

# Thu nhận và cố định Glucoamylase và Pectinase bằng kỹ thuật CLEA

- Trần Thị Linh Giang
- Huỳnh Ngọc Oanh

Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG – HCM

## TÓM TẮT

Kỹ thuật CLEA (cross-linking enzyme aggregates) kết hợp hai quá trình thu nhận và cố định enzyme từ môi trường dung dịch vào cùng một bước. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã ứng dụng kỹ thuật CLEA để cố định hai loại enzyme, glucoamylase và pectinase, từ dịch enzyme thô thu nhận từ môi trường nuôi cấy nấm mốc *Aspergillus niger*. Kết quả nghiên cứu

thu được tại cùng điều kiện cố định (7% glutaraldehyde, 5°C trong 2 giờ cho glucoamylase; 10% glutaraldehyde, 5°C trong 2 giờ cho pectinase) cho thấy enzyme cố định từ dịch enzyme nuôi cấy có khả năng tái sử dụng và khả năng ổn định hoạt tính dưới ảnh hưởng của pH/nhiệt độ cao hơn enzyme thương mại cố định tương ứng.

**Từ khóa:** CLEA, pectinase, glucoamylase.

## 1. GIỚI THIỆU

CLEA là kỹ thuật cố định enzyme, bằng cách gắn kết các phân tử enzyme lại với nhau bởi những liên kết chéo với tác nhân gắn nhĩ chức dialdehyde, sau khi những phân tử này đã được tập hợp lại gần, và enzyme dạng CLEA có thể tái sử dụng được.

Trong công nghiệp sản xuất nước quả hay rượu vang, glucoamylase và pectinase đóng vai trò rất quan trọng và được ứng dụng rất nhiều, glucoamylase có tác dụng thủy phân tinh bột làm tăng hàm lượng đường và pectinase làm giảm độ đục cũng như giảm sự lắng cặn trong sản phẩm.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng kỹ thuật cố định CLEA với tác nhân gắn nhĩ chức là glutaraldehyde. Đồng thời đánh giá hiệu quả của enzyme cố định dạng CLEA thu nhận từ

vi sinh vật và thương mại ở cùng điều kiện cố định, để thấy rằng kỹ thuật CLEA có thể trực tiếp cố định enzyme từ dịch enzyme thô mà không cần phải trải qua quá trình tinh sạch vẫn đạt được hiệu suất cao.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

Chủng nấm mốc *Aspergillus niger* được cung cấp bởi bộ môn Công nghệ sinh học trường Đại học Bách Khoa – Đại học Quốc Gia Thành Phố Hồ Chí Minh.

Glucoamylase thương mại và Pectinex Ultra SP-L thương mại là sản phẩm của hãng Novo, công ty Nam Giang.

### 2.2. Thu nhận enzyme glucoamylase và pectinase từ môi trường bán rắn nuôi cấy *Aspergillus niger*

Nấm mốc *Aspergillus niger* được giữ giống trên môi trường Czapek-dox.

Thành phần môi trường nuôi cấy thu nhận enzyme glucoamylase gồm: cám gạo 70%, trấu 22%, bã sắn 5%, acid oleic 3%, nước cất và thành phần khoáng Czapek-dox tạo độ ẩm 50%. Nuôi cấy trong 54h ở nhiệt độ phòng [3].

Thành phần môi trường nuôi cấy thu nhận enzyme pectinase gồm: cám gạo 65,5%, trấu 21,5%, bột cà rốt 11%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2%, độ ẩm 55%. Nuôi cấy trong 48h ở nhiệt độ phòng [1].

Hòa tan môi trường qua nuôi trong nước cất hoặc dung dịch đệm thích hợp, ở đây chúng tôi sử dụng nước cất, tỉ lệ nước cất và môi trường là 3:1. Chiết lấy dịch lỏng qua vải lọc. Ly tâm dịch qua lọc 4000 vòng/phút trong 10 phút. Thu dịch sau ly tâm ta được enzyme ở dạng hòa tan.

### 2.3. Cố định enzyme

Chuẩn bị 100 ml dịch enzyme thu nhận từ môi trường nuôi cấy nấm mốc *Aspergillus niger*.

Bổ sung tác nhân tủa enzyme là ethanol 96<sup>o</sup> với tỉ lệ 2 tác nhân tủa:1 dịch enzyme, khuấy đều và để yên trong 15 phút (tất cả thao tác đều thực hiện trong nhiệt độ lạnh 3 – 5<sup>o</sup>C).

Bổ sung tác nhân tẩy gán là glutaraldehyde, cố định trong khoảng thời gian và nhiệt độ xác định. Tiến hành lọc hút chân không thu tủa. Rửa tủa bằng nước cất, sau đó cân khối lượng tủa và xác định hoạt tính enzyme.

### 2.4. Công thức tính các đại lượng trong kết quả

1- Hiệu suất cố định protein (%) =  $\frac{\Sigma \text{protein cố định}}{\Sigma \text{protein ban đầu}} \times 100$

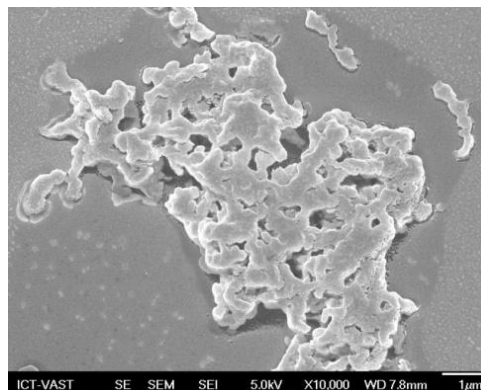
2- Hiệu suất cố định enzyme (%) =  $\frac{\Sigma \text{hoạt tính enzyme cố định}}{\Sigma \text{hoạt tính enzyme ban đầu}} \times 100$

3- Hiệu suất tái sử dụng theo mẻ (%) =  $\frac{\Sigma \text{hoạt tính enzyme sử dụng lần } n}{\Sigma \text{hoạt tính enzyme sử dụng lần đầu}} \times 100$

### 2.5. Kết quả và thảo luận

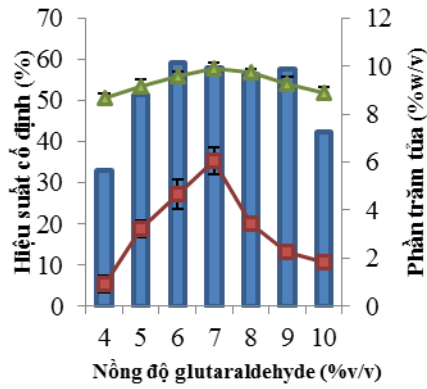
Kí hiệu: E<sub>TM</sub>: enzyme thương mại, E<sub>TH</sub>: enzyme thô thu nhận từ môi trường nuôi cấy nấm mốc *Aspergillus niger*.

#### 2.5.1 Khảo sát điều kiện cố định glucoamylase

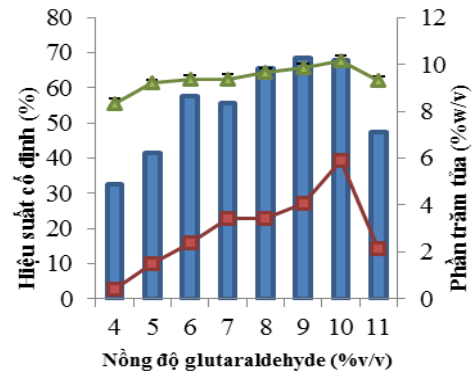


**Hình 1.** Glucoamylase dạng CLEA dưới kính hiển vi điện tử quét.

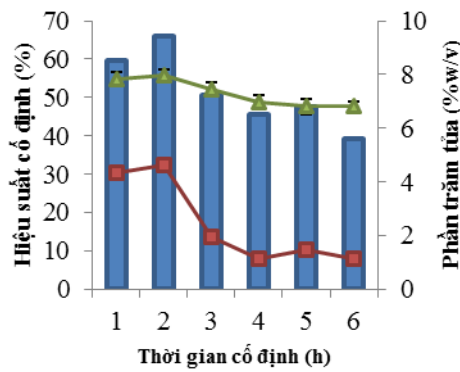
Kết quả biểu thị ở hình 2 cho thấy điều kiện cố định enzyme glucoamylase từ dịch enzyme nuôi cấy: 7% glutaraldehyde, 5<sup>o</sup>C trong 2 giờ (với hiệu suất cố định enzyme: 37,85%, hiệu suất cố định protein: 45,06%). Enzyme cố định được tạo thành ở dạng khối tủa, có độ cứng, có tính dẻo. Kết quả dưới kính hiển vi điện tử quét cho thấy kích thước các khối CLEA đạt 5 – 20 μm, có nhiều lỗ trống trong khối enzyme cố định làm diện tích tiếp xúc bề mặt enzyme với cơ chất tăng, thuận lợi cho quá trình xúc tác của các phân tử enzyme nằm phía bên trong khối CLEA (hình 1).



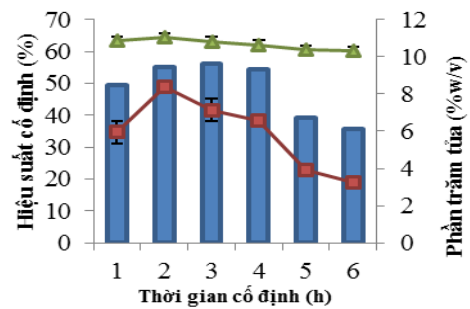
(a)



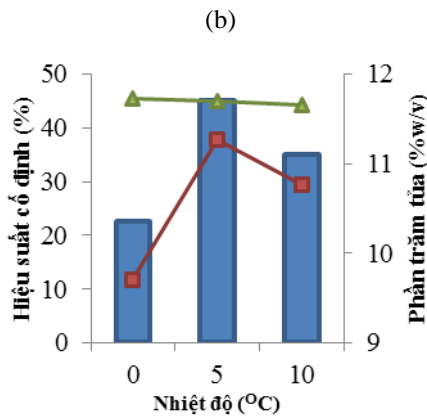
(a)



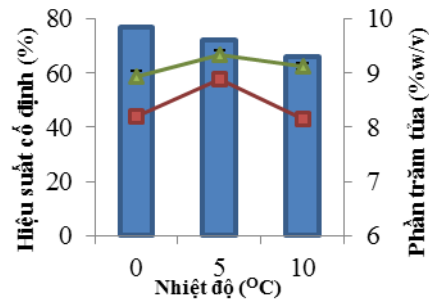
(b)



(b)



(c)



(c)

, ▲ hiệu suất cố định protein

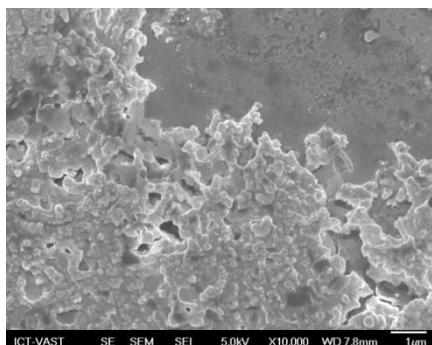
**Hình 2.** Ảnh hưởng của nồng độ glutaraldehyde (a), thời gian cố định (b), nhiệt độ cố định (c) đến khả năng cố định glucoamylase (biểu đồ cột biểu diễn phần trăm lượng tủa, ■ hiệu suất cố định enzyme, ▲ hiệu suất cố định protein).

### 2.5.2 Khảo sát điều kiện cố định pectinase

**Hình 3.** Ảnh hưởng của nồng độ glutaraldehyde (a), thời gian cố định (b), nhiệt độ cố định (c) đến khả năng cố định pectinase (biểu đồ cột biểu diễn phần trăm lượng tủa, ■ hiệu suất cố định enzyme).

Kết quả trình bày ở hình 3 cho thấy điều kiện cố định pectinase từ dịch enzyme nuôi cấy: 10%

glutaraldehyde, 5°C trong 2 giờ (với hiệu suất cố định enzyme: 57,61%, hiệu suất cố định protein: 66,67%). Enzyme pectinase cố định cũng được tạo thành ở dạng khối tủa, có độ cứng kém hơn glucoamylase dạng CLEA, có tính dẻo. Kết quả dưới kính hiển vi điện tử quét cho thấy kích thước các khối CLEA đạt 5 – 50  $\mu\text{m}$ . Giữa khối pectinase dạng CLEA cũng có những lỗ trống nhỏ làm tăng diện tích tiếp xúc của enzyme với cơ chất (hình 4).

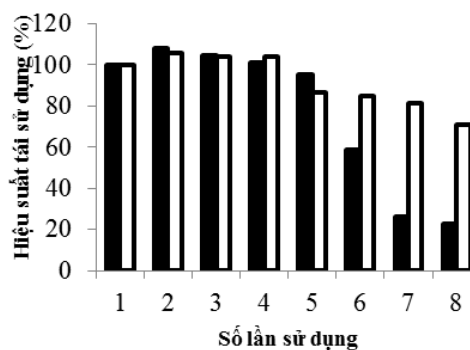


**Hình 4.** Pectinase dạng CLEA dưới kính hiển vi điện tử quét.

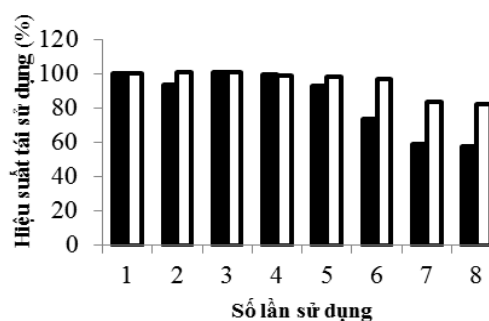
### 2.5.3 Khảo sát khả năng tái sử dụng

$E_{TM}$  và  $E_{TH}$  cố định đều giữ được hoạt tính ban đầu trong 4 lần sử dụng, hoạt tính  $E_{TM}$  cố định bắt đầu giảm dần từ lần sử dụng thứ 5. Đến lần sử dụng thứ 8,  $E_{TH}$  cố định vẫn còn giữ được 70% hoạt tính ban đầu, trong khi  $E_{TM}$  cố định chỉ còn giữ được 50% hoạt tính ban đầu (hình 5).

Với điều kiện cố định như nhau, cả enzyme pectinase và glucoamylase cố định trực tiếp từ dịch nuôi cấy vi sinh vật đều cho thấy khả năng tái sử dụng cao hơn hẳn những phân tử enzyme đã từng trải qua tinh sạch.



(a)



(b)

**Hình 5.** Hiệu suất tái sử dụng của enzyme glucoamylase (a) và pectinase (b) cố định dạng CLEA ( $\square$   $E_{TH}$  cố định,  $\blacksquare$   $E_{TM}$  cố định)

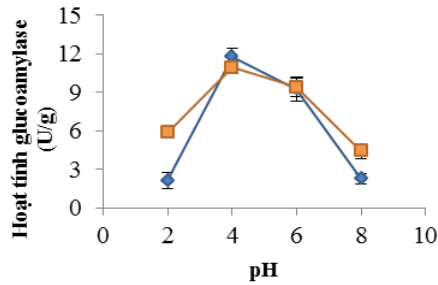
### 2.5.4 Khảo sát hoạt động của enzyme cố định dạng CLEA dưới ảnh hưởng của pH/t<sup>o</sup>

#### Ảnh hưởng của pH

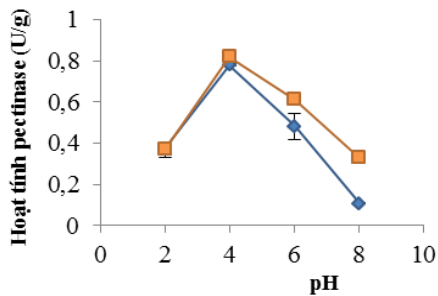
Tại pH 2, trong khi glucoamylase cố định từ  $E_{TM}$  chỉ còn giữ được 18% hoạt tính, thì glucoamylase cố định từ  $E_{TH}$  vẫn còn giữ được 54% hoạt tính (Pectinase là nhóm enzyme chịu được acid nên khi giảm pH xuống 2 thì mặc dù hoạt tính có giảm đi nhưng sự khác biệt giữa hai trường hợp là không nhiều).

Tại pH 8,  $E_{TM}$  cố định chỉ còn giữ được dưới 20% hoạt tính, trong khi  $E_{TH}$  cố định vẫn còn giữ được 40% hoạt tính (hình 6).

Chứng tỏ, khi pH vượt khỏi giá trị pH tối ưu, enzyme cố định từ môi trường nuôi cấy có độ ổn định hoạt tính cao hơn là enzyme thương mại cố định.



a)



(b)

**Hình 6.** Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của enzyme glucoamylase (a) và pectinase (b) cố định dạng CLEA (■  $E_{TH}$  cố định, ◆  $E_{TM}$  cố định)

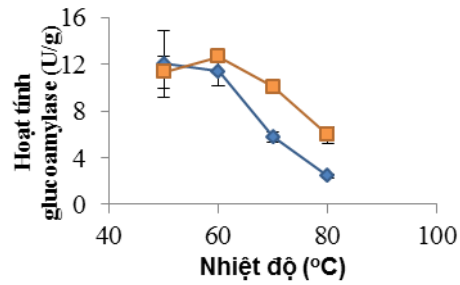
✚ Ảnh hưởng của nhiệt độ

Thông thường, glucoamylase hoạt động tốt nhất ở 50°C. Khi tăng nhiệt độ lên 80°C, trong khi glucoamylase cố định từ  $E_{TM}$  chỉ còn giữ được 20% hoạt tính, thì glucoamylase cố định từ  $E_{TH}$  vẫn còn giữ được trên 50% hoạt tính (hình 7a).

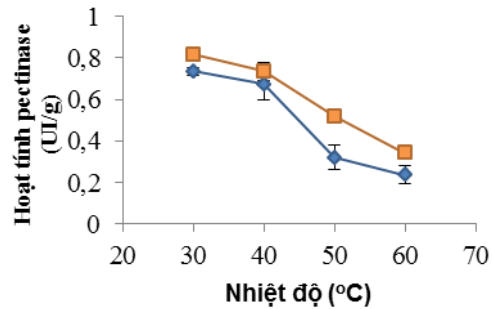
Pectinase hoạt động tối ưu ở nhiệt độ thấp hơn glucoamylase, chỉ khoảng 30°C, thường bị mất hoạt tính khi tăng nhiệt độ lên 50 – 60°C. Kỹ thuật cố định CLEA giúp pectinase vẫn còn giữ được hoạt tính khi ở 60°C. Trong khi pectinase thương mại cố định chỉ còn giữ được

32% hoạt tính, thì pectinase cố định từ  $E_{TH}$  vẫn còn giữ được đến 41% hoạt tính (hình 7b).

Kết quả này cho thấy enzyme cố định từ nguồn chưa tinh sạch có độ ổn định nhiệt cao hơn là enzyme cố định từ nguồn đã trải qua tinh sạch.



(a)



(b)

**Hình 7.** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của enzyme glucoamylase (a) và pectinase (b) cố định dạng CLEA (■  $E_{TH}$  cố định, ◆  $E_{TM}$  cố định)

3. KẾT LUẬN

Với nồng độ tay gắn glutaraldehyde là 7%, enzyme glucoamylase được cố định từ môi trường nuôi cấy *Aspergillus niger* trong thời gian 2h tại 5°C cho hiệu suất cố định enzyme: 37,85% và hiệu suất cố định protein: 45,06%.

Cũng tại nhiệt độ 5°C và thời gian cố định là 2h, nhưng với nồng độ glutaraldehyde được bổ sung là 10%, enzyme pectinase được cố định từ môi trường nuôi cấy *Aspergillus niger* cho hiệu suất cố định enzyme: 57,61% và hiệu suất cố định protein: 66,67%.

Với điều kiện cố định như nhau, enzyme cố định từ môi trường nuôi cấy *Aspergillus niger* cho thấy khả năng tái sử dụng và khả năng ổn

định hoạt tính trong những điều kiện pH và nhiệt độ khắc nghiệt cao hơn enzyme thương mại cố định.

Vậy, kỹ thuật CLEA hiệu quả hơn đối với nguồn enzyme chưa trải qua quá trình tinh sạch. Làm nổi bật lên điểm quan trọng của kỹ thuật CLEA là kết hợp quá trình tủa và cố định vào cùng một bước, bỏ qua bước tinh sạch, làm tăng hiệu quả cố định enzyme.

## Preparation and immobilization Glucoamylase and Pectinase by CLEA method

- Tran Thị Linh Giang
- Huỳnh Ngọc Oanh

Ho Chi Minh city University of Technology, VNU-HCM

### ABSTRACT

*CLEA method (cross-linking enzyme aggregates) combines enzyme preparation and immobilization from solution culture into the same step. In this study, we applied CLEA method to immobilize two enzymes, glucoamylase and pectinase, from crude enzyme solution obtained from semi-solid culture of *Aspergillus niger*. The results*

*showed that: In the same immobilized conditions (glucoamylase: 7% glutaraldehyde, 5°C, 2 hours; pectinase: 10% glutaraldehyde, 5°C, 2 hours), the immobilized enzyme from crude enzyme solution, has the abilities to be reused and activation stability under the influences of pH and temperature higher than immobilized commercial enzyme respectively.*

**Key words:** CLEA, glucoamylase, pectinase

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Huỳnh Ngọc Oanh, Trần Ngọc Hùng, Thu nhận enzyme pectinase từ *Asp.niger* - tinh sạch bằng phương pháp lọc gel & lọc màng, *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, tập 11, số 8, 46-50, 2008.
- [2]. Nguyễn Đức Lượng, *Công nghệ enzyme* tập 2, Nhà xuất bản Đại học quốc gia TpHCM, 2003.
- [3]. Ngô Minh Nhã, Đồng Thị Thanh Thu, Khảo sát khả năng thu nhận và cố định enzyme glucoamylase từ *Asp.niger* và *Asp.awamori* trên chất mang Kaolin, *Tạp chí phát triển khoa học và công nghệ*, tập 12, số 04, 2008.
- [4]. R.A. Sheldon, *Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable*

*biocatalysts*, Delft University of Technology, Julianalaan 136, 2628 BL Delft, the Netherlands, 2007.

[5]. R.A. Sheldon, R. Schoevaart, L. M. Van Langen, *Cross-linked enzyme aggregates*

*(CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review)*, Delft University of Technology, Biocatalysis and Organic Chemistry, Delft, The Netherlands, 2005.