

TÍNH CHẤT VÀ KHẢ NĂNG THỦY PHÂN TINH BỘT SẴN CỦA MỘT SỐ AMYLAZA VI SINH VẬT

HOÀNG KIM ANH, NGÔ KẾ SƯƠNG

Viện Sinh học nhiệt đới

NGUYỄN XÍCH LIÊN

Trường đại học Bách khoa Tp. Hồ Chí Minh

Amylaza là một trong những enzym quan trọng nhất trong ngành công nghệ sinh học hiện nay. Các enzym sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, bột giặt, dệt, giấy như amylaza, proteaza, lipaza, xenlulaza chiếm 70% tổng khối lượng enzym sử dụng [3]. Ngoài ra, việc ứng dụng của amylaza đang mở rộng ra nhiều lĩnh vực khác như trong kỹ thuật phân tích, y tế, lâm sàng học, ... Phần lớn α -amylaza vi khuẩn có nguồn gốc từ *Bacillus*, còn chủng sử dụng trong sản xuất glucoamylaza (GA) là các loại nấm sợi *Aspergillus* [2, 8].

Sau đây là kết quả nghiên cứu về các tính chất như khối lượng phân tử, nhiệt độ, pH tối ưu, ảnh hưởng của Ca^{2+} , sản phẩm chính của quá trình thủy phân, khả năng thủy phân các dạng nguyên liệu như amyloza, amylopectin, tinh bột sắn đã hồ hóa cũng như tinh bột sắn dạng hạt sống của một số amylaza quan trọng từ các chủng công nghiệp của Viện Sinh học nhiệt đới như vi khuẩn *Bacillus subtilis*, nấm mốc *Aspergillus oryzae* và *A. kawasaki*.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Tinh bột sắn của hãng Vedan được sử dụng làm nguyên liệu nghiên cứu.

α -amylaza từ *B. subtilis* của Viện Sinh học nhiệt đới [11], tinh sạch từ enzym thô bằng cách tủa bằng polyetylglycol hoặc cồn etylic.

Amylaza từ môi trường bề mặt gạo lức của nấm mốc *A. oryzae* và *A. kawasaki* (chủng thương mại của Nhật Bản). Quá trình thu amylaza được thực hiện theo các bước sau: trích

ly enzym bằng dung dịch đệm, tủa enzym bằng cồn etylic 96° và sau đó tinh sạch tiếp bằng sắc ký lọc gel sephadex. Enzym sạch được sấy đông khô.

Các chế phẩm glucoamylaza GMA 200L và termamyl 120L (Novo, Đan Mạch).

2. Phương pháp

Hoạt tính enzym: hoạt tính α -amylaza được xác định theo phương pháp Smith và Rose [10]. Hoạt tính GA được tính dựa trên lượng glucoza tạo ra khi thủy phân tinh bột bằng enzym. Hàm lượng glucoza được xác định bằng cách đo mật độ quang của dung dịch khi có mặt thuốc thử dinitro axit salicilic tại bước sóng 520 nm [7].

Hàm lượng protein tan được tính theo phương pháp Bradford [4].

Tính chất hóa lý của enzym: pH opt. được xác định bằng cách đo hoạt tính của α -amylaza trong đệm photphat 0,1 M và GA trong đệm axetat 0,15M tại các giá trị pH từ 3,0 đến 9,0. Nhiệt độ tối ưu được xác định bằng cách đo hoạt tính enzym ở những nhiệt độ khác nhau tại pH 6,5 đối với α -amylaza và pH = 4,5 đối với GA.

Ảnh hưởng của Ca^{2+} : hoạt tính amylaza được xác định tại pH và nhiệt độ thích hợp khi có và không có Ca^{2+} với nồng độ 100-300 mg/l.

Độ tinh sạch và phân tử lượng của enzym được nghiên cứu bằng điện di trên gel SDS polyacrylamit theo phương pháp của Laemmli [4].

Xác định các sản phẩm sau thủy phân: thành phần các oligosaccharit được định tính bằng phân tích khối phổ. Dung dịch tinh bột sau khi thủy phân được pha loãng tới nồng độ và

µg/ml, sau đó được phân tích trên máy MS 1100 của hãng AGILENT, Mỹ. Các phân tích khối phổ được thực hiện tại phòng thí nghiệm thuộc Viện Công nghệ hóa học.

Nghiên cứu khả năng thủy phân một số dạng cơ chất: tinh bột sắn đã hồ hóa, tinh bột sắn dạng hạt sống, amyloza và amylopectin tách từ tinh bột sắn theo phương pháp của Balagopalan [1], được chuẩn bị với nồng độ 1%, thêm enzym với hàm lượng 15 đv/1g cơ chất (α -amylaza), 20 đv/1g cơ chất (GA) và sau đó thủy phân ở các điều kiện thích hợp.

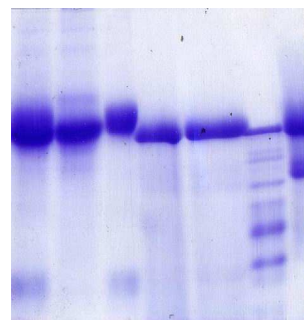
II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Một số tính chất cơ bản của amylaza

Một số tính chất cơ bản của amylaza gồm hoạt tính đặc hiệu, t^0 , pH tối ưu, ảnh hưởng của ion Ca^{2+} lên hoạt tính enzym được nghiên cứu. Kết quả được ghi ở bảng 1. Các amylaza từ vi khuẩn hoạt động trong vùng pH trung tính trong khi amylaza từ nấm mốc có hoạt tính cao tại vùng pH axit. Amylaza vi khuẩn có khả năng chịu nhiệt cao, termamyl 120L có thể chịu được nhiệt độ tới 100°C. Theo Marchal (1999)[6], tăng hàm lượng Ca^{2+} làm dịch chuyển nhiệt độ hoạt động tối ưu của enzym về vùng thấp hơn. Khả năng bền nhiệt của α -amylaza từ *B. subtilis* yếu hơn so với termamyl, hoạt tính enzym ít phụ thuộc Ca^{2+} . Các amylaza từ nấm mốc hoạt động tốt trong khoảng 50°-55°C, riêng GA từ *A. niger* của hãng Novo có nhiệt độ tối ưu 60°-65°C. α -amylaza từ *A. oryzae* có khả năng hoạt động tốt hơn khi có mặt Ca^{2+} , đối với GA ảnh hưởng của Ca^{2+} không rõ rệt. Các amylaza từ vi khuẩn *B. subtilis* và từ nấm mốc *A. oryzae*, *A. kawasaki* (Viện SHNĐ) đều có hoạt tính đặc hiệu cao hơn so với enzym đối chứng termamyl 120L và GA của hãng Novo.

Sắc ký khối phổ MS có thể được sử dụng để xác định chính xác phân tử lượng của enzym. Trong điều kiện nghiên cứu ở nước ta, trên cơ sở so sánh với các tài liệu và công bố về tính chất của các amylaza [8], số isoform và phân tử lượng của các enzym được nghiên cứu bằng điện di. Các enzym sau khi tinh sạch được cho chạy trên SDS polyacrylamit gel. Thang chuẩn được sử dụng gồm bovin serum albumin (66 kDa), ovalbumin từ lòng trắng trứng (45 kDa),

trypsinogen (24 kDa). Kết quả cho thấy α -amylaza từ *B. subtilis* (enzym của Viện SHNĐ) và α -amylaza từ *B. licheniformis* (termamyl 120L) có 1 isoform, khối lượng phân tử tương đương nhau và nằm trong khoảng 57-58 kDa. *A. oryzae* có thể tạo ra nhiều amylaza trong những điều kiện cảm ứng khác nhau [8, 9]. Khi được nuôi trên môi trường gạo lức ở điều kiện tối ưu [12], enzym tạo ra là α -amylaza taka-amylaza có 1 isoform với phân tử lượng 52-53 kDa [9]. GA của hãng Novo (từ *A. niger*) có 2 isoform với khối lượng tương ứng 74 và 96 kDa. *A. awamori* var. *kawachi*, tên thương mại là *A. kawasaki* là enzym được sử dụng để sản xuất rượu sakê. Enzym này có 3 isoform với phân tử lượng từ 57-90 kDa.



1 2 3 4 5

Hình 1. Kết quả điện di một số amylaza vi khuẩn

- 1: Bovin albumin (66 kDa)
- 2, 3: α -amylaza từ *B. subtilis* tủa bằng cồn và bằng PEG.
- 4: α -amylaza A của hãng “Amano” Conc., Nhật Bản.
- 5: Termamyl 120L.

2. Sản phẩm chính của quá trình thủy phân

Trong nghiên cứu cơ bản và trong sản xuất công nghiệp các sản phẩm thủy phân từ tinh bột, thành phần và nồng độ sản phẩm tạo ra bởi tác động của amylaza là hết sức quan trọng. Các đường đơn, đường oligo, dextrin được xác định bằng sắc ký lỏng cao áp, sắc ký lọc gel và phân tích khối phổ MS [8]. Phân tích MS dựa trên khối lượng của các đường oligosaccharit, dextrin, có thể định tính các sản phẩm chính tạo ra. Sử dụng kết hợp MS và sắc ký lỏng cao áp, có thể định lượng chính xác nồng độ các chất này. Sản phẩm chính tạo ra trong quá trình thủy phân tinh bột sắn bằng amylaza từ nấm mốc và

vi khuẩn được khảo sát trên thiết bị MS 1100 AGILENT của Mỹ.

Bảng 1

Một số tính chất của các amylaza

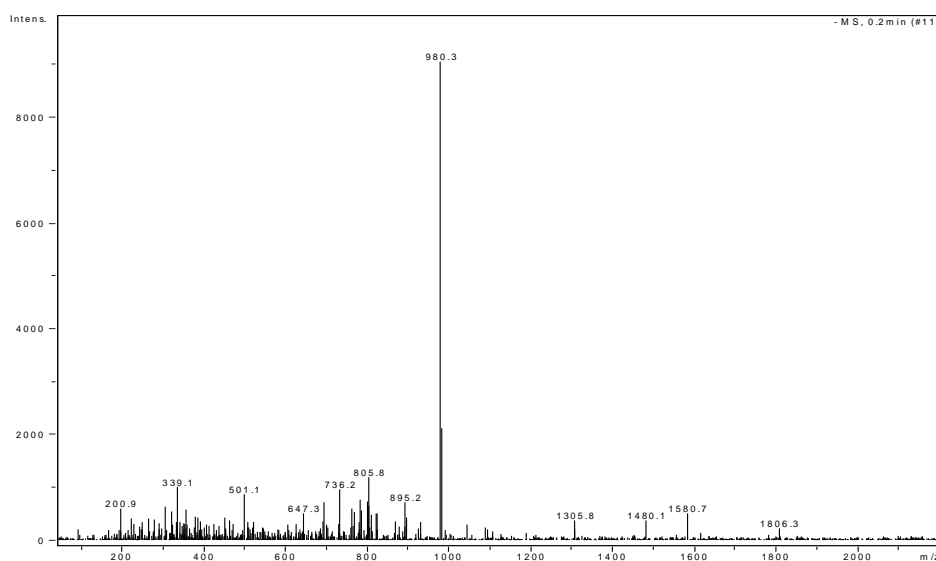
Nguồn enzym	Isoform	Phân tử lượng (kDa)	pH tối ưu	Nhiệt độ tối ưu (°C)	Phụ thuộc Ca ²⁺	Hoạt tính (đv/ml)	Hoạt tính đặc hiệu (đv/mgP)
Termamyl (<i>B.licheniformis</i>)	1	57-58	6,5-7,0	95	++	3177,9	276,34
α -amylaza từ <i>B. subtilis</i>	1	57-58	6,8-7,0	80	-	1427,5	1331,6
α -amylaza từ <i>A. oryzae</i>	1	52-53	4-5	50	+	512,0	800,0
GA Novo từ <i>A. niger</i>	2	74-96	4,2-4,5	60-65	-	2400,0	412,4
GA từ <i>A. kawasaki</i>	3	57-90	3,8-4,5	55	-	130,0	1041,6

Bảng 2

Sản phẩm chính khi thủy phân tinh bột sắn bằng các loại amylaza khác nhau

Nguồn enzym	Sản phẩm thủy phân chính
Termamyl (<i>B. licheniformis</i>)	DP5, glucoza, DP9
α -amylaza (<i>B. subtilis</i>)	DP6, một lượng ít maltoza, DP3, DP9
α -amylaza từ <i>A. oryzae</i>	Maltoza, DP6
GA Novo từ <i>A. niger</i>	Glucoza
GA từ <i>A. kawasaki</i>	Glucoza

DP3: maltotrioza, DP5: maltopentaoza, DP6: maltohexaoza, DP9: dextrin chứa 9 gốc đường glucoza.



Sắc ký đồ. Kết quả phân tích khối phổ của sản phẩm sau khi thủy phân tinh bột sắn bằng α -amylaza từ *B. subtilis*

Kết quả, khi thủy phân bằng amylaza từ *A. kawasaki* và glucoamylaza của hãng Novo, glucoza là sản phẩm chính của quá trình thủy phân. Maltoza và một số dextrin là sản phẩm tạo ra khi thủy phân bằng amylaza của *A. oryzae*. Sản phẩm chính khi thủy phân bằng termamyl 120L là maltopentaosa DP5, DP1, DP3 và một số dextrin như DP9. α -amylaza của *B. subtilis* thủy phân tinh bột cho sản phẩm chính là maltohexaoza DP6, một lượng không đáng kể các đường maltoza DP2, maltotriosa DP3 và DP9 (hình 1). Tính chất này giúp tạo ra các sản phẩm ít ngọt, sản phẩm có DE nhỏ nhưng lượng dextrin mạch lớn thấp, dẫn đến độ nhớt thấp, dễ lọc, dung dịch trong. Enzym này có thể được sử dụng trong sản xuất maltodextrin DE

thấp.

Sử dụng các amylaza có khả năng tạo một số oligosaccharit nhất định, có thể giúp tăng chất lượng các sản phẩm maltodextrin DE thấp hay tạo ra các oligosaccharit dùng trong thực phẩm, y học hay công nghiệp dược.

3. Khả năng thủy phân các dạng cơ chất khác nhau

Khả năng thủy phân tinh bột của amylaza phụ thuộc rất nhiều vào chiều dài và độ phân nhánh của phân tử cơ chất, thành phần amyloza, amylopectin, tính chất cũng như cấu trúc của hạt tinh bột [5]. Kết quả quá trình thủy phân các dạng cơ chất khác nhau sau 3 giờ ở các điều kiện tối ưu thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3

Kết quả thủy phân các dạng tinh bột sản bằng amylaza

Cơ chất	Lượng đường khử tạo ra (% so với lượng cơ chất ban đầu)				
	Termamyl 120L	α -amylaza (<i>B. subtilis</i>)	α -amylaza (<i>A. oryzae</i>)	GA Novo	GA từ <i>A. kawasaki</i>
Tinh bột sản đã hồ hóa	2,66	1,90	44,60	30,50	21,90
Hạt tinh bột sản sống	0,31	0,57	3,88	0,23	3,21
Amyloza	0,49	0,31	44,40	25,00	10,90
Amylopectin	5,31	4,85	44,00	21,70	11,70

Đã có nhiều công bố đề cập tới khả năng thủy phân kém các liên kết nhánh trong phân tử tinh bột của GA, cũng như việc sử dụng kết hợp GA và các enzym như pullulanaza hay isoamylaza để tăng hiệu suất của quá trình [8]. Trong thí nghiệm này, GA từ *A. niger* (hãng Novo) có khả năng thủy phân amyloza mạnh hơn một chút so với amylopectin, còn GA từ *A. kawasaki* thủy phân 2 cơ chất trên với tốc độ ban đầu gần như nhau. Lượng đường khử thu được khi thủy phân tinh bột sản cao nhất so với các cơ chất khác. Đường như việc tách riêng hai thành phần amyloza và amylopectin ảnh hưởng không tốt lên khả năng thủy phân của GA. So với tinh bột sản đã hồ hóa, khả năng thủy phân tinh bột sản dạng hạt sống của enzym từ *A. kawasaki* thấp hơn 7 lần còn glucoamylaza từ *A. niger* gần như không có khả năng thủy phân dạng cơ chất này.

Do cơ chế tác động khác nhau mà các α -amylaza bị chi phối nhiều hơn bởi thành phần và

tính chất của phân tử cơ chất. Kết quả cho thấy, đối với α -amylase, khả năng thủy phân amylopectin là cao nhất và khả năng thủy phân hạt tinh bột sống là thấp nhất. So với amyloza, α -amylaza vi khuẩn tấn công amylopectin với tốc độ nhanh gấp 10 lần (termamyl 120L) và 15 lần (enzym của Viện SHND). Tốc độ thủy phân amyloza rất thấp, tương đương với tốc độ thủy phân tinh bột sống dạng hạt. Khả năng thủy phân tinh bột phụ thuộc vào tỷ lệ amyloza, amylopectin trong thành phần. Do hàm lượng amylopectin cao (85%) nên tinh bột sản là một trong những loại tinh bột dễ bị amylaza tấn công, hàm lượng đường khử tạo ra bằng một $\frac{1}{2}$ lượng đường khử thu được khi cơ chất chỉ chứa amylopectin. Có thể thấy cơ chất mạch thẳng có ái lực kém đối với α -amylaza vi khuẩn. Tuy nhiên đối với α -amylaza từ nấm mốc *A. oryzae*, độ phân nhánh của cơ chất lại không có ảnh hưởng gì. Hàm lượng đường khử tạo ra ở cả 3 trường hợp cơ chất tinh bột sản đã hồ hóa,

amyloza và amylopectin đều như nhau và đạt mức 4,0mg/ml, cao hơn nhiều so với lượng tạo ra bởi α -amylaza vi khuẩn. α -amylaza từ nấm mốc là enzym đường hóa với sản phẩm chính của quá trình thủy phân là maltoza nên lượng đường khử tạo ra không hoàn toàn phản ánh khả năng thủy phân nếu so sánh với các enzym từ vi khuẩn. Kết quả trên cũng cho thấy 2 loại α -amylaza này có cơ chế tấn công phân tử cơ chất khác nhau. Termamyl thủy phân yếu tinh bột sắn dạng hạt sống, khả năng thủy phân dạng cơ chất này cao hơn đối với enzym từ *B. subtilis*.

III. KẾT LUẬN

1. Sản phẩm chính khi thủy phân tinh bột bằng termamyl 120L và α -amylaza của *B. subtilis* tương ứng là maltopentaosa DP5 và maltohexaosa DP6.

2. α -amylaza vi khuẩn thủy phân amylopectin tốt nhất, còn với hạt tinh bột sống thì kém nhất. Tốc độ thủy phân amyloza rất thấp. Đối với α -amylaza từ nấm mốc *A. oryzae*, độ phân nhánh của cơ chất không có ảnh hưởng rõ rệt. Khả năng thủy phân tinh bột phụ thuộc vào tỷ lệ amyloza, amylopectin trong thành phần.

3. Glucoamylaza thủy phân kém liên kết nhánh, khả năng thủy phân amyloza mạnh hơn một chút so với amylopectin. Enzym từ *A. kawasaki* thủy phân tương đối tốt tinh bột sắn dạng hạt sống còn glucoamylaza của hãng Novo không tác động lên dạng cơ chất này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Balagopalan C. and Padmaja G., 1988:

Cassava in Food, Feed and Industry, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.

2. Cowan D. 1996: Trend in Biotechnology, 14: 177-178.
3. Crabb W. D. and Colin M., 1997: Trend in Biotechnology, 15: 349-352.
4. Eisenthal R. and Danson M. J., 1992: Enzyme Assay - A practical approach, Oxford University Press, United States.
5. Kossmann J. and Lloyd J., 2000: Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 35 (3): 141-196.
6. Marchal L. M. et al., 1999: Biotechnology and bioengineering, 62 (3): 348-357.
7. Miller G. L., 1959: Anal. Chem., 31: 426-429.
8. Pandey A. et al., 2000: Biotechnol. Appl. Biochem., 31: 135-152.
9. Sanoja R. R. et al., 2000: Applied and Environmental Microbiology, 66 (8): 3350-3356.
10. Smith and Rose, 1966: Biol. Chem. 179 (2): 53-58.
11. Lê Thị Bích Phượng, Võ Thị Hạnh, 1998: Tuyển tập các công trình nghiên cứu khoa học Viện SHND 1993-1998: 13-17, NXB Nông nghiệp.
12. Hoàng Kim Anh, 1999: Nghiên cứu tách chiết, tinh sạch enzym α -amylaza và glucoamylaza từ sinh khối vi sinh vật, Báo cáo nghiệm thu đề tài cấp cơ sở Viện SHND.

PROPERTIES AND HYDROLYSIS ACTION ON CASSAVA STARCH OF SOME MICROBIAL AMYLASES

HOANG KIM ANH, NGO KE SUONG, NGUYEN XICH LIEN

SUMMARY

Amylase is one of the most important industrial enzymes in Biotechnology. This study deals with the investigation of some main properties of amylases from *Bacillus* and *Aspergillus* (Institute of Tropical biology), such as the MW, the temperature, the pH opt, the Ca²⁺ effect, the hydrolysis action towards different substrates, as well as the profile of starch hydrolyzed products.

Ngày nhận bài: 5-9-2001