

THU NHẬN ENZYME PECTINASE TỪ *ASP.NIGER* - TÍNH SẠCH BẰNG PHƯƠNG PHÁP LỌC GEL & LỌC MÀNG

Huỳnh Ngọc Oanh, Trần Ngọc Hùng
Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG -HCM

1. GIỚI THIỆU

Enzyme pectinase là enzyme xúc tác sự thủy phân pectin (polysaccharide dị thể). Pectinase được sản xuất chủ yếu bởi nấm mốc *Aspergillus* sp., *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma* sp., *Neurospora crassa*...

Enzyme pectinase thường được dùng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm đặc biệt trong công nghệ sản xuất các loại nước quả và rượu vang. Người ta sử dụng enzyme pectinase để khử pectin, tránh hiện tượng bị đục và lắng cặn trong quá trình sản xuất và bảo quản [3,5].

Trong bài báo cáo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu điều kiện thích hợp để thu nhận và tinh sạch enzyme pectinase bằng lọc gel và lọc màng.

2. NGUYÊN LIỆU & PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu thu nhận enzyme pectinase

Nấm mốc *Aspergillus niger* được giữ giống trên môi trường Czapek. Bột cà rốt: cà rốt xay nhuyễn, sấy ở nhiệt độ 60°C cho đến khi độ ẩm cà rốt đạt 4% (nguồn pectin – chất cảm ứng)

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%. Khử trùng 121°C trong 30 phút.

2.2. Phương pháp nuôi cấy thu nhận enzyme pectinase từ phương pháp nuôi cấy bề mặt [2]

2.3. Xác định hoạt độ enzyme pectinase [4]

Enzyme pectinase thô được xác định hoạt độ bằng phương pháp đo độ nhớt với nhớt kế Borosil: hút 2ml dung dịch enzyme thô 5% (w/v) phản ứng với 18ml dung dịch pectin 1% ở pH 4,5 và nhiệt độ 40°C. Một đơn vị hoạt độ pectinase (UI) là lượng enzyme cần thiết làm giảm 10% độ nhớt của hỗn hợp chứa 180mg pectin dưới những điều kiện như trên.

2.4. Hàm lượng protein của chế phẩm enzyme được xác định bằng phương pháp Lowry [1]

2.5. Phân tích chế phẩm enzyme bằng phương pháp lọc gel Bio Gel P 30

Hòa tan chế phẩm enzyme thô trong đệm Mc Ilvaine pH 4,5 ly tâm bỏ cặn thu được dung dịch enzyme sau đó hút 0,5ml cho chạy qua cột Bio Gel P 30 (0,8 x 30cm) (hãng Biorad – Mỹ) được cân bằng với đệm Mc Ilvaine pH 4,5. Tốc độ chảy qua cột lần lượt là 30ml/giờ và 15ml/giờ. Mỗi phân đoạn thu 2ml và 1,5ml. Đo độ hấp thụ A của từng phân đoạn ở bước sóng 280nm. Vẽ đồ thị ghi nhận các peak tạo thành và xác định hiệu suất thu hồi enzyme và hoạt độ tính tương ứng.

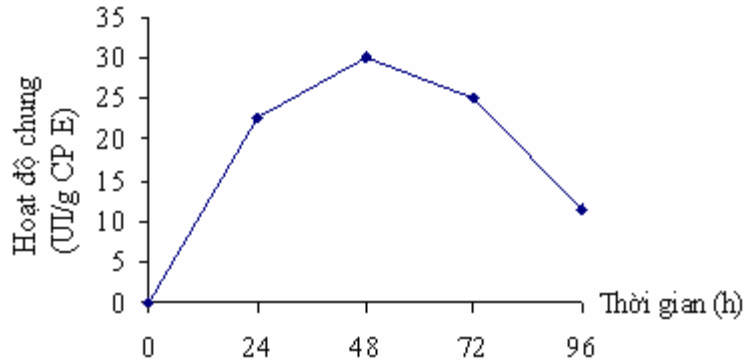
2.6. Tinh sạch enzyme pectinase bằng phương pháp lọc màng (cross flow membrane)

Tiến hành rửa enzyme từ 500ml dịch chiết thu được bởi ethanol 96o, nhiệt độ rửa 4oC, thời gian rửa là 1 giờ. Sau đó, ly tâm 5000 vòng/phút trong 15 phút thu enzyme thô. Hòa tan enzyme thô này trong 500ml dung dịch đệm Mc Ilvaine pH 4,5. Tiến hành lọc 500ml dung dịch enzyme vừa hòa tan trên bằng hệ thống lọc QuixStand Benchtop Systems (hãng Amersham Biosciences) với bộ lọc màng (membrane) có khoảng phân đoạn 50kDa. Tốc độ bơm mẫu đầu vào lần lượt là

150rpm & 200rpm và điều chỉnh sao cho áp suất trên bề mặt màng không quá 5 Psi. Thu dịch qua lọc và xác định hiệu suất thu hồi enzyme và hoạt độ tương ứng.

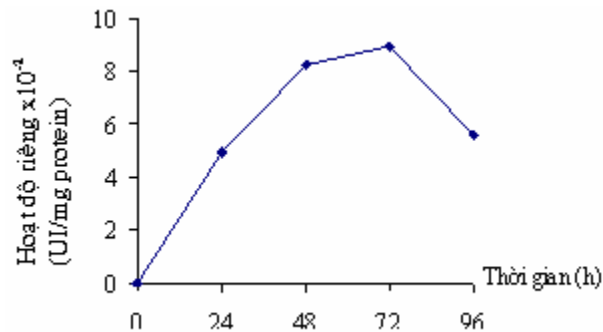
3. KẾT QUẢ & BÀN LUẬN

3.1. Hoạt độ chung và hoạt độ riêng của chế phẩm pectinase thô (CP E)



Hình 1. Đồ thị tương quan giữa thời gian nuôi cấy và hoạt độ của enzyme thô

Quá trình sinh tổng hợp pectinase trên môi trường có chất cảm ứng là pectin của bột cà rốt bởi chủng *Aspergillus niger* có hoạt độ cao nhất sau 48 giờ (30,01UI/g CP E).



Hình 2. Đồ thị tương quan giữa thời gian nuôi cấy và hoạt độ riêng của chế phẩm enzyme thô

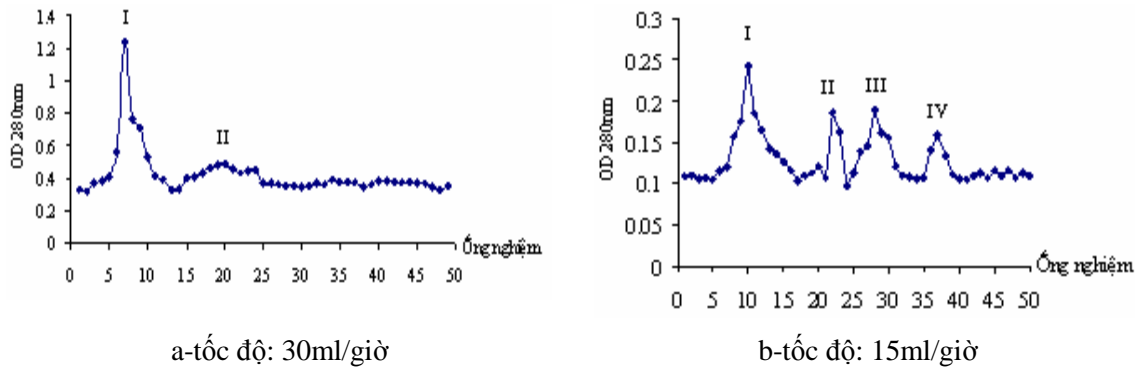
Quá trình sinh tổng hợp pectinase trên môi trường có chất cảm ứng của chủng *Aspergillus niger* có hoạt độ riêng cao nhất sau 72 giờ đạt $8,97.10^{-2}$ (UI/mg protein).

Dựa vào 2 đồ thị ta thấy, hoạt độ chung giữa thời gian nuôi cấy 48 giờ và 72 giờ chênh lệch nhau khá nhiều (30,01 & 25,02UI/g CP E). Trong khi đó, hoạt độ riêng giữa thời gian nuôi cấy 48 giờ và 72 giờ chênh lệch nhau không nhiều ($8,26.10^{-2}$ & $8,97.10^{-2}$ UI/mg protein). Do đó, chúng tôi quyết định thu nhận enzyme pectinase sau 48 giờ nuôi cấy và sau đó đem tiến hành tinh sạch.

3.2. Phân tích chế phẩm enzyme pectinase bằng phương pháp lọc gel Bio Gel P 30

Dung dịch enzyme xử lý theo mục 2.5, kết quả sau khi lọc gel với tốc độ chảy qua cột 30ml/giờ thu được 2 peak chính (hình 3a). Trong đó, hoạt độ pectinase tập trung chủ yếu ở peak I, peak II không có hoạt độ. Hiệu suất thu hồi enzyme đạt 71,96% và hoạt độ cao hơn 1,1 lần so với trước khi lọc gel.

Khi giảm tốc độ chảy qua cột xuống 15ml/giờ kết quả thu được 4 peak (hình 3b). Hoạt độ pectinase tập trung hầu hết ở peak I. Hiệu suất thu nhận hồi enzyme sau khi giảm tốc độ lọc đạt 59,02% và hoạt độ cao hơn trước khi lọc gel 1,65 lần.



Hình 3. Đồ thị tương quan giữa giá trị OD 280nm với các phân đoạn của dung dịch enzyme sau khi lọc gel

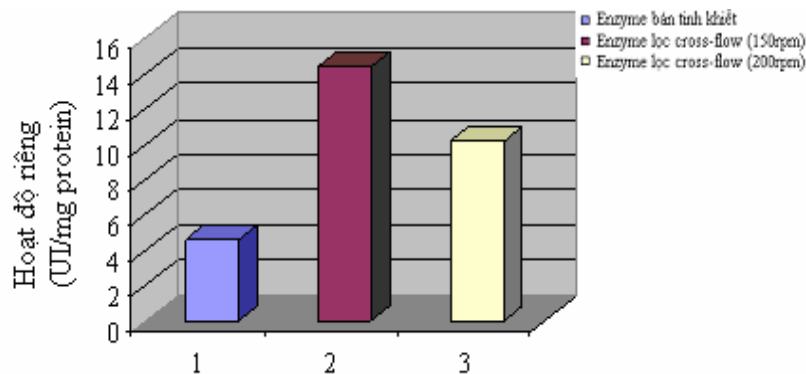
Khi giảm tốc độ chảy xuống 15ml/h thì các phân tử protein nằm trong hạt gel bị rửa giải chậm hơn. Khi đó, các phân tử khác không nằm trong hạt gel sẽ bị rửa giải ra khỏi cột nhanh hơn và dẫn đến hàm lượng protein có hoạt độ pectinase tăng. Hiệu suất thu hồi enzyme khi lọc với tốc độ 15ml/giờ thấp hơn hiệu suất thu hồi enzyme qua lọc với tốc độ 30ml/giờ do khả năng tách protein tạp khi lọc với tốc độ thấp thì tốt hơn.

3.3. Tinh sạch chế phẩm enzyme pectinase bằng phương pháp lọc màng

Chúng tôi sử dụng bộ lọc membrane có kích thước phân đoạn rộng 50kDa cho kết quả như sau:

Sau khi lọc dung dịch enzyme như mục 2.6, kết quả thu được khi lọc với tốc độ bơm 150rpm thu dịch qua lọc. Kết quả thu được hiệu suất thu hồi enzyme và hoạt độ đạt 27,87% và 87,98%, độ tinh sạch tăng 3,1 lần. Khi tăng tốc độ bơm lên 200rpm thì hiệu suất thu hồi enzyme và hiệu suất hoạt độ đạt 33,33% và 73,65%, độ tinh sạch chỉ tăng 2,2 lần.

Nguyên nhân là khi tăng tốc độ bơm 200 rpm thì áp suất đầu vào tăng (5,2Psi) làm cho dòng chảy trong bộ lọc chuyển động rối, các phân tử sẽ va đập mạnh vào nhau và đẩy chúng vào thành bộ lọc kết quả hình thành một màng mỏng xung quanh thành bộ lọc (hay còn gọi là lớp trở lực). Mặt khác dưới tác dụng của lực ly tâm trong dòng chảy sẽ đẩy một số phân tử trong màng mỏng theo dịch qua lọc ra phía ngoài. Vì thế, chúng tôi nhận thấy với tốc độ bơm đầu vào 150rpm sẽ thực hiện quá trình tinh sạch tốt hơn.



Hình 4. So sánh hoạt độ riêng của dung dịch enzyme trước và sau khi lọc màng

4. KẾT LUẬN

Chế phẩm enzyme pectinase được sản xuất từ chủng nấm mốc *Aspergillus niger* trên môi trường có chứa chất cảm ứng là pectin-bột cà rốt bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt sau 48 giờ đạt hoạt độ chung cao nhất 30,01(UI/g).

Phân tích chế phẩm enzyme bằng phương pháp lọc gel sử dụng cột Bio Gel P 30 (0,8 x 30cm) thu được một phân đoạn có hoạt độ enzyme pectinase và với tốc độ chảy qua cột 15ml/giờ tách tạp chất tốt hơn ở 30 ml/giờ.

Phương pháp lọc màng với tốc độ bơm 150rpm có thể ứng dụng tinh sạch enzyme pectinase thu nhận từ *Asp. niger* nói riêng và enzyme nói chung với kỹ thuật đơn giản và hiệu quả.

Để phân tách và tinh sạch có hiệu suất cao hơn nên chọn cột lọc gel và kích thước màng lọc phù hợp với từng loại enzyme.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Lâm Thị Kim Châu, Văn Đức Chín, Ngô Đại Nghiệp. *Thực tập lớn Sinh hóa*, Nhà Xuất Bản Đại học Quốc gia Tp. HCM.(2004).
- [2]. Hồ Xuân Hương. *Thu nhận và sử dụng enzyme pectinase trong sản xuất nước dứa*, Luận án cao học Đại học Bách khoa Tp. HCM.(2002).
- [3]. Nguyễn Quang Tâm, Lê Thị Hồng Nga, Đồng Thị Thanh Thu, Nguyễn Thị Tuyết Thanh. *Tinh sạch và cố định enzyme pectinase thu nhận từ một số chủng nấm mốc*. Báo cáo Hội nghị khoa học Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên, p.187-193.(2002).
- [4]. Favela-Torres, E.; Volke-Sepúlveda, T.; Viniegra-González, G. *Production of hydrolytic depolymerase pectinase*, Food Technol. Biotechnol, 44:221-227. (2006).
- [5]. Patil, S.R.; Dayanand, A. *Exploration of regional agrowaste for the production of pectinase by Aspergillus niger*, Food Technol. Biotechnol, 44:289-292, (2006).