

KHẢO SÁT QUÁ TRÌNH CỐ ĐỊNH ENZYME α -AMYLASE (TERMAMYL) BỞI CHẤT MANG CMC-ALGINATE

Huỳnh Ngọc Oanh, Vũ Thanh Thảo

Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 29 tháng 04 năm 2007, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 29 tháng 11 năm 2007)

TÓM TẮT: Enzyme cố định có nhiều ưu điểm trong ứng dụng, tuy nhiên việc tạo enzyme cố định còn phụ thuộc nhiều yếu tố và đang là đề tài cho nhiều nhà nghiên cứu khoa học. Đây là một đề tài nghiên cứu khả năng cố định enzyme α -amylase bởi chất mang dạng phức CMC-Alginate

Kết quả đạt được là hoạt tính của enzyme α -amylase Termamyl cố định bởi gel CMC-Alginate cao tại nồng độ alginate 0.75%, nồng độ CaCl_2 6 %. Nồng độ CMC (Cacboxymethylcellulose) thích hợp để cố định enzyme Termamyl là 2%. Hoạt tính enzyme Termamyl cố định phụ thuộc vào cơ chất, pH và nhiệt độ phản ứng: Kết quả cho thấy khả năng chịu nhiệt của enzyme cố định còn phụ thuộc vào chất mang. Cơ chất có kích thước càng nhỏ càng dễ tiếp xúc enzyme cố định. Tuy nhiên enzyme cố định sẽ bị thất thoát sau quá trình tái sử dụng, ở lần sử dụng thứ 10 hoạt tính giảm một nửa.

1. MỞ ĐẦU

Cellulose bản chất là polysaccharide cấu tạo nên vách tế bào thực vật và là hợp chất hữu cơ có nhiều nhất trong sinh quyển. Cellulose và dẫn xuất của nó như CM cellulose, DEAE cellulose, triacetate cellulose, diacetate cellulose... được sử dụng rộng rãi làm chất mang để cố định tế bào. Cellulose có tính chất cơ lý khá tốt, giá rẻ có thể sử dụng ở dạng sợi và dạng vi hạt, dạng màng. Cacboxymethylcellulose - CMC là một ether cellulose, tạo thành bằng cách kiềm hóa cellulose với dung dịch sodium monochloroacetate ($\text{CH}_2\text{ClCOONa}$) dưới những điều kiện phức tạp.[2,5,7]

Do CMC không thể tạo gel ở pH mà enzyme α -amylase - Termamyl hoạt động (5-6) nên trong báo cáo này chúng tôi nghiên cứu kết hợp với alginate tạo chất mang dạng phức CMC-Alginate để tạo hạt gel cố định enzyme.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Termamyl 120L: enzyme α -amylase được sản xuất bởi chủng *Bacillus Licheniformis* – Hãng Novo Nordick, Đan Mạch. [3]

Alginate: Kanto, Nhật

2.2. Phương pháp

- Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Lowry
- Xác định hoạt tính (HT) của enzyme amylase theo phương pháp Smith và Rose[1]
- Phương pháp cố định enzyme amylase [4,5,6]

Chuẩn bị dung dịch alginate theo nồng độ khảo sát.

Chuẩn bị dung dịch cation CaCl_2

Hòa tan CMC vào trong dung dịch CaCl_2 đã pha

Enzyme được hòa tan trong dung dịch cation với tỉ lệ 1:10 (v/v)

Tiến hành tạo hạt gel:

Dung dịch hỗn hợp CaCl_2 /CMC/amylase qua bơm nhu động nhỏ giọt vào dung dịch alginate. Dung dịch alginate phải được khuấy bằng máy khuấy từ để giữ cho các hạt gel vừa tạo thành không dính vào nhau. Khoảng cách giữa dung dịch cation và dung dịch alginate khoảng 10cm để đảm bảo hạt gel tạo thành có hình cầu. Tổng thời gian tạo gel không quá 1% thời gian hạt ngâm trong dung dịch alginate để đảm bảo hạt tạo thành trong cùng một thời gian.

Khi dung dịch CaCl_2 nhỏ vào trong dung dịch alginate, một lớp vỏ bao sẽ hình thành xung quanh hạt nhờ vào quá trình tạo liên kết mạng lưới giữa alginate và Ca^{2+} . Thời gian tạo gel là 1 giờ.

Sau một giờ ta tiến hành pha loãng dung dịch alginate 2 lần bằng nước cất để lấy các hạt gel ra khỏi dung dịch alginate. Các hạt gel sau khi lấy ra được ngâm ngay vào trong dung dịch CaCl_2 trong 15 phút để làm bền hạt gel. Sau đó gel này được lấy ra khỏi dung dịch CaCl_2 rửa lại bằng nước cất giữ trong tủ lạnh hoặc vẫn trữ trong dung dịch CaCl_2 .

3.KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1.Chế phẩm enzyme Termamyl tự do

Bảng 1: Hoạt tính của chế phẩm enzyme Termamyl tự do

Hoạt tính (U/ml)	Hàm lượng protein ($\mu\text{g/ml}$)	Hoạt tính riêng (U/ μg protein)
13333	49318	0,2703

3.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình cố định enzyme bởi CMC-Alginate

3.2.1.Khảo sát nồng độ alginate và CaCl_2 đến quá trình cố định enzyme

Nồng độ CMC trong dung dịch hỗn hợp ban đầu là 2%

Bảng 2: Khảo sát nồng độ alginate và CaCl_2 đến quá trình cố định enzyme Termamyl

CaCl_2 (%)	Alginate (%)	Hoạt tính (U/ μg enzyme cố định)	Hoạt tính riêng (U/ μg protein cố định)	Hoạt tính riêng enzyme cố định so với enzyme tự do (%)
2%	1	734	0,0239	8,84
	0,75	978	0,0332	12,29
	0,5	862	0,0323	11,97
4%	1	1165	0,0320	11,84
	0,75	1202	0,0357	13,21
	0,5	1086	0,0344	12,73
6%	1	1265	0,0323	11,97
	0,75	1391	0,0378	14,00
	0,5	1371	0,0372	13,76

Nhận xét: Trong thí nghiệm chỉ khảo sát nồng độ alginate từ 0,5 -1%, vì nồng độ alginate nhỏ hơn 0,5 % thì hạt gel không bền và rất dễ vỡ, còn nồng độ alginate lớn hơn 1% thì không thể tạo gel CMC-Alginate do dung dịch alginate có độ nhớt cao các hạt gel dính vào nhau mà không tách rời thành từng hạt.

Hoạt tính của enzyme Termamyl cố định lên gel CMC-Alginate đạt cao nhất tại nồng độ alginate 0,75%, nồng độ CaCl₂ 6%. Còn ở nồng độ alginate, CaCl₂ cao hơn thì gel alginate bền hơn nên hàm lượng protein cố định lớn nhất, nhưng gel bền làm cho cơ chất khó khuếch tán vào trong gel, cũng như sản phẩm không thể khuếch tán ra ngoài làm giảm hoạt tính của enzyme cố định.

3.2.2. Khảo sát nồng độ CMC đến quá trình cố định enzyme

Khảo sát nồng độ CMC với alginate 0,75%, CaCl₂ 6%.

Bảng 3: Khảo sát nồng độ CMC đến quá trình cố định enzyme Termamyl

CMC (%)	Hoạt tính (U/μg enzyme cố định)	Hoạt tính riêng (U/μg protein cố định)	Hoạt tính riêng enzyme cố định so với enzyme tự do (%)
3	1056	0,0264	9,75
2	1355	0,0365	13,51
1	1163	0,0306	11,32

Nhận xét: Nồng độ CMC thích hợp để cố định enzyme Termamyl là 2%. Khi tăng nồng độ CMC độ nhớt của dung dịch CMC bên trong hạt gel alginate tăng lên làm tăng lượng protein cố định. Nhưng độ nhớt của dung dịch cao sẽ cản trở khả năng tiếp xúc của enzyme và cơ chất làm cho hoạt tính của hạt gel giảm.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của Termamyl cố định

Khảo sát ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của enzyme cố định ở nồng độ alginate 0,75%, CaCl₂ 6%, CMC 2%.

Bảng 4: Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của enzyme Termamyl cố định

pH	Hoạt tính (U/μg enzyme cố định)	Hoạt tính riêng (U/μg protein cố định)	Hoạt tính riêng enzyme cố định so với enzyme tự do (%)
5,0	1341	0,0342	12,65
5,5	1342	0,0343	12,65
6,0	1437	0,0367	13,58
6,5	1407	0,0358	13,24
7,0	1390	0,0354	13,10

Nhận xét: Enzyme Termamyl cố định hoạt động trong khoảng pH từ 5,5-7; ở pH nhỏ hơn 5,5 và lớn hơn 7 hoạt tính của enzyme giảm đáng kể điều này phù hợp với thông số của enzyme ở trạng thái tự do. pH tối thích cho hoạt động của enzyme Termamyl cố định lên gel CMC-Alginate là 6.

3.4. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của enzyme Termamyl cố định

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của enzyme cố định ở nồng độ alginate 0,75%, CaCl₂ 6 %, CMC 2%, pH= 6.

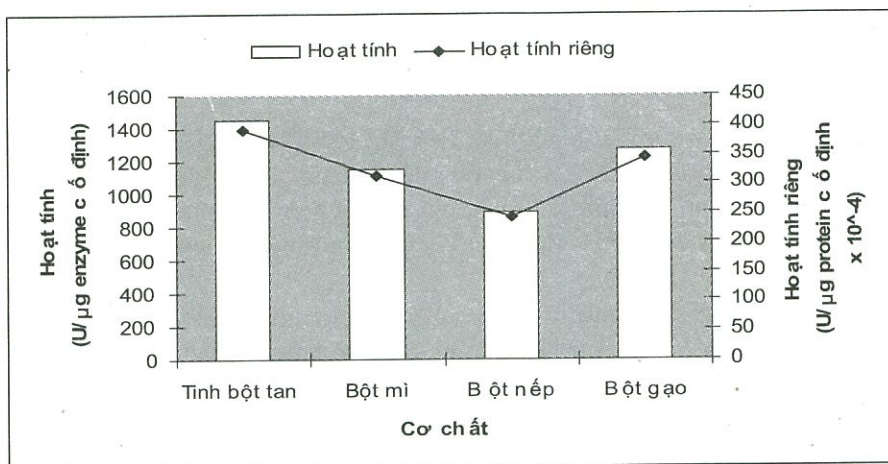
Bảng 5: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của enzyme Termamyl cố định

Nhiệt độ (°C)	Hoạt tính (U/μg enzyme cố định)	Hoạt tính riêng (U/μg protein cố định)	Hoạt tính riêng enzyme cố định so với enzyme tự do (%)
50	1404	0,0358	13,24
60	2452	0,0625	23,12
70	2832	0,0722	26,71
80	3707	0,0945	34,96
90	5636	0,1436	53,12
95	7130	0,1817	67,22

Nhận xét: Nhiệt độ càng tăng thì hoạt tính của enzyme cố định càng tăng do enzyme Termamyl là enzyme α-amylase thương mại có khả năng chịu nhiệt cao, đồng thời làm gel trương nở nên enzyme càng dễ tiếp xúc cơ chất và xúc tác phản ứng nên hoạt tính tăng cao. Khi tăng nhiệt độ từ 95°C trở lên thì hạt gel không bền.

3.5. Khảo sát ảnh hưởng của cơ chất đến khả năng hoạt động của enzyme Termamyl cố định

Khảo sát khả năng hoạt động của enzyme cố định đối với một số cơ chất, ở nồng độ alginate 0,75%, CaCl₂ 6%, CMC 2%, pH=6, nhiệt độ 50°C.



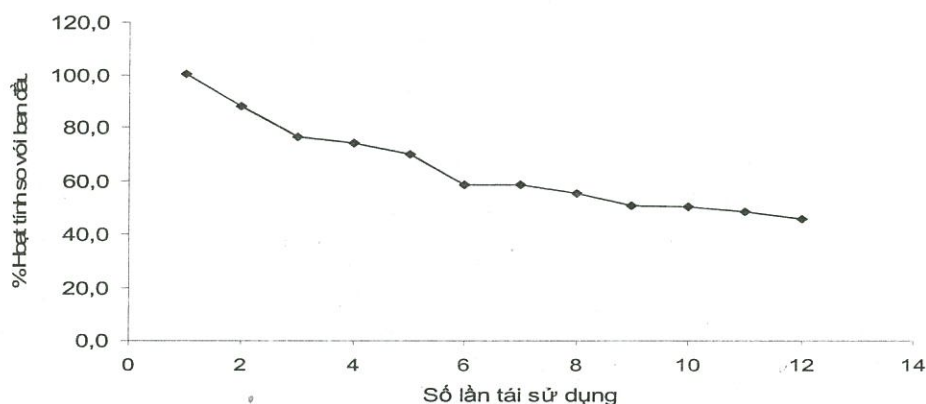
Đồ thị 1: Sự biến đổi hoạt tính của enzyme Termamyl cố định theo cơ chất.

Nhận xét: Hoạt tính của enzyme thay đổi theo cơ chất phản ứng. Tinh bột hòa tan đã được xử lý loại bỏ tạp chất nên tinh bột này dễ dàng bị thủy giải do đó hoạt tính của enzyme khi phân hủy tinh bột tan đạt cao nhất; còn bột gạo có thành phần amylopectin trong tinh bột ít

hơn của bột mì và bột nếp nên khả năng thủy giải tinh bột gạo của enzyme Termamyl cố định tốt hơn (enzyme α -amylase có khả năng phân hủy amylose tốt hơn amylopectin). Do đó cơ chất có kích thước, cấu trúc càng nhỏ càng dễ dàng cho enzyme cố định xúc tác phản ứng.

3.6. Khảo sát ảnh hưởng số lần tái sử dụng của enzyme Termamyl cố định

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của enzyme cố định ở nồng độ alginate 0,75%, CaCl_2 6%, CMC 2%, pH=6, nhiệt độ 70⁰C.



Đồ thị 2: Sự biến đổi hoạt tính của enzyme cố định theo số lần tái sử dụng.

Nhận xét: Enzyme Termamyl cố định lên gel CMC-Alginate được tái sử dụng nhiều lần để kiểm tra độ ổn định của hoạt tính. Đây là một chỉ tiêu không thể thiếu của enzyme cố định. Tiến hành tái sử dụng enzyme cố định ở nhiệt độ 90⁰C hạt gel sau hai lần sử dụng bị co lại và vỡ ra; tái sử dụng ở nhiệt độ 80⁰C enzyme cố định lên gel có thể sử dụng được 3 lần sau đó hạt gel co lại và vỡ ra. Tiến hành tái sử dụng enzyme cố định ở 70⁰C, kết quả cho thấy hoạt tính của enzyme cố định lên gel CMC-Alginate khá ổn định. Hoạt tính của enzyme Termamyl sau 10 lần tái sử dụng giảm đi một nửa (half-time), đến lần thứ 13 gel bắt đầu không còn giữ nguyên cấu trúc ban đầu (dễ bị vỡ ra).

4.KẾT LUẬN

Hoạt tính của enzyme Termamyl cố định lên gel CMC/Alginate đạt cao nhất tại nồng độ alginate 0,75%, nồng độ CaCl_2 6 %. Ở nồng độ alginate, CaCl_2 lớn hơn thì gel alginate bền hơn nên hàm lượng protein cố định lớn nhất, nhưng gel bền làm cho cơ chất khó khuếch tán vào trong gel, cũng như sản phẩm không thể khuếch tán ra ngoài làm giảm hoạt tính của enzyme cố định.

Nồng độ CMC thích hợp để cố định enzyme Termamyl là 2%. Khi tăng nồng độ CMC độ nhớt của dung dịch CMC bên trong hạt gel alginate tăng lên làm tăng lượng protein cố định. Nhưng độ nhớt của dung dịch cao sẽ cản trở khả năng tiếp xúc của enzyme và cơ chất làm cho hoạt tính của hạt gel giảm. Ngoài ra, hoạt động của enzyme Termamyl cố định còn phụ thuộc rất lớn vào kích thước cấu trúc của cơ chất và nhiệt độ phản ứng không những ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme mà còn ảnh hưởng đến độ bền về trạng thái cấu trúc của chất mang.

THE STUDY OF THE IMMOBILIZATION ENZYME α -AMYLASE (TERMAMYL) BY CMC-ALGINATE

Huynh Ngoc Oanh, Vu Thanh Thao
University of Technology, VNU - HCM

ABSTRACT: Immobilized enzyme has many advantages in applications, however the production of immobilized enzyme depends on many factors. That is a topic for many scientists and researchers. This topic is researching the ability of immobilization α -amylase by CMC-Alginate complex carrier (support).

The result obtained from this research is that the activity of enzyme Termamyl immobilized by gel CMC-Alginate is high at alginate 0.75%, CaCl_2 6%; and the concentration of CMC (Carboxymethylcellulose) was 2%. The activity of immobilized enzyme is affected by substance, pH & temperature's reaction: The heat-resistance of immobilized enzyme depends on the carrier. The smaller its size is, the easier the substance comes into contact with immobilized enzyme. However the amount of immobilized enzymes decreases after the reuses. The activity of immobilized enzyme is down to half after being used 10 times repeatedly.

Key words: immobilized enzyme, carboxymethylcellulose, Termamyl.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Đức Lượng, *Thí nghiệm Hóa Sinh học*, NXB ĐH Quốc Gia Tp. HCM, (2003).
- [2]. Aqualon, *Physical and Chemical Properties- Sodium Carboxymethylcellulose*, Hercules Incorporated, (1999).
- [3]. Bioindustrial Group, *Termamyl- Enzyme Process Vivision*, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsvaerd, Denmark, (2006,).
- [4]. Dennis J. McHugh, *Production and utilization of products from commercial seaweeds*, Chapter II: Production, properties and uses of alginate, FAO Fish.Tech.Pap, (1987).
- [5]. Fraser JE, Bickerstaff GF, *Entrapment in calcium alginate*, Methods in Biotechnology, Humana Press Inc, p. 61-66, (1997).
- [6]. Prof. Sé Won Suh, *Structural Proteomics*, Seoul National University, 151-747, Korea, (2004).
- [7]. S. V. Ramakrishna and R. S. Prakasham, *Microbial fermentations with immobilized cells*, Biochemical and Environmental Engineering, Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad 500 007, India, (2000).