

NGHIÊN CỨU THU NHẬN INVERTASE TỪ NẤM MEN BIA *SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS*

Trần Bích Lam, Nguyễn Tuyết Mai

Khoa Công Nghệ Hoá Học, Trường ĐH Bách Khoa – ĐHQG – HCM

(Bài nhận ngày 28 tháng 3 năm 2005, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 20 tháng 5 năm 2005)

TÓM TẮT: Nghiên cứu thu nhận Invertase từ nấm men bia nhằm tận dụng một cách có hiệu quả lượng nấm men thải ra rất lớn từ ngành công nghiệp sản xuất rượu bia. Nội dung nghiên cứu gồm: Thực hiện việc phá vỡ tế bào nấm men bia bằng phương pháp tự phân trong dung dịch đệm acetate, có bổ sung dung môi Toluene, chúng tôi nhận thấy ở điều kiện nhiệt độ phòng, huyền phù nấm men 10% (w/v) trong dung dịch đệm acetate pH 6,5; Toluene bổ sung với tỉ lệ 10% thể tích huyền phù tự phân trong thời gian khoảng 75 giờ thì cho dịch trích ly có hoạt tính Invertase cao nhất. Tinh sạch sơ bộ Invertase có trong dịch chiết bằng cồn 96° với tỉ lệ 1 : 1 (v/v) cho Invertase có hoạt tính cao nhất. Chế phẩm thu được hoạt động tối ưu ở 55°C trong môi trường pH6 và có hằng số Michaelis – Menten K_m bằng $7,31 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Nhiệt độ thích hợp khi ứng dụng Invertase trong sản xuất là 50°C. Hoạt tính của chế phẩm thu được trong quá trình bảo quản ở 0°C – 2°C sau 3 tuần không suy giảm.

1. Đặt vấn đề

Hàng năm, ở nước ta nguồn nấm men thải ra từ các nhà máy rượu bia là rất lớn, trong đó có chứa nhiều hợp chất sinh học quý. Invertase có nhiều trong nấm men, đặc biệt ở hai chủng *Saccharomyces cerevisiae* và *Saccharomyces carlsbergensis* [4]. Invertase được ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm để thực hiện phản ứng nghịch đảo đường, chống kết tinh, tăng độ ngọt, được dùng trong phân tích dinh dưỡng và chuẩn đoán y khoa... Mục tiêu của đề tài là nghiên cứu thu nhận enzyme invertase từ nấm men phế thải với nội dung xác lập các thông số công nghệ nhằm phá vỡ tế bào nấm men chiết xuất invertase đạt hiệu quả cao nhất, sau đó tách và làm sạch invertase dưới dạng chế phẩm và nghiên cứu một số đặc tính của chế phẩm.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Nguồn nguyên liệu được dùng để thu nhận invertase là nấm men *Saccharomyces carlsbergensis* thải của nhà máy bia Lida, số 25A Nơ Trang Long, phường 7, quận Bình Thạnh, Tp Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. *Phá vỡ tế bào nấm men:* sử dụng phương pháp tự phân ở nhiệt độ phòng trong môi trường đệm acetate dưới tác dụng của toluene làm tác nhân kích thích [4].

2.2.2. *Tinh sạch sơ bộ enzyme invertase:* sử dụng phương pháp kết tủa bằng cồn 96° và bằng dung dịch sulfat amon bão hòa.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. *Định lượng protein hòa tan theo phương pháp Lowry.* [1]

Hàm lượng protein trong dung dịch:

$$HL \text{ protein} = \frac{y_{pro}}{1000} \cdot k \cdot \frac{V}{v} \cdot \frac{1}{m} \quad (\text{mg protein/g nấm men}) \quad (1)$$

Với: y_{pro} : nồng độ protein trong dung dịch so màu (mg/ml).

v : thể tích dịch enzym đem phản ứng (ml).

V : tổng thể tích dịch enzym thô thu được từ m gam nấm men (ml).

m : khối lượng nấm men đem tự phân (g).

k : hệ số pha loãng.

2.3.2. *Xác định hoạt tính Invertase bằng phương pháp quang phổ sử dụng thuốc thử dinitrosalicylic acid. [1]*

Hoạt tính của Invertase (HT):

$$HT = \frac{x_k}{360 \cdot 10^{-3}} \cdot \frac{1}{t} \cdot k \cdot \frac{V}{v} \cdot \frac{1}{m} \quad (\text{UI/g nấm men}) \quad (2a)$$

$$HT = \frac{x_k}{360 \cdot 10^{-3}} \cdot \frac{1}{t} \cdot k \cdot \frac{1}{v} \quad (\text{UI/ml dung dịch enzym}) \quad (2b)$$

$$HT = \frac{x_k}{360 \cdot 10^{-3}} \cdot \frac{1}{t} \cdot k \cdot \frac{V_{ht}}{v} \cdot \frac{1}{m_{cp}} \quad (\text{UI/g chế phẩm}) \quad (2c)$$

Trong đó:

x_k : nồng độ đường khử trong dung dịch đem đi so màu, được tính dựa vào phương trình đường chuẩn đường khử (mg/ml).

t : thời gian phản ứng (phút).

k : hệ số pha loãng, được tính giống như phần [2.3.3.1].

v : thể tích dịch enzym đem phản ứng (ml).

V : tổng thể tích dịch enzym thô thu được từ m gam nấm men (ml).

V_{ht} : thể tích dung dịch dùng để hòa tan m_{cp} gam chế phẩm (ml).

m : khối lượng nấm men đem tự phân (g).

m_{cp} : khối lượng chế phẩm enzym đem hòa tan (g).

Hoạt tính riêng của Invertase (HTR):

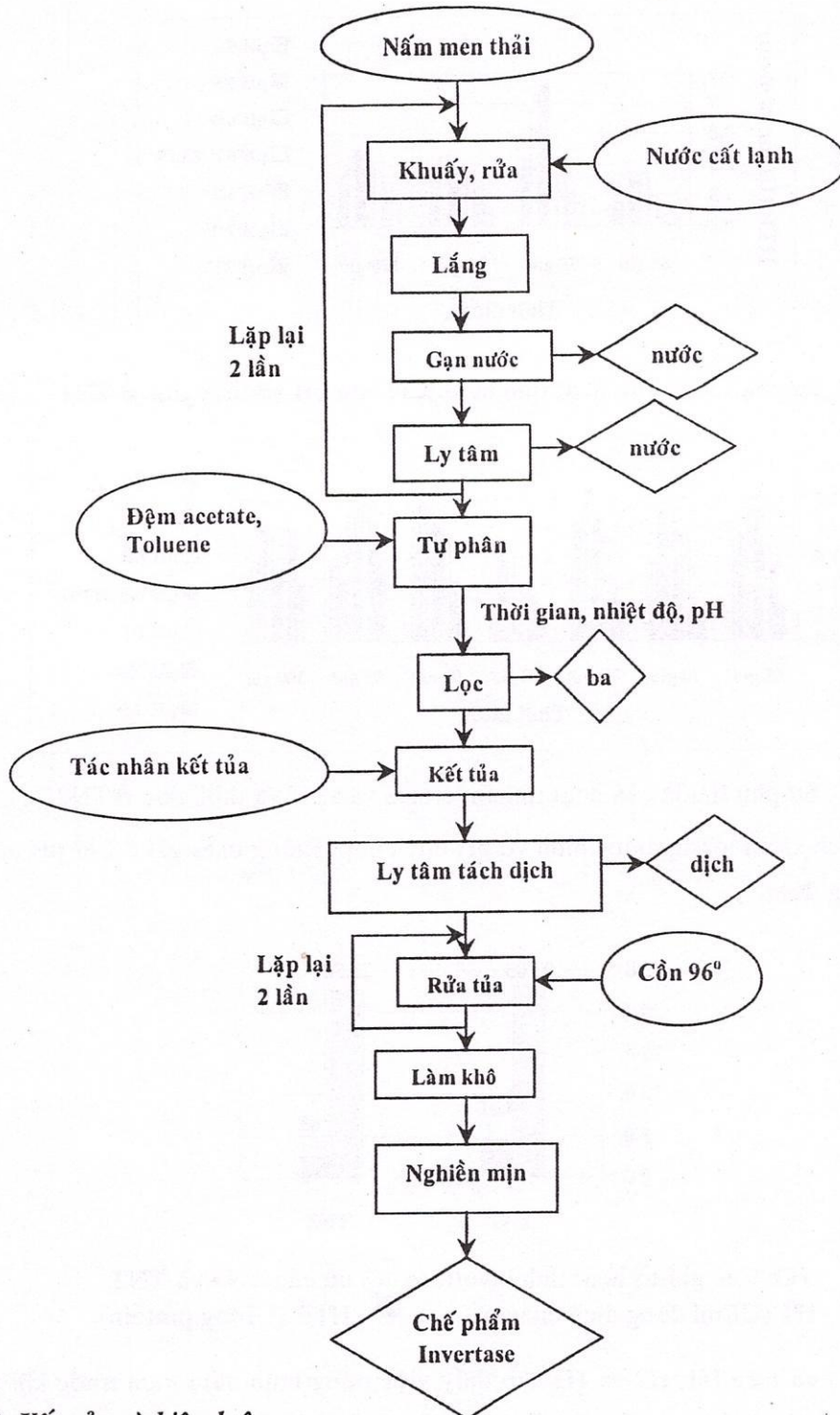
$$HTR = \frac{HT}{HL \text{ protein}} \quad (\text{UI/mg protein}) \quad (3)$$

HT: hoạt tính của Invertase.

HLprotein: hàm lượng protein trong dung dịch.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Quy trình tách chiết thu nhận invertase từ nấm men bia:



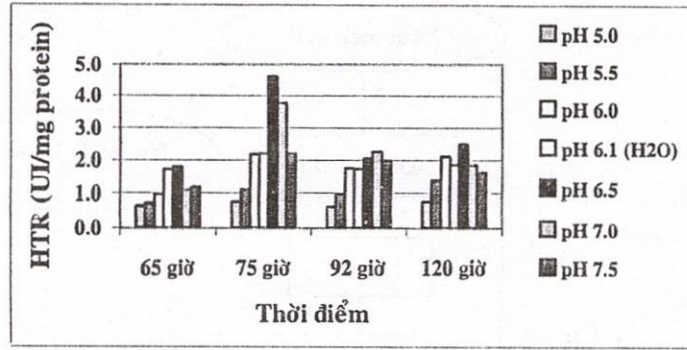
3.2. Kết quả và biện luận

3.2.1. Khảo sát thời gian và pH tự phân thích hợp:

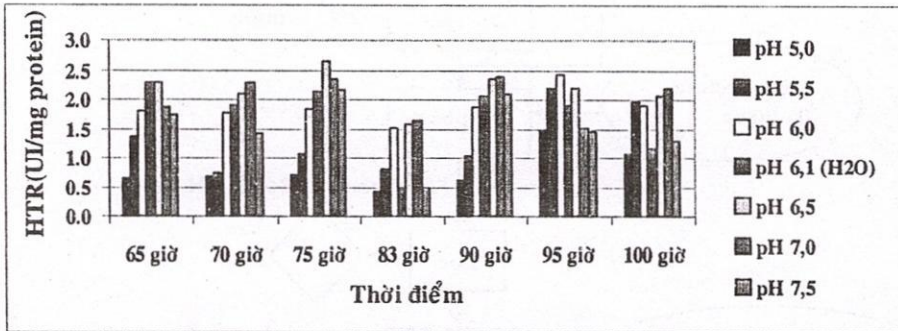
Thực hiện hai thí nghiệm:

Thí nghiệm 1: Tự phân với nguyên liệu không đông lạnh (TN1)

Thí nghiệm 2: Tự phân với nguyên liệu đông lạnh: Nấm men được lạnh đông ở -18°C , sau đó được rã đông ở nhiệt độ phòng rồi mới đem tự phân. (TN2)

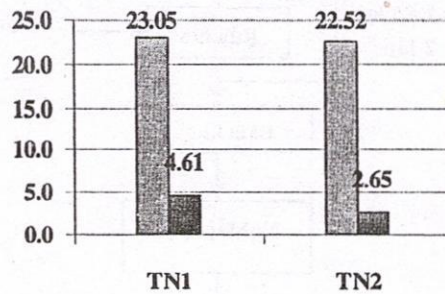


H1: Sự phụ thuộc của hoạt tính invertase vào pH và thời gian ở TN1



H2 : Sự phụ thuộc của hoạt tính invertase vào pH và thời gian ở TN2.

Dùng dung dịch kiềm loãng điều chỉnh về pH thích hợp. Riêng mẫu pH 6.1 là pH tự nhiên không sử dụng đệm.

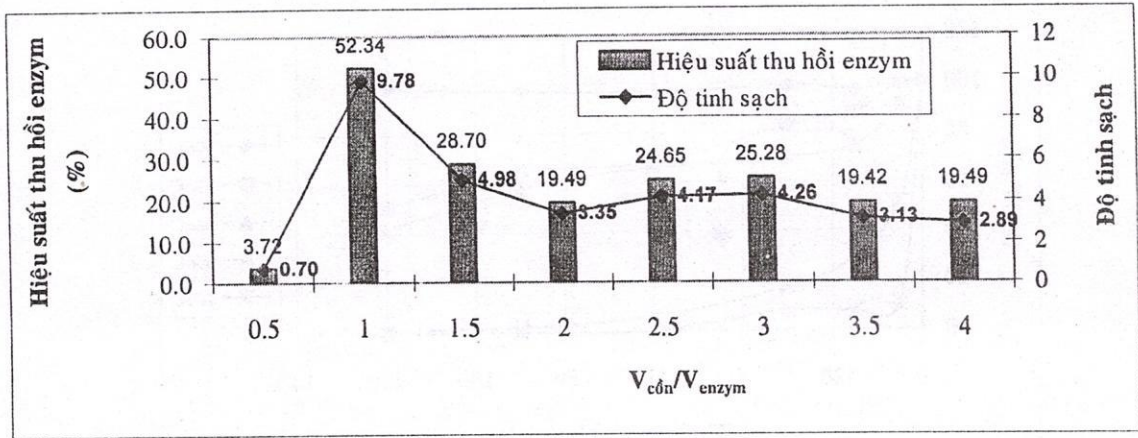


H3: Các giá trị hoạt tính invertase tối ưu của TN1 và TN2.
 ■ HT (UI/ml dung dịch enzym) ■ HTR (UI/mg protein)

Các kết quả trên H1, H2 và H3 cho thấy việc đông lạnh nấm men trước khi tự phân (TN2) không những là không cần thiết mà còn làm giảm lượng enzym invertase. Với tất cả các thí nghiệm về sau, chúng tôi đặt mẫu tự phân với nấm men không đông lạnh ở 75 giờ, pH 6,5.

3.2.2. Thu nhận Invertase bằng phương pháp kết tủa

3.2.2.1. Kết tủa enzym bằng cồn 96°



H4: Tương quan giữa hiệu suất thu hồi enzyme, độ tinh sạch theo tỉ lệ $V_{côn}/V_{enzym}$.

Độ tinh sạch được tính bằng hệ số so sánh giữa số UI/mg protein của chế phẩm so với số UI/mg protein có trong nấm men ban đầu.

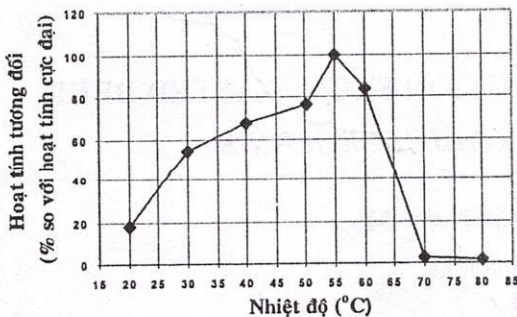
Kết quả là với tỉ lệ $V_{côn}/V_{enzym}$ bằng 1, chế phẩm Invertase thu được có độ tinh sạch cao nhất, gấp 9,7 lần so với ban đầu.

3.2.2.2. Kết tủa enzyme bằng dung dịch sulfat amon bão hòa

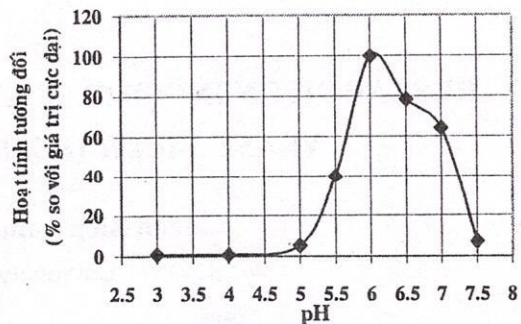
Thí nghiệm cho thấy việc sử dụng dung dịch sulfat amon bão hòa không hiệu quả bằng cồn 96°.

3.2.3. Khảo sát đặc tính của chế phẩm.

Hoạt tính cực đại của chế phẩm Invertase thu được ở điều kiện: nhiệt độ 55°C và pH 6,0. Hằng số Michaelis Menten là: $K_m = 7,31 \cdot 10^{-2}$ mol/l



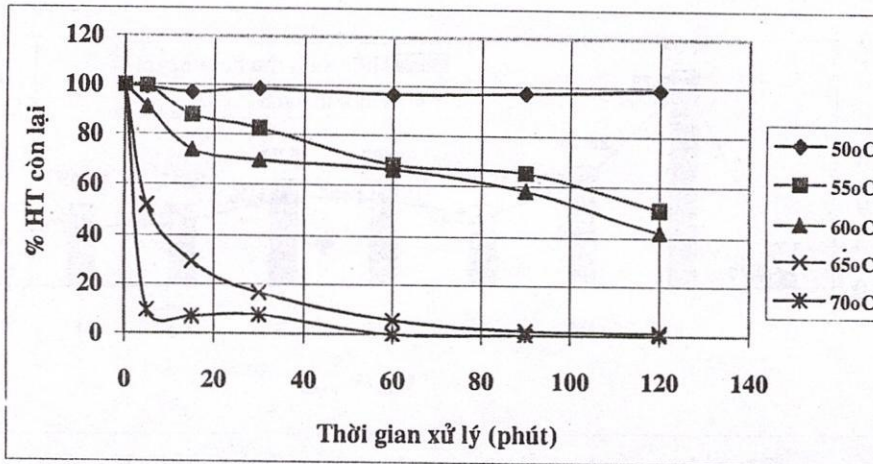
H5: Ảnh hưởng của nhiệt độ.



H6: Ảnh hưởng của pH

3.2.4. Độ bền của chế phẩm enzyme ở các nhiệt độ khác nhau

Kết quả trên H5 và H7 cho thấy mặc dù hoạt tính của chế phẩm đạt cực đại ở 55°C nhưng chế phẩm không bền ở nhiệt độ vượt quá 50°C. Vì vậy khi ứng dụng chế phẩm Invertase vào sản xuất thì nhiệt độ thích hợp nhất là 50°C.



H7: Độ bền nhiệt của enzym invertase theo thời gian xử lý nhiệt.

4. Kết luận

- Điều kiện tự phân thích hợp để thu nhận Invertase từ nấm men bia *Saccharomyces carlsbergensis* là tự phân hỗn hợp huyền phù nấm men 10% (w/v) trong dung dịch đệm acetate pH 6,5; có bổ sung toluene tỉ lệ 10% làm tác nhân kích thích trong thời gian 75 giờ.
- Sử dụng tác nhân kết tủa là cồn 96° với tỉ lệ 1:1 (v/v) để thu nhận chế phẩm.
- Hoạt tính cực đại của chế phẩm Invertase thu được ở các điều kiện nhiệt độ 55°C và pH 6,0.
- Chế phẩm invertase thu được bền ở nhiệt độ dưới 50°C. Khi tăng nhiệt độ trên 60°C, invertase bị biến tính và hoạt tính giảm nhanh.
- Enzym invertase từ nấm men bia *Saccharomyces carlsbergensis* có hằng số Michaelis – Menten K_m bằng $7,31 \cdot 10^{-2}$ mol/l.

RESEARCH ON INVERTASE EXTRACTION FROM WASTED BEER YEAST *SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS*

Tran Bich Lam, Nguyen Tuyet Mai

University of Technology

ABSTRACT: Research on Invertase extraction from wasted yeast beer is to make use of a tremendous amount of beer yeast wasted from beer industry effectively. Disruption of beer yeast cells by autolysis in acetate buffer solution with toluene as an initiator. The result is under the condition 10 percent (w/v) yeast suspension in acetate buffer solution pH 6.5 together with 10 percent of suspension volume Toluene in 75 hours give the highest Invertase activity extract. Preliminary separation of Invertase from the extract by 96 degree alcohol gives the highest activity enzym product with the ratio 1:1(v/v). Invertase maximum activity is 55°C and pH6.0. The Michaelis Menten constant is 7.31×10^{-2} mol/l. Suitable

temperature when applying Invertase in manufacture is 50°C. After 3 weeks of preservation at 0°C to 2°C, the Invertase activity does not decrease.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Mùi, *Thực hành hóa sinh học*, NXB Khoa học & Kỹ thuật, Hà Nội, 2001.
2. Nguyễn Văn Thường, Nguyễn Thanh Hằng, *Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn ethylic*, NXB Khoa học & Kỹ Thuật, 2000.
3. Alan Wiseman, *Handbook of enzym biotechnology*, 3rd edition, Ellis Horwood.
4. Wilfred N. Arnold, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, *p-Toluenethiol as an initiator of autolysis in bakers' yeast*, Journal of bacteriology, 1971.
5. <http://fst.sagepub.com/cgi/reprint/7/5/445>, *Effect of Homogenization as Pretreatment for the Improvement of Autolysis Efficiency of Kluyveromyces fragilis*.
6. <http://www.invertase.net/>