng trong công nghiệp sản xuất đường glucose và mật tinh bột.

Hiện nay giá thành của enzym khá cao, nên việc cố định enzym rất được chú trọng.

Nhằm phần nào đáp ứng nhu cầu trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu: “Khảo sát khả năng cố định và thu nhận enzym glucoamylase từ *Asp.niger* và *Asp.awamori* trên chất mang Kaolin”. Mục đích của nghiên cứu này là tìm hiểu khả năng cố định enzym glucoamylase của Kaolin.

Nội dung nghiên cứu gồm một số vấn đề sau:

- ✓ Khảo sát hoạt độ của glucoamylase thu nhận từ *Asp.niger* và *Asp.awamori*
- ✓ Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự cố định CPE glucoamylase.
- ✓ Hiệu suất cố định enzym trên chất mang Kaolin và khả năng tái sử dụng.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Chủng nấm mốc *Asp.niger* và *Asp.awamori* do phòng thí nghiệm Sinh hóa trường ĐH Khoa học Tự nhiên Tp.HCM cung cấp

Môi trường nuôi cấy (Môi trường bán rắn) [2]

Cám 70%

Trấu 25%

Bã sắn 5%

Dung dịch khoáng Czapeck bổ sung vào môi trường tạo độ ẩm 50%

Khử trùng môi trường nuôi cấy ở 121⁰C, 20 phút

Các hóa chất và chất mang Kaolin sử dụng trong nghiên cứu này đều do Trung Quốc sản xuất.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu nhận CPE glucoamylase từ Asp.niger và Asp.awamori: [1], [4]

Sau thời gian nuôi mốc 60 h quá trình tách chiết thu nhận CPE bán tinh khiết được thực hiện bằng cách sau: Canh trường nuôi nấm mốc được khuấy trộn với nước (tỷ lệ nước cát và canh trường là 3:1), lọc qua vải lọc lấy dịch lọc, thu được phần dịch chứa enzym. Làm lạnh nhanh dịch chiết enzym xuống còn 3-5⁰C, kết tủa enzym bằng cồn theo tỷ lệ 3 cồn : 1 dịch enzym (cồn cũng đã được làm lạnh 3-5⁰C). Ly tâm dịch tủa trong 15 phút ở tốc độ 5000 vòng/phút. Thu tủa, sấy ở nhiệt độ 35-40⁰C cho đến khi độ ẩm của tủa đạt 11-14%, bảo quản ở nhiệt độ lạnh.

Các phương pháp phân tích

Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Lowry [6]

Xác định hoạt độ enzym glucoamylase theo phương pháp so màu với DNS [3]

$$\text{Hiệu suất thu enzym (\%)} = \frac{\text{Trọng lượng CPE}}{\text{Trọng lượng canh trường}} \times 100 (\%)$$

Phương pháp cố định enzym [1], [5]

- Hòa tan một lượng enzym và kaolin vào một thể tích dung dịch đệm nhất định (50ml). Khuấy nhẹ cho enzym được kết dính lên bề mặt chất mang, tạo dạng enzym không tan (enzym cố định).

- Sau một thời gian, lọc hỗn hợp trên bằng giấy lọc, rửa hỗn hợp lại bằng dung dịch đệm để loại bỏ lượng enzym chưa được cố định còn lại trong hỗn hợp. Thu lượng enzym cố định trên kaolin, sấy ở nhiệt độ 35-40⁰C, bảo quản ở nhiệt độ lạnh.

Công thức tính toán [3]

- Một đơn vị hoạt độ (UI) của glucoamylase là lượng enzym xúc tác thủy phân tinh bột để giải phóng ra 1 μ g glucose trong 1 phút ở điều kiện nhiệt độ và pH thích hợp.

- Hoạt độ riêng của enzym là số đơn vị hoạt độ enzym được tính trên 1mg protein của CPE

- Hiệu suất cố định enzym là tỷ lệ giữa tổng đơn vị hoạt độ enzym sau khi được cố định và tổng đơn vị hoạt độ enzym của mẫu trước khi cố định.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khảo sát hoạt độ của glucoamylase thu nhận từ *Asp.niger* và *Asp.awamori*

- CPE sau khi trích ly từ *Asp.niger* và *Asp.awamori* được hòa tan vào dung dịch đệm có pH=5 và xác định hoạt độ theo phương pháp so màu với DNS. Kết quả thực nghiệm được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1.Hoạt độ glucoamylase thu nhận từ *Asp.niger* và *Asp.awamori*

| Giống vi sinh vật | Hoạt độ (UI/g-CPE) |
|--------------------|--------------------|
| <i>Asp.niger</i> | 143325,62 |
| <i>Asp.awamori</i> | 133418,20 |

Nhận xét: Hoạt độ của CPE glucoamylase thu từ *Asp.niger* cao hơn CPE từ *Asp.awamori*. Hoạt độ của enzym glucoamylase từ *Asp.niger* là 143325,62 U/g-CPE và từ *Asp.awamori* là 133418,20 U/g-CPE. Như vậy có thể thấy trong cùng điều kiện nuôi cấy, khả năng sinh enzym glucoamylase của 2 loài *Aspergillus* là khác nhau và *Asp.niger* có thể sinh enzym glucoamylase có hoạt tính cao hơn enzym glucoamylase từ *Asp.awamori*

- Sử dụng cồn là tác nhân gây tủa enzym, hiệu suất thu nhận CPE được trình bày ở bảng 3.2.

Bảng 3.2.Hiệu suất thu nhận CPE glucoamylase

| Giống vi sinh vật | Trọng lượng canh trường (g) | Trọng lượng CPE thu được (g) | Hiệu suất thu enzym (%) |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------|
| <i>Asp.niger</i> | 50 | 3,56 | 7,12 |
| <i>Asp.awamori</i> | 50 | 2,92 | 5,83 |

Nhận xét: Với tác nhân tủa là ethanol 96% thì hiệu suất thu hồi CPE từ canh trường *Asp.niger* là 7,12% cao hơn so với hiệu suất thu hồi CPE từ *Asp.awamori* 5,83%. Khi cho dung môi hữu cơ vào dung dịch enzym sẽ tách triệt để lớp phân tử nước bao lấy xung quanh phân tử protein, làm giảm tính tan của protein, tăng khả năng kết tủa của chúng.

Chúng tôi sử dụng cùng một phương pháp để thu CPE thô, nhưng hiệu suất thu nhận enzym glucoamylase từ 2 loài nấm mốc trên lại khác nhau. Có thể do cấu trúc glucoamylase khác nhau giữa các loài nấm mốc nên khi tiếp xúc với tác nhân gây tủa tạo nên lượng kết tủa chênh lệch 1,22 lần.

- Hoạt độ riêng của CPE glucoamylase được trình bày ở bảng 3.3.

Bảng 3.3.Hoạt độ riêng của CPE glucoamylase

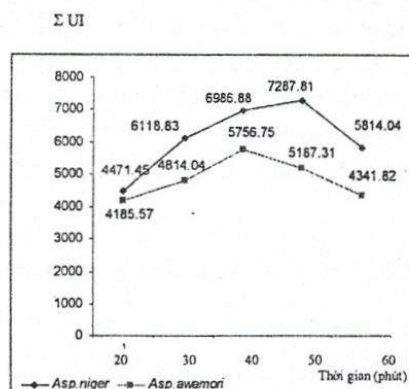
| Giống vi sinh vật | Hoạt độ (UI/g-CPE) | Hàm lượng protein (mg/g-CPE) | Hoạt độ riêng (Σ UI/mg protein-E) |
|--------------------|--------------------|------------------------------|---|
| <i>Asp.niger</i> | 143325,62 | 37,11 | 3862,18 |
| <i>Asp.awamori</i> | 133418,20 | 36,67 | 3638,34 |

Nhận xét: Hoạt độ riêng của CPE glucoamylase từ *Asp.niger* là 3862,18 Σ UI/mg protein cao hơn hoạt độ riêng của glucoamylase từ *Asp.awamori* là 3638,34 Σ UI/mg protein. Vì hoạt độ riêng đặc trưng cho mức độ tinh sạch của enzym, điều đó chứng tỏ độ tinh sạch của enzym glucoamylase từ *Asp.niger* cao hơn enzym từ *Asp.awamori*.

3.2. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự cố định CPE glucoamylase

3.2.1. Khảo sát thời gian cố định enzym lên chất mang

- Hòa tan 0,1g enzym glucoamylase và 1g kaolin trong 50ml dung dịch đệm acetat pH=5. Thực hiện phương pháp hấp phụ để cố định enzym với thời gian cố định khác nhau 20 phút, 30 phút, 40 phút, 50 phút và 60 phút. Kết quả thực nghiệm được trình bày ở hình 3.1

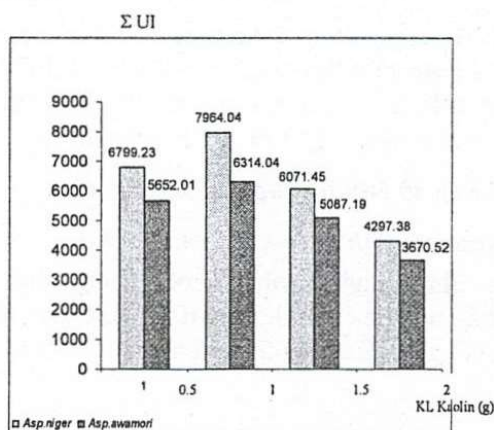


Hình 3.1. Sự biến đổi số đơn vị hoạt độ CPE glucoamylase từ *Asp.niger* và *Asp.awamori* được cố định theo thời gian

Nhận xét: Kaolin là một khoáng vật sét thường gặp trong tự nhiên, trắng mịn hoặc ngà vàng. Nó được cấu tạo thành từng lớp, mỗi lớp như vậy có một tấm tứ diện SiO_4^{-4} và một tấm bát diện Al(OH)_6^{-3} . Tấm tứ diện quay đỉnh chung về phía tấm bát diện. Ở vị trí của đỉnh chung tứ diện và bát diện thì ion OH^- của bát diện được thay thế bằng ion O^{2-} của tứ diện. O^{2-} trong trường hợp này là những ion có khả năng liên kết tương đối bền vững với các chất bị hấp phụ như các phân tử enzym [8]. Đối với enzym glucoamylase từ *Asp.niger* tổng đơn vị hoạt độ enzym được cố định tăng dần và cao nhất sau thời gian khuấy là 50 phút là 7287,81 UI và hiệu suất cố định đạt 50,85%, sau thời gian 50 phút thì hoạt độ giảm dần vì thời gian khuấy quá lâu sẽ làm cho enzym bị tách ra khỏi chất mang. Còn với enzym glucoamylase từ *Asp.awamori* thì thời gian khuấy tối ưu là 40 phút, tổng đơn vị hoạt độ enzym được cố định là 5756,75 UI và đạt hiệu suất cố định 43,15%, sau thời gian khuấy 40 phút thì tổng đơn vị hoạt độ enzym cố định cũng giảm dần.

3.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của khối lượng chất mang đến khả năng cố định của enzym

- Hòa tan 0,1g enzym glucoamylase trong 50ml dung dịch đệm acetat có pH=5 và khối lượng kaolin sử dụng lần lượt là 0,5g; 1g; 1,5g; 2g. Tiến hành cố định enzym, kết quả thực nghiệm được trình bày ở hình 3.2



Hình 3.2. Sự biến đổi tổng số đơn vị hoạt độ của CPE glucoamylase từ *Asp.niger* và *Asp.awamori* cố định theo khối lượng kaolin

Nhận xét: Sự thay đổi khối lượng kaolin có ảnh hưởng rõ rệt đến tổng số đơn vị hoạt độ enzym glucoamylase cố định.

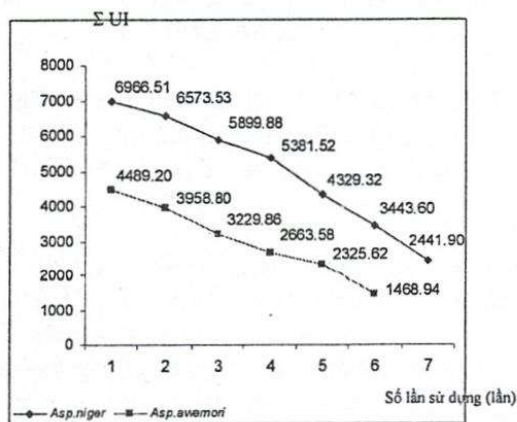
Đối với CPE glucoamylase từ 2 loài nấm mốc khi tăng khối lượng kaolin từ 0,5g lên 1g thì số đơn vị hoạt độ của enzym cũng tăng theo. Còn khi tăng khối lượng chất mang từ 1g đến 2g thì tổng đơn vị hoạt độ enzym đã bị giảm đi. Vì kaolin có cấu tạo lớp và độ phân tán cao, nên chúng có tính dẻo đặc biệt, có khả năng tạo kết dính, vì vậy khi tăng khối lượng chất mang, các hạt kaolin kết dính vào nhau làm cho diện tích tiếp xúc với enzym giảm đi và giảm hiệu suất cố định enzym.

Số đơn vị hoạt độ enzym glucoamylase từ 2 loài *Aspergillus* cố định đạt giá trị cao nhất khi sử dụng tỷ lệ khối lượng enzym: kaolin = 1:10. Số đơn vị hoạt độ enzym glucoamylase của *Asp.niger* cố định là 7964,04 UI (hiệu suất cố định 55,56%) và số đơn vị hoạt độ enzym glucoamylase của *Asp.awamori* cố định là 6314,04 UI (hiệu suất cố định 47,32%)

Từ những kết quả nghiên cứu thu được ở trên, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ khối lượng chất mang 1g/0,1g enzym có hiệu suất cố định enzym tốt nhất. Đối với enzym glucoamylase từ *Asp.niger* thời gian cố định enzym hiệu quả nhất là 50 phút và thời gian cố định tốt nhất cho enzym glucoamylase từ *Asp.awamori* là 40 phút

3.2.3. Khảo sát khả năng tái sử dụng của enzym cố định

Xác định khả năng tái sử dụng của enzym glucoamylase cố định trên Kaolin qua sự thủy phân tinh bột và sự biến đổi tổng đơn vị hoạt độ Σ UI. Kết quả thực nghiệm được trình bày ở hình 3.3.



Hình 3.3: So sánh khả năng tái sử dụng của CPE glucoamylase từ *Asp.niger* và *Asp.awamori* cố định qua sự biến đổi Σ UI

Nhận xét: Sau khi được cố định trên kaolin, enzym glucoamylase từ *Asp.niger* có thể tái sử dụng đến 7 lần. Sau 7 lần sử dụng số đơn vị hoạt độ enzym chỉ còn 2441,90 UI tương ứng 35,05% so với tổng UI cố định ban đầu. Còn đối với enzym glucoamylase từ *Asp.awamori*, sau 6 lần tái sử dụng số đơn vị hoạt độ là 1468,94 UI tương ứng 32,72% so với tổng UI cố định ban đầu. Có thể nói enzym glucoamylase từ *Asp.niger* cố định trên kaolin có khả năng tái sử dụng cao hơn enzym từ *Asp.awamori*.

4. KẾT LUẬN

Qua các thực nghiệm, chúng tôi đi đến những kết luận như sau:

Hoạt độ của CPE glucoamylase thu nhận từ *Asp.niger* là 143325,62 UI/g-CPE và từ *Asp.awamori* là 133418,20 UI/g-CPE.

Thời gian cố định enzym glucoamylase từ *Asp.niger* đạt hiệu suất cố định cao nhất là 50,85% sau 50 phút. Thời gian cố định enzym glucoamylase từ *Asp.awamori* đạt hiệu suất cố định cao nhất là 43,15% sau 40 phút.

Khối lượng chất mang cho hiệu suất cố định enzym glucoamylase cao nhất là 1g/0,1g enzym. Hiệu suất cố định đối với CPE từ *Asp.niger* là 55,56% và hiệu suất cố định CPE từ *Asp.awamori* là 47,32%.

Khả năng tái sử dụng của enzym glucoamylase từ *Asp.niger* sau khi được cố định trên kaolin cao hơn khả năng tái sử dụng của enzym glucoamylase từ *Asp.awamori* sau khi được cố định trên kaolin. Enzym glucoamylase ở cả hai loài nấm mốc trên sau khi cố định có thể tái sử dụng trên 6 lần.

Các số liệu thí nghiệm trong nghiên cứu này đã được tính toán, xử lý theo phương pháp ANOVA

STUDYING THE EXTRACTION AND THE IMMOBILIZATION GLUCOAMYLASE FROM *Aspergillus niger* AND *Aspergillus awamori* ON KAOLIN

Ngo Minh Nha ⁽¹⁾, Đông Thi Thanh Thu ⁽²⁾

(1)University of Technology, VNU-HCM

(2)University of Natural Sciences, VNU-HCM

ABSTRACT: Nowadays the immobilized enzyme used universally in industrials thanked to capability re-use and industrial process control capability by enzyme. This research studying the receiving and the immobilization glucoamylase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori* on kaolin. Activity of enzyme glucoamylase extract from *Aspergillus niger* is 143325, 62 UI/ g-product enzyme and *Aspergillus awamori* 133418, 20 UI/ g-enzyme product. Examination the time of support-enzyme, activity of enzyme glucoamylase extract from *Aspergillus niger* is highest at 50 and from *Aspergillus awamori* is 40 minutes. The suitable mass of kaolin is 1g/0,1g enzymes. The capability re-use of the immobilized enzyme glucoamylase from *Aspergillus niger* is higher than the immobilized enzyme from *Aspergillus awamori*.

Keyword: enzyme glucoamylase, immobilization, kaolin, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Đức Lượng (chủ biên), và cộng sự, *Công nghệ enzym*, NXB Đại học Quốc gia Tp.HCM, trang 60, 160 (2004)
- [2]. Nguyễn Đức Lượng (chủ biên), Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết, *Thí nghiệm Công nghệ Sinh học Tập 2*, NXB Đại học Quốc gia Tp.HCM trang 108-109 (2006)
- [3]. Võ Việt Phi, *Nghiên cứu thu nhận glucoamylase từ Asp. Kawasaki*, Chuyên ngành Khoa học và Công nghệ Thực Phẩm, Đại học Bách Khoa TP.HCM trang V-VI (2005)
- [4]. Đồng Thị Thanh Thu, *Sinh hóa ứng dụng*, NXB Đại học Quốc gia Tp.HCM, trang 214-218 (2003)
- [5]. Đồng Thị Thanh Thu, *Sự cố định enzym và ứng dụng*, Giáo trình Đại học Khoa học Tự nhiên TP.HCM, trang 30-38 (2001)
- [6]. Lowry.O.H, N.J.Rosebrough, *Protein measurement with the Folin-phenol reagents*, J. Biol.Chem.193, trang 265-275 (1965)
- [7]. Wolfgang Aehle, *Enzymes in Industry*, Wiley_VCH Verlag GmbH and Co.KgaA, Weinheim, trang 203-204 (2004)
- [8]. <http://www.patentstorm.us/patents/5614401/description.html>