

TINH SẠCH PROTEASE BẰNG PHƯƠNG PHÁP KẾT TỬA TỪ DỊCH CHIẾT CANH TRƯỞNG BỀ MẶT *ASPERGILLUS ORYZEA* VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA CHẾ PHẨM THU ĐƯỢC

Lê Văn Việt Mẫn, Đinh Trần Nhật Thu, Lê Thụy Minh Hải

Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Khoa Công nghệ Hóa học,

Trường Đại học Bách khoa-ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 21 tháng 2 năm 2005, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 27 tháng 4 năm 2005)

TÓM TẮT: Kết tủa là một phương pháp phổ biến hiện nay để thu nhận và tinh sạch enzyme trong sản xuất công nghiệp. Phương pháp này đơn giản và có giá thành tương đối thấp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tinh sạch enzyme protease từ dịch chiết canh trường nuôi cấy nấm mốc *Aspergillus oryzae* theo phương pháp bề mặt. Ethanol được xem là tác nhân kết tủa thích hợp. Với tỷ lệ thể tích ethanol và thể tích dịch chiết enzyme là 65/35, hiệu suất thu hồi enzyme sẽ cao nhất (65%), tương ứng với độ tinh sạch là 3,03. Chế phẩm protease thu được có $pH_{opt} = 7,0$; $T_{opt} = 50-55^{\circ}C$ và có khả năng chịu muối khá tốt. Với hàm lượng muối trong mẫu thủy phân là 50g/L và 100g/L, hoạt tính chế phẩm còn lại tương ứng là 70% và 50% so với mẫu đối chứng không bổ sung thêm muối.

1 MỞ ĐẦU:

Trong những năm gần đây cùng với sự phát triển nhanh của ngành công nghệ sinh học, các chế phẩm enzym được sản xuất ngày càng nhiều cả về sản lượng và chủng loại, đặc biệt là những enzym có nguồn gốc từ vi sinh vật. Một trong những chế phẩm enzym vi sinh vật được sản xuất và ứng dụng nhiều nhất hiện nay là protease với sản lượng trên 500 tấn/năm, chiếm hơn 40% trong tổng sản lượng các loại enzym được sản xuất trên thế giới [4,5,6].

Kết tủa là một phương pháp được sử dụng rộng rãi để tinh sạch enzym từ canh trường vi sinh vật. Trong đó, kết tủa enzym bằng dung môi hữu cơ hoặc bằng polyethylenglycol (PEG) là phương pháp đơn giản, có chi phí tương đối thấp và hiệu suất thu hồi enzyme khá cao. Hiện nay phương pháp này được sử dụng phổ biến để tinh sạch enzym trong sản xuất công nghiệp [2,4,6].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành kết tủa protease từ dịch chiết canh trường *Aspergillus oryzae* được thu nhận bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt. Để chọn tác nhân kết tủa thích hợp, chúng tôi thử sử dụng ethanol, acetone và PEG có phân tử lượng khác nhau. Sau cùng, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của pH, nhiệt độ và nồng độ muối NaCl đến hoạt tính của chế phẩm thu được nhằm xác định các điều kiện thích hợp để ứng dụng chế phẩm protease trong công nghệ thực phẩm và các ngành công nghiệp khác.

2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu:

- Chủng nấm mốc thuộc loài *Aspergillus oryzae* do Phòng thí nghiệm vi sinh, Bộ môn Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Tp. Hồ Chí Minh cung cấp.
- Các tác nhân kết tủa enzyme như ethanol (độ tinh khiết 99,5%), acetone, PEG do Trung quốc sản xuất.

Phương pháp nuôi cấy và thu nhận dịch chiết enzyme protease:

- Thành phần môi trường tối ưu để nuôi cấy *Aspergillus oryzae* theo phương pháp bề mặt, nhằm mục đích sinh tổng hợp protease như sau: cám - 83%; trấu - 4,3%; bột đậu nành - 12,7%; độ ẩm ban đầu của môi trường trước khi cấy giống là 50% [1].
- Điều kiện nuôi cấy sinh tổng hợp enzyme protease: môi trường được đựng trong các khay bằng inox và đưa qua tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút rồi làm nguội về 30°C. Trộn bào tử nấm mốc *Aspergillus oryzae* với nước vô khuẩn rồi cấy giống bằng cách phun huyền phù này lên bề mặt của môi trường. Chiều dày môi trường trong khay nuôi không quá 3cm. Quá trình nuôi cấy được thực hiện trong tủ ẩm ở 30°C trong thời gian 48 giờ [1].
- Điều kiện tối ưu trích ly protease từ canh trường bề mặt được xác định bằng phương pháp thực nghiệm. Dung môi trích ly là dung dịch đệm phosphate có pH=6,5. Tỷ lệ canh trường và dung môi là 1/8 (kg/L), nhiệt độ trích ly: 20°C, thời gian: 35 phút, tốc độ khuấy trộn trong quá trình trích ly là 200 vòng/phút. Sau quá trình trích ly, ta tiến hành ly tâm để loại bỏ các chất không tan. Dịch chiết enzyme thô thu được có hoạt tính là 0,13 đvhd/mL.

Các phương pháp phân tích:

- Hoạt tính protease được xác định theo phương pháp Anson cải tiến [7]
- Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp Lowry [7]

Công thức tính toán:

- Hoạt tính riêng là số đơn vị hoạt độ enzyme tính trên 1mg protein của chế phẩm
- Hiệu suất thu hồi protease là tỷ lệ giữa tổng hoạt tính enzyme thu được sau quá trình tinh sạch và tổng hoạt tính enzyme trong mẫu trước khi đem tinh sạch.
- Độ tinh sạch là tỷ lệ giữa hoạt tính riêng của enzyme thu được sau quá trình tinh sạch và hoạt tính riêng của mẫu enzyme trước khi đem tinh sạch.

3 KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

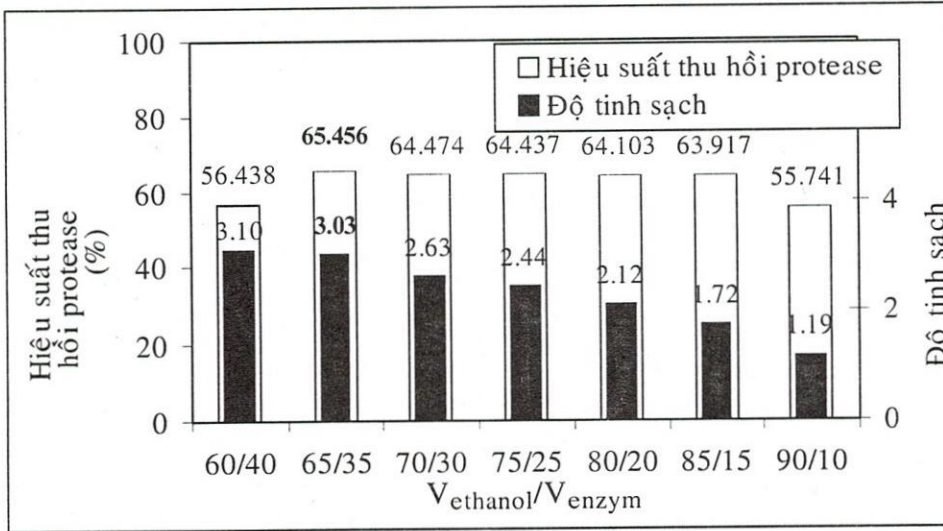
3.1 Kết quả protease từ dịch chiết canh trường nuôi cấy *Aspergillus oryzae* theo phương pháp bề mặt

Kết quả protease bằng ethanol:

Để kết quả enzyme bằng dung môi hữu cơ, dịch chiết enzyme và dung môi được làm lạnh lần lượt về 2°C và -18°C trước khi phối trộn với nhau. Sau khi phối trộn, kết quả được tách ra khỏi hỗn hợp bằng phương pháp ly tâm (Tốc độ ly tâm: 4000 vòng/phút, nhiệt độ: 4°C, thời gian: 30 phút). Kết quả được trình bày ở hình 1.

Ta thấy khi tỷ lệ $V_{\text{ethanol}}/V_{\text{enzyme}}$ là 60/40, hiệu suất thu hồi protease đạt 56,4%. Nếu ta tăng tỷ lệ dung môi và dịch chiết enzyme đến 65/35 – 85/15, hiệu suất thu hồi protease sẽ tăng và dao động trong khoảng 63,9-65,4%. Có lẽ đó là do khi số phân tử dung môi trong hỗn hợp tăng, chúng sẽ tách triệt để hơn lớp phân tử nước bao lấy xung quanh phân tử protein, làm giảm tính tan của protein, tăng khả năng kết quả của chúng [2]. Do đó, lượng enzyme thu được sau quá trình kết quả sẽ tăng. Tuy nhiên, nếu ta tiếp tục tăng thêm lượng dung môi sử dụng $V_{\text{ethanol}}/V_{\text{enzyme}} = 90/10$, hiệu suất thu hồi enzyme giảm.

Kết quả ở hình 1 cho thấy với tỷ lệ thể tích $V_{\text{ethanol}}/V_{\text{enzym}}$ là 65/35 thì hiệu suất thu hồi protease lớn nhất và độ tinh sạch cao gấp 3,03 lần so với dịch chiết ban đầu. Tỷ lệ $V_{\text{ethanol}}/V_{\text{enzym}}$ thích hợp nhất để kết quả dịch chiết protease bằng ethanol được chọn là 65/35.



Hình 1: Hiệu suất thu hồi protease và độ tinh sạch của chế phẩm thu được khi kết tủa bằng ethanol

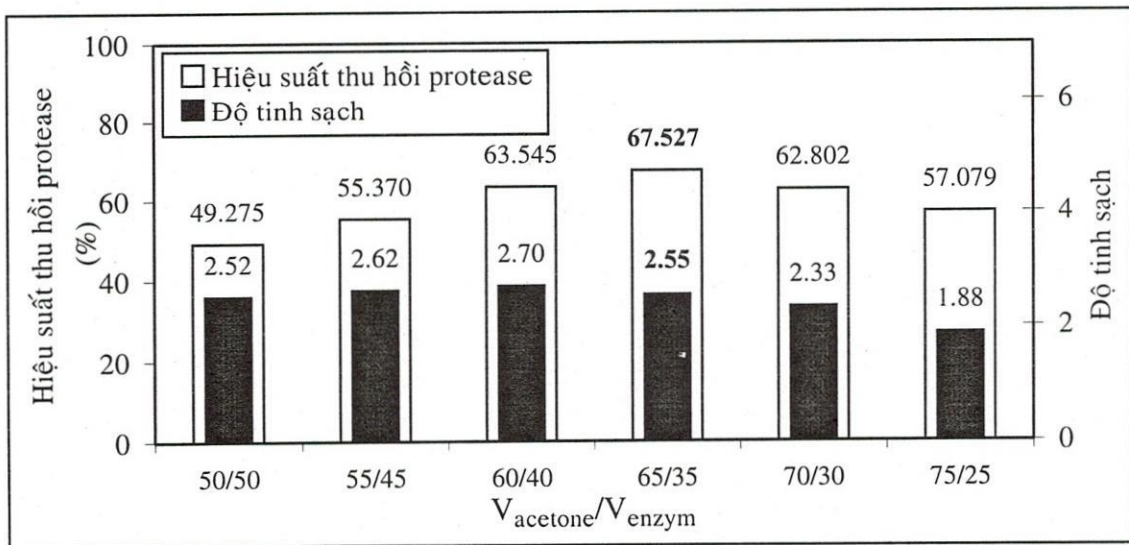
Kết tủa protease bằng acetone:

Kết quả thực nghiệm được trình bày ở hình 2. Ta nhận thấy sự ảnh hưởng hàm lượng aceton sử dụng đến hiệu suất thu hồi enzyme cũng tương tự như ethanol. Nếu tỷ lệ $V_{acetone}/V_{enzym}$ quá cao sẽ gây biến tính bất thuận nghịch enzyme, do đó hiệu suất thu hồi enzyme sẽ giảm. Tỷ lệ thích hợp $V_{acetone}/V_{enzym}$ là 65/35.

Kết tủa protease bằng PEG

Trong công nghiệp sản xuất chế phẩm enzyme hiện nay, PEG được sử dụng như là một tác nhân kết tủa nhiều loại enzyme khác nhau: rennin, pepsine... [2,6]. Một số nghiên cứu gần đây đã thử nghiệm thành công dùng PEG để kết tủa enzyme từ dịch chiết của các canh trường nuôi cấy vi sinh vật theo phương pháp bề mặt.

Hình 2: Hiệu suất thu hồi protease và độ tinh sạch của chế phẩm protease thu được khi kết tủa bằng acetone



Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thử nghiệm sử dụng 4 loại PEG dạng tinh thể là PEG400, PEG1500, PEG4000 và PEG6000. Dịch chiết enzyme ban đầu có hoạt tính protease là 0,13 đvhd/mL. Quá trình kết tủa được thực hiện ở nhiệt độ 30°C. Ứng với mỗi loại PEG, chúng tôi bổ sung trực tiếp vào dịch chiết enzyme với nồng độ thay đổi từ 5-50% và khuấy đều. Ở một số thí nghiệm, chúng tôi

không thấy xuất hiện kết tủa. Ở một số thí nghiệm khác, chúng tôi thu được kết tủa nhưng hiệu suất thu hồi enzyme rất thấp – không lớn hơn 10%. Chúng tôi có thử nghiệm cô đặc chân không mẫu dịch chiết để tăng nồng độ enzyme lên cao hơn (0,6 đvhd/mL) nhưng kết quả thu được vẫn tương tự như trên.

Lựa chọn tác nhân kết tủa thích hợp:

Kết quả thực nghiệm cho thấy PEG không phải là tác nhân thích hợp để kết tủa protease từ dịch chiết canh trường bề mặt *A. oryzae*. Để làm sáng tỏ điều này, ta cần tìm hiểu thêm về các bậc cấu trúc của những phân tử protein enzyme có trong dịch chiết.

Khi so sánh khả năng kết tủa protease của ethanol và acetone, chúng tôi nhận thấy hàm lượng tối ưu của hai dung môi cần sử dụng là như nhau ($V_{\text{dung môi}}/V_{\text{enzym}} = 65/35$). Hiệu suất thu hồi protease khi sử dụng ethanol thấp hơn đôi chút khi ta so sánh với acetone (thấp hơn 3,06%) nhưng độ tinh sạch lại cao hơn nhiều (cao hơn 19,29%). Trên thị trường hiện nay, ethanol có giá thành thấp hơn acetone. Do đó, ethanol được xem là tác nhân kết tủa thích hợp nhất để thu nhận chế phẩm protease từ canh trường *Aspergillus oryzae*. Khi đó, chế phẩm protease thu được có hoạt độ riêng là 448 đvhd/mg protein.

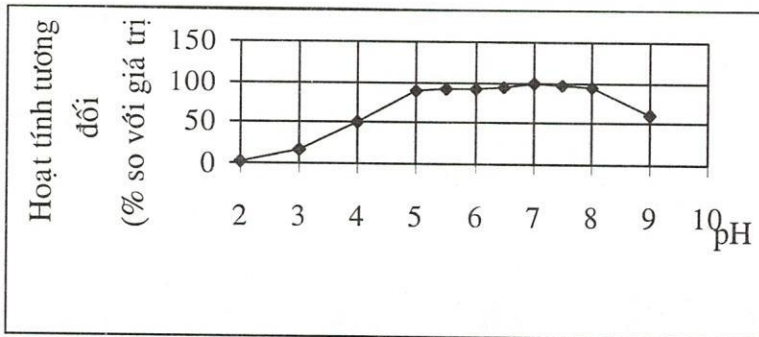
3.2 Khảo sát một số tính chất của chế phẩm protease thu được

Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của chế phẩm thu được

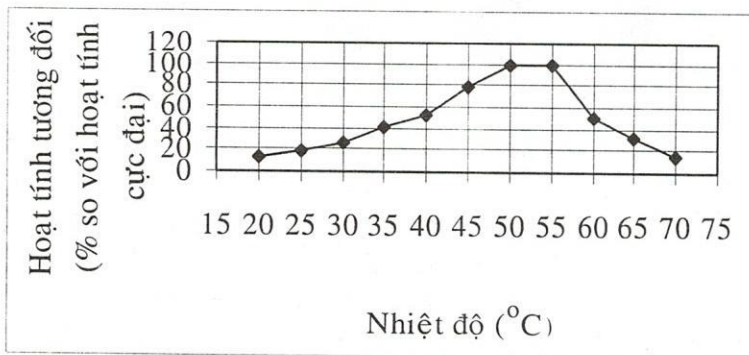
Kết quả khảo sát được trình bày ở hình 3. Hoạt tính lớn nhất của chế phẩm ở pH = 7,0. Nhìn chung, khoảng pH hoạt động thích hợp của chế phẩm khá rộng [5,0-8,0]. Có lẽ trong kết tủa thu được có chứa hỗn hợp các protease khác nhau. Trong phần nghiên cứu sắp tới, chúng tôi sử dụng phương pháp sắc ký lọc gel và phương pháp điện di để tách và xác định từng loại protease cụ thể.

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của chế phẩm thu được

Chúng tôi khảo sát hoạt tính protease ở pH môi trường là 7,0; nhiệt độ phản ứng thủy phân thay đổi từ 20-70°C. Kết quả ở hình 4 cho thấy nhiệt độ hoạt động tối ưu của chế phẩm nằm trong khoảng 50-55°C, tại đó hoạt tính của protease cao hơn 3 lần so với hoạt tính ở nhiệt độ thường (30°C). Ở 60°C, enzyme bị ức chế mạnh, hoạt tính chỉ bằng 52% so với ở giá trị nhiệt độ 50-55°C.



Hình 3: Sự thay đổi hoạt tính protease trong khoảng pH [2-9]



Hình 4: Sự thay đổi hoạt tính của protease theo nhiệt độ phản ứng

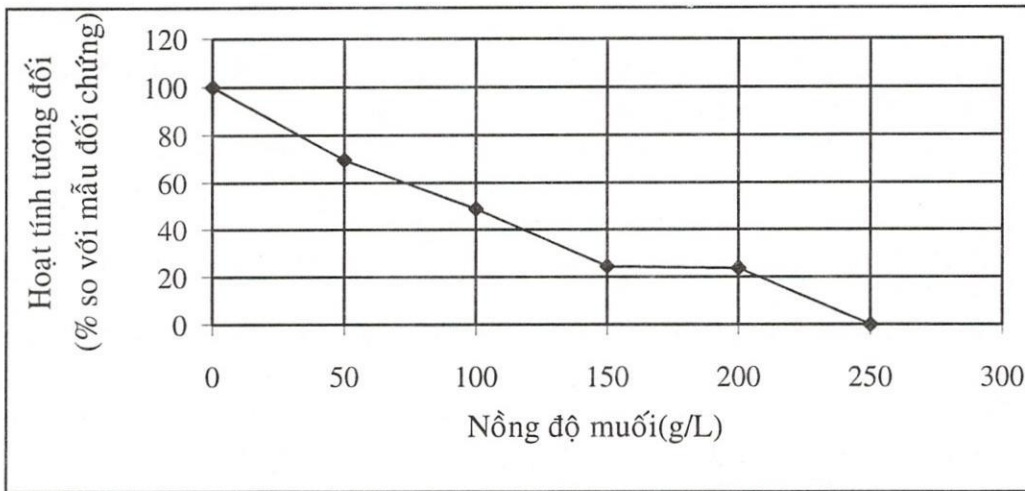
Khảo sát ảnh hưởng của NaCl đến hoạt tính của chế phẩm thu được

Muối ăn là một phụ gia rất phổ biến trong công nghiệp thực phẩm. Để ứng dụng chế phẩm protease trong chế biến thịt cá, việc khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng muối đến hoạt tính enzyme là cần thiết. Chế phẩm protease chịu muối sẽ có nhiều ứng dụng hơn trong công nghiệp thực phẩm.

Muối NaCl được pha trong nước với nồng độ 300 g/L. Hoạt tính của protease được xác định theo phương pháp Anson cải tiến ở nhiệt độ phản ứng là 55°C, pH môi trường là 7,0. Các mẫu thí nghiệm chứa cùng một hàm lượng cơ chất và enzyme được bổ sung thêm dung dịch NaCl đã pha ở trên với những tỉ lệ khác nhau để nồng độ muối trong mẫu đạt 50, 100, 150, 200 và 250g/L. Mẫu đối chứng được thực hiện trong các điều kiện tương tự nhưng không bổ sung thêm dung dịch NaCl. Kết quả được trình bày trong hình 5.

Từ hình 5, chúng tôi nhận thấy hoạt tính của protease bị ảnh hưởng đáng kể bởi NaCl. Với hàm lượng muối trong mẫu thủy phân là 50g/L, hoạt tính enzyme bằng 70% so với mẫu đối chứng không bổ sung thêm muối. Với nồng độ muối là 100g/L, hoạt tính protease còn lại là 50%; và với nồng độ muối 250g/L, enzym gần như bị vô hoạt hoàn toàn.

Tuy nhiên, khả năng chịu muối của chế phẩm thu được là khá cao so với một số chế phẩm enzym khác. Hoạt tính của một số chế phẩm protease chỉ còn lại 20-30% so với mẫu đối chứng khi nồng độ NaCl đạt đến 100 g/L [3].



Hình 5: Ảnh hưởng của nồng độ muối đến hoạt tính của chế phẩm protease thu nhận

4 KẾT LUẬN

Tác nhân kết tủa thích hợp để thu nhận chế phẩm protease từ canh trường nuôi cấy bề mặt nấm mốc *Aspergillus oryzae* là ethanol, tỷ lệ tối ưu $V_{ethanol}/V_{enzym}$ là 65/35. Khi đó, hiệu suất thu hồi enzyme là 65% và độ tinh sạch là 3,03.

Chế phẩm thu được có $pH_{opt} = 7,0$ và $Topt = 50-55^{\circ}C$. Protease từ *Aspergillus oryzae* có khả năng chịu muối NaCl khá tốt. Ở nồng độ NaCl 50-100g/L, hoạt tính protease giảm từ 30-50% so với mẫu đối chứng không có bổ sung muối. Chúng tôi đang tiếp tục khảo sát quá trình tinh sạch enzyme bằng phương pháp lọc gel và ứng dụng chế phẩm thu được trong chế biến thịt, cá.

PROTEASE PRECIPITATION FROM THE EXTRACT OF *ASPERGILLUS ORYZAE* SURFACE CULTURE AND DETERMINATION OF SOME CHARACTERISTICS OF THE OBTAINED ENZYME

Lê Văn Việt Mẫn, Đinh Trần Nhật Thu, Lê Thụy Minh Hải
Department of Food Technology, Faculty of Chemical Engineering,
University of Technology-VNU-HCMC

ABSTRACT: Enzyme precipitation is a popular method for enzyme purification in industrial scale. This method is simple and inexpensive. In this paper, protease was purified from the extract of *Aspergillus oryzae* surface culture. It can be concluded that ethanol was a suitable precipitating agent. With the optimal ratio of ethanol and enzyme extract – 65/35(v/v), the enzyme recovery yield was 65% and the purity degree was 3,03. The pH_{opt} and T_{opt} of the purified enzyme were 7,0 and 50-55°C respectively. In addition, the obtained protease was fairly salt-tolerant. In the sample with NaCl 50g/L and 100g/L, the enzyme activity remained 70% and 50% respectively in comparison with the control sample.

TÀI LIỆU THAM KHẢO.

- [1]. Đinh Trần Nhật Thu, Lê Văn Việt Mẫn, Trương Thị Bạch Yến, Lê Minh Dũng. Study of surface culture for protease biosynthesis from *Aspergillus oryzae*. *Proceedings of the 8th ASEAN Food Conference*, Agriculture Publishing House, Hanoi, 2003, pp 139-146
- [2]. Flickinger M.C., Drew S.W. *Encyclopedia of bioprocess technology, fermentation, biocatalysis and bioseparation*, John Willey and Sons Inc., Maryland, 1999
- [3]. Fogarty W.M. *Microbial enzymes and biotechnology*, Applied Science Publishers, London, 1983, 317p
- [4]. Rehm H.J., Reed G, Puhler A., Stodler P. *Biotechnology*, Volume 9, VCH Publishers, Weinheim, 1995
- [5]. Samarntarn W., Cheevadhanarak S., Tanticharoen M. Production of protease by a genetically engineered *Aspergillus oryzae* U1521, *Journal of Genetic Applied Microbiology*, 45(3), 1999, pp 99-103
- [6]. Gratreva I.M. Công nghệ enzyme, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Mạc tư khoa, 1987 (tiếng Nga)
- [7]. Gratreva I.M. và cộng sự. *Thực hành Công nghệ sản xuất chế phẩm enzyme*, Nhà xuất bản Công nghiệp nhẹ và công nghiệp thực phẩm, Mạc tư khoa, 1982 (tiếng Nga)