

THỦY PHÂN SACCHAROSE BẰNG INVERTASE CỐ ĐỊNH TRÊN HẠT CALCIUM ALGINATE

Mai Ngọc Dũng

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

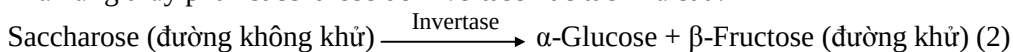
1. GIỚI THIỆU

Calcium alginate được hình thành từ phản ứng giữa sodium alginate với Ca^{2+} theo phản ứng trao đổi ion và tạo thành một dạng biocomposite không tan trong nước và dễ dàng tạo hạt hoặc màng. Phản ứng xảy ra như sau : $2\text{Na}(\text{alginate}) + \text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{Ca}(\text{Alginate})_2 + 2\text{Na}^+$ (1)

Ngoài Ca^{2+} có khả năng phản ứng với sodium alginate thì các ion như Ba^{2+} và Sr^{2+} tạo thành biocomposite có tính chất tương tự như calcium alginate. Riêng Mg^{2+} cũng có khả năng phản ứng với sodium alginate nhưng sản phẩm tạo thành $\text{Mg}(\text{Alginate})_2$ lại tan trong nước. Calcium alginate gồm một hệ thống matrix và chính hệ thống này là yếu tố cơ bản để bẫy các hợp chất sinh học và tế bào. [1] [3]

Invertase là một loại enzym thủy phân saccharose được sử dụng khá phổ biến trong công nghiệp nước giải khát và bánh ngọt. Invertase có trong động thực vật, vi sinh vật và đặc biệt là nấm men có khả năng tổng hợp invertase cao. *Saccharomyces* hiện là vi sinh vật được quan tâm nhiều nhất trong lĩnh vực lên men tạo invertase, invertase của *Saccharomyces* gồm hai loại như sau : invertase nội bào có trọng lượng phân tử vào khoảng 135000Da và invertase ngoại bào có trọng lượng phân tử vào khoảng 270000Da. [7]

Phản ứng thủy phân saccharose do invertase xúc tác như sau:



Cố định enzym và tế bào bao gồm 4 phương pháp cơ bản như sau [4]:

- Phương pháp hấp phụ.
- Phương pháp cộng hóa trị.
- Phương pháp liên kết chéo (khâu mạch).
- Phương pháp bẫy (nhốt).

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

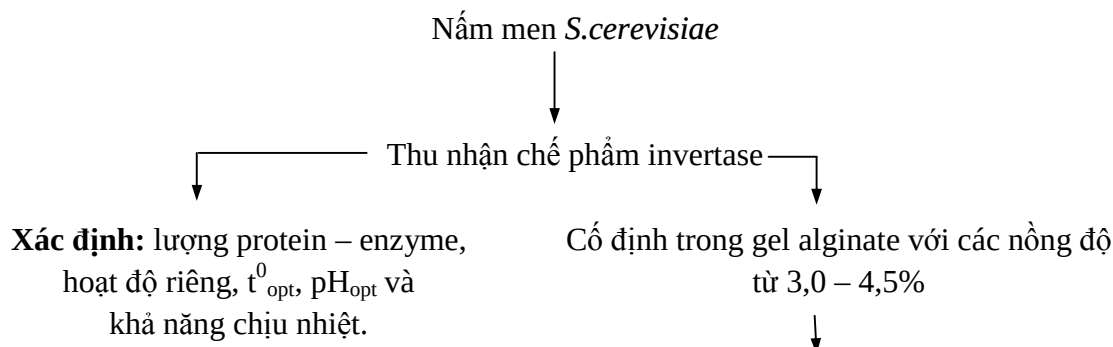
2.1. Nguyên vật liệu

Thu nhận invertase từ nguồn nấm men *S. cerevisiae* của Công ty Cát Tường, sodium alginate của hãng Hải Châu Trung Quốc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các thí nghiệm được thực hiện theo sơ đồ 2.1

Sơ đồ 2.1. Các bước thực hiện thí nghiệm



Xác định: nồng độ alginate tối ưu
để cố định invertase, lượng protein – enzyme cố định,
hoạt độ riêng và khả năng chịu nhiệt của invertase cố định.

↓
Nghiên cứu khả năng tái sử dụng và thủy phân
saccharose ở nồng độ tối ưu.

2.3. Phương pháp thu nhận chế phẩm invertase [3]

- Dịch chiết invertase thu nhận từ nấm men *S.cerevisiae* bằng phương pháp nghiền.
- Kết tủa enzym bằng ethanol 96% lạnh với tỷ lệ dung dịch enzym/ethanol là 1/3.
- Ly tâm, thu nhận kết tủa enzym, pha với thể tích nước (V) nhất định và ta có dung dịch invertase (CPIInver).

2.4. Định lượng protein-enzym CPIInver theo phương pháp Lowry [8]

Xác định nồng độ protein-enzym CPIInver theo công thức sau :

$$C \text{ (mg/ml)} = (\Delta OD/a.1000)n \quad (\text{công thức 1})$$

Với :

- C là nồng độ protein ($\mu\text{g/ml}$ hoặc mg/ml).
- a là hệ số góc đường chuẩn, sử dụng hàm Slope của phần mềm Microsoft Excel để tính hệ số a của đồ thị.
- $\Delta OD = OD_{\text{CPIInver}} - OD_{\text{không}}$ với giá trị OD được đo tại bước sóng 750 nm.
- n là hệ số pha loãng.
- 1000 là hệ số quy đổi từ μg thành mg .

Xây dựng đường chuẩn nồng độ protein – enzym theo phương pháp UV với $\lambda = 280 \text{ nm}$ [8]

- Protein – enzym của CPIInver được pha thành các nồng độ 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 mg/ml .
- Xây dựng đường chuẩn và xác định hệ số góc a của dung dịch CPIInver.

Xác định hoạt độ invertase (HdI) và hoạt độ riêng (HdR) theo phương pháp định lượng đường khử tạo thành với thuốc thử dinitrosalicylic acid (DNS) [6]

Xác định hoạt độ invertase theo công thức sau:

$$\text{HdI (UI/ml)} = \frac{\text{ĐK}}{V.t} \quad (\text{công thức 2})$$

Với:

- ĐK là lượng đường khử tạo thành được đo ở bước sóng 540 nm.
- V là thể tích enzym tham gia phản ứng xúc tác phản ứng.
- t là thời gian xúc tác phản ứng.

$$\text{HdR (UI/mg}_{\text{pr}}) = \frac{\text{HdI (UI/ml)}}{m \text{ (mg}_{\text{pr}}/\text{ml})} \quad (\text{công thức 3})$$

Với: m là nồng độ protein-enzym CPIInver tham gia xúc tác phản ứng.

Xác định pH_{opt} , t^0_{opt} và khả năng chịu nhiệt của CPIInver [2]

- Xác định pH_{opt} với pH nghiên cứu trong khoảng từ 3,5 – 5,5. Nồng độ dung dịch saccharose 5%, thời gian xúc tác phản ứng 5 phút và nhiệt độ là 45 °C.
- t^0_{opt} với t^0 nghiên cứu trong khoảng từ 40 – 60 °C. Nồng độ dung dịch saccharose 5%, thời gian xúc tác phản ứng 5 phút và pH là pH_{opt} của thí nghiệm trên.
- Khả năng chịu nhiệt của CPIInver theo thời gian với pH_{opt} , t^0_{opt} của các thí nghiệm trên. Riêng t^0 sẽ giảm như sau : t^0_{opt} , $t^0_{opt} - 5$, $t^0_{opt} - 10$, ... và thời gian kéo dài từ 1, 2, 3, 4, 5 giờ ...

Cố định invertase trên hạt Ca-alginate [5]

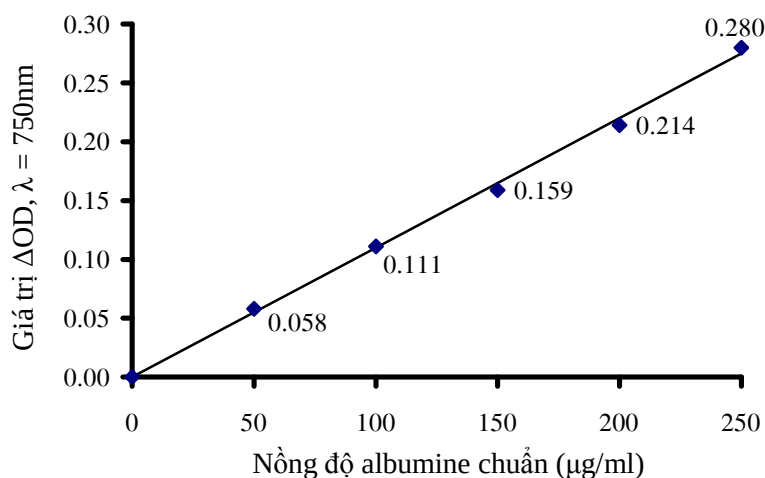
- Cố định CPIInver có nồng độ 2mg/ml trong các nồng độ alginate khác nhau từ 3,5 – 4,5% ‘Hạt-Inver’ (w/w) và xác định HđR từng loại Hạt-Inver khác nhau theo phương pháp mục 2.2.4 nhưng mẫu không là những loại hạt không có protein – enzym tương ứng ở các nồng độ alginate như trên ‘Hạt 0’.
- Xác định hiệu suất cố định protein – enzym của từng loại Hạt-Inver khác nhau.
- Xác định hiệu suất hoạt độ riêng cố định của từng loại Hạt-Inver khác nhau.
- Xác định pH, t^0 và n^0 cơ chất tối ưu của Hạt-Inver.
- Xác định số lần tái sử dụng và khả năng thủy phân saccharose theo thời gian.

3.KẾT QUẢ

3.1.Xác định hàm lượng protein – enzym CPIInver theo phương pháp Lowry

3.1.1.Xây dựng đường chuẩn albumin

Đường chuẩn nồng độ albumin được thể hiện ở đồ thị 3.1



Đồ thị 3.1. Đường chuẩn nồng độ albumin (μg/ml)

Sử dụng hàm Slope xác định hệ số góc a của đường chuẩn nồng độ albumin là 0,0011. CPIInver được pha loãng 100, xác định giá trị OD_T với $\lambda = 750 \text{ nm}$ và dựa vào công thức 1 mục 2.2.2 xác định được nồng độ protein – enzyme CPIInver được thể hiện ở bảng 3.1.

Bảng 3.1.Nồng độ protein – enzyme của CPIInver

Giá trị	Mẫu số			Giá trị OD Trung bình	ΔOD	Nồng độ protein – enzyme ($\mu\text{g/ml}$)
	1	2	3			
OD ₀	0,058	0,058	0,058	0,058	0,116	105,46
OD _T	0,174	0,179	0,169	0,174		

Vậy n⁰ protein – enzyme của CPIInver : $105,46 \times 100 = 10546 \mu\text{g/ml}$ hoặc $10,546\text{mg/ml}$.

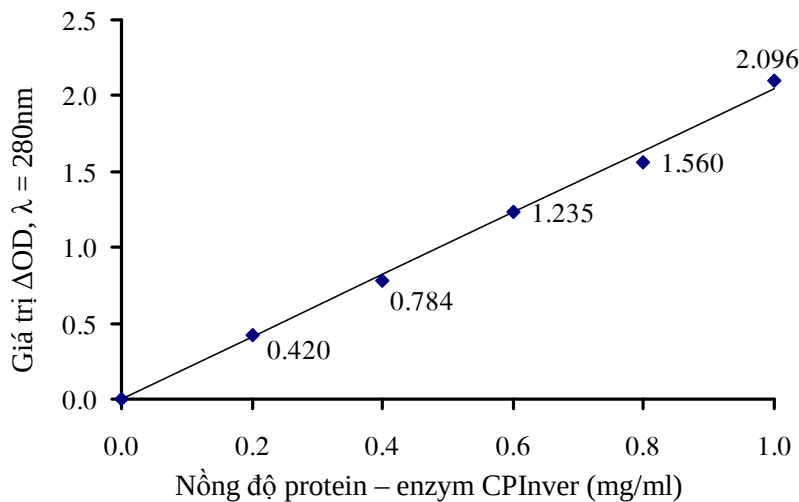
3.1.2.Xây dựng đường chuẩn nồng độ protein – enzyme theo phương pháp UV với $\lambda = 280 \text{ nm}$

Ý nghĩa của phương pháp này là sử dụng đường chuẩn n⁰ protein – enzyme CPIInver để xác định lượng protein – enzyme có trong dung dịch sau khi cố định enzyme và xác định lượng protein – enzyme cố định trong hạt Ca-alginate theo công thức sau :

$$\text{MPr - En cố định} = \text{mPr - En ban đầu} - \text{mPr - En trong dung dịch sau khi cố định}$$

Với: mPr-En : lượng protein – enzyme.

Sử dụng công thức $CV = C'V'$ để pha loãng dung dịch CPIInver ở các nồng độ từ 0,2 – 1,0 mg/ml và xây dựng đường chuẩn n⁰ protein – enzyme của CPIInver tương tự như mục 3.1.1 nhưng giá trị OD được đo ở bước sóng 280 nm và kết quả được thể hiện ở đồ thị 3.2.



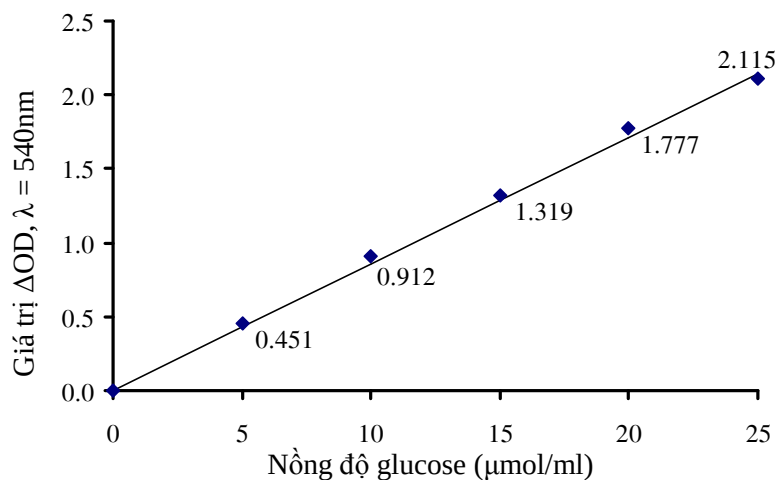
Đồ thị 3.2.Đường chuẩn nồng độ protein – enzyme CPIInver (mg/ml)

Sử dụng hàm Slope xác định được hệ số góc a của đường chuẩn nồng độ protein – enzyme là 2,0501.

3.2. Xác định pH_{opt} , t_{opt}^0 và khả năng chịu nhiệt của CPIInver

3.2.1. Xây dựng đường chuẩn dung dịch glucose

Dung dịch glucose được pha thành các nồng độ 5, 10, 15, 20 và 25 $\mu\text{mol/ml}$ và xác định giá trị OD với $\lambda = 540 \text{ nm}$. Đường chuẩn nồng độ glucose được thể hiện ở đồ thị 3.3



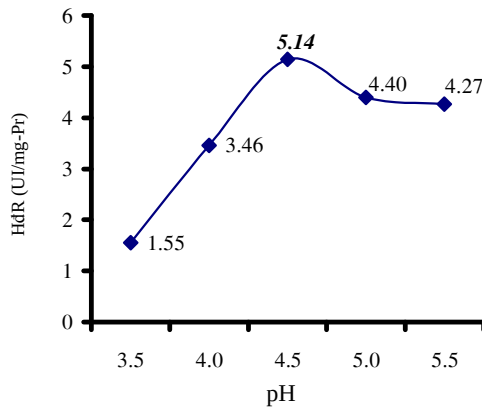
Đồ thị 3.3. Đường chuẩn nồng độ glucose ($\mu\text{mol/ml}$)

Sử dụng hàm Slope xác định được hệ số góc a của đường chuẩn nồng độ glucose là 0,0855.

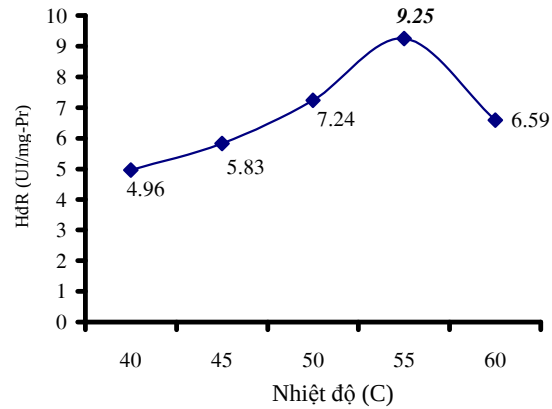
3.2.2. Xác định pH_{opt} , t^0_{opt} và khả năng chịu nhiệt của CPInver

– Xác định pH_{opt} : Điều kiện thí nghiệm gồm n^o saccharose 5%, $t^0 = 40^{\circ}C$ và pH thay đổi từ 3,5 – 5,5 thì HđR của CPInver = 5,142 UI/mg-Pr cao nhất tại pH = 4,5. Kết quả được thể hiện ở đồ thị 3.4.

– Xác định t^0_{opt} : Điều kiện thí nghiệm gồm n^o saccharose 5%, pH = 4,5 và t^0 thay đổi từ 40 – 60 $^{\circ}C$ thì HđR của CPInver = 9,25 UI/mg-Pr cao nhất tại nhiệt độ 55 $^{\circ}C$. Kết quả được thể hiện ở đồ thị 3.5.

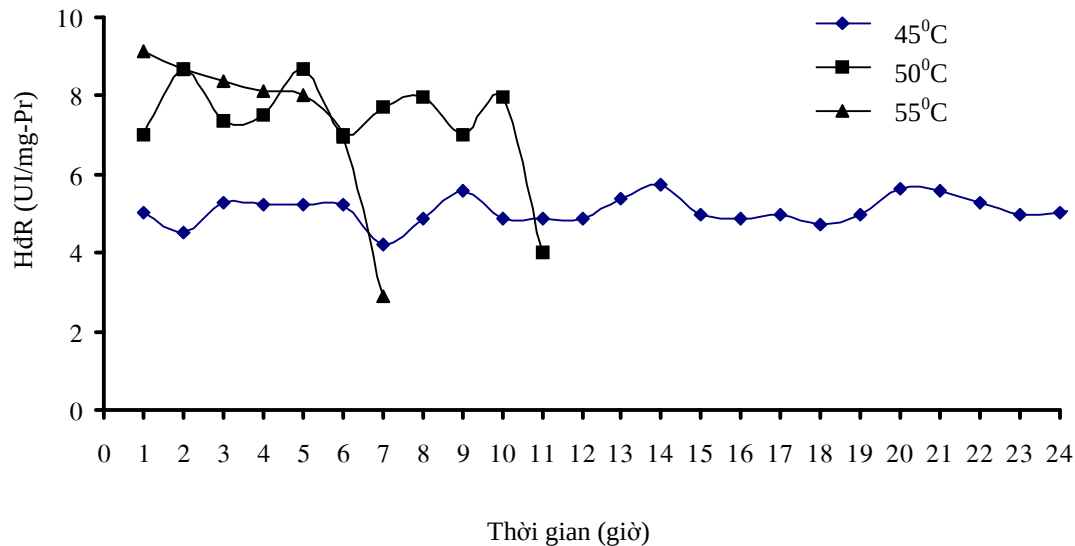


Đồ thị 3.4. Sự phụ thuộc HđR vào pH



Đồ thị 3.5. Sự phụ thuộc HđR vào t^0

Khả năng chịu nhiệt của CPInver theo thời gian được thể hiện ở đồ thị 3.6.



Đồ thị 3.6. Khả năng chịu nhiệt của CPInver tại các nhiệt độ 45, 50 và 55 $^{\circ}C$ theo thời gian

CPInver có khả năng chịu nhiệt và kéo dài 24 giờ tại nhiệt độ 45 $^{\circ}C$ với HđR trung bình $5,08 \pm 0,35$ UI/mg-Pr. Trong khi tại nhiệt độ 50 $^{\circ}C$ thì hoạt tính ổn định trong 9 giờ với HđR trung bình $7,69 \pm 0,64$ UI/mg-Pr và giờ thứ 10 HđR suy giảm hơn 50%. Tại nhiệt độ 55 $^{\circ}C$ chỉ ổn định trong 5 giờ với HđR trung bình $8,22 \pm 0,75$ UI/mg-Pr và suy giảm 50% HđR ở giờ thứ 6.

3.3. Kết luận tổng hợp

Thí nghiệm 3.2.2 với ý nghĩa thiết lập các điều kiện tối ưu của CPInver với mục đích so sánh với chế phẩm invertase cố định tại các điều kiện nêu trên.

3.3.1. Cố định invertase trong hạt Ca-alginate

Hiệu suất protein – enzyme cố định thay đổi theo nồng độ alginate được thể hiện ở bảng 3.2. HđR của các loại Hạt-Inver được thể hiện ở bảng 3.2

Ảnh hưởng nồng độ alginate lên HđR của Hạt-Inver

Bảng 3.2. Ảnh hưởng nồng độ alginate lên HđR của Hạt-Inver

n ⁰ alginate		3,0	3,5	4,0	4,5
Hiệu suất cố định protein – enzyme (%)		55,72	64,27	55,36	53,35
HđR (UI/mg-Pr)	Thí nghiệm lần 1	2,18	3,51	3,25	1,49
	Thí nghiệm lần 2	2,06	3,72	3,27	1,64
	Thí nghiệm lần 3	2,03	3,64	3,34	1,24
HđR trung bình (UI/mg-Pr)		2,09	3,62	3,29	1,46
Hiệu suất HđR cố định (%)		22,59	39,14	35,57	15,78

Điều kiện thí nghiệm: nồng độ saccharose 5%, pH = 4,5 và nhiệt độ 55 °C. HđR trung bình đạt $3,62 \pm 0,11$ UI/mg-Pr với hiệu suất HđR cố định là 39,14% của Hạt-Inver 3,5% so với CPInver trong cùng một điều kiện thí nghiệm.

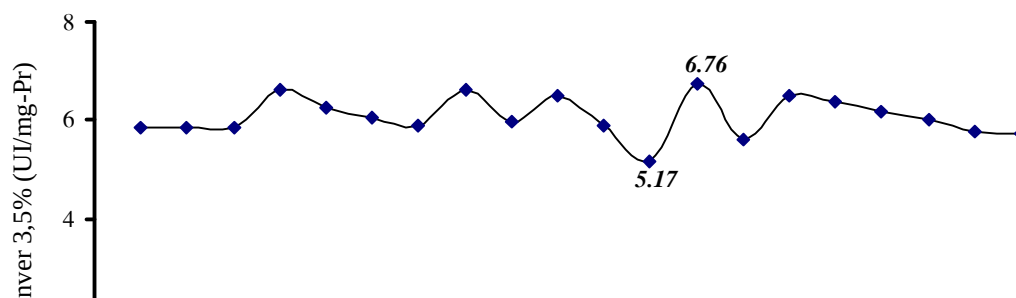
3.3.2. Ảnh hưởng nồng độ cơ chất lên HđR của Hạt-Inver 3,5%

Bảng 3.3 Ảnh hưởng nồng độ cơ chất lên HđR của Hạt-Inver 3,5%

Nồng độ saccharose (%)	4	5	6	7	8	9
HđR Thí nghiệm lần 1	3,60	4,36	5,68	5,75	5,23	4,60
HđR Thí nghiệm lần 2	3,95	4,29	5,65	5,78	5,28	4,62
HđR Thí nghiệm lần 3	3,67	4,30	5,73	5,87	5,29	4,56
HđR trung bình (UI/mg)	3,74	4,32	5,69	5,80	5,27	4,59
Hiệu suất HđR cố định (%)	32,92	38,03	50,09	51,06	46,39	40,40

Điều kiện thí nghiệm: nồng độ saccharose 7%, pH = 4,5 và nhiệt độ 55 °C. HđR trung bình đạt $5,80 \pm 0,06$ UI/mg-Pr với hiệu suất HđR cố định là 51,06% của Hạt-Inver 3,5% so với CPInver trong cùng một điều kiện thí nghiệm.

3.3.3. Xác định khả năng tái sử dụng của Hạt-Inver 3,5%

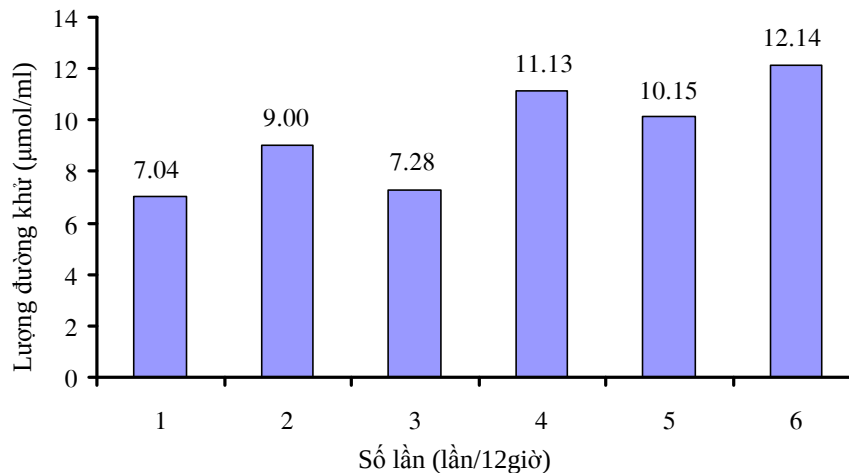


Đồ thị 3.7. Khả năng tái sử dụng của Hạt-inver 3,5%

Điều kiện thí nghiệm : nồng độ saccharose 7%, pH = 4,5 và nhiệt độ = 55 °C. HđR của Hạt-Inver 3,5% dao động từ 5,17 – 6,67 UI/mg-Pr, HđR trung bình trong 20 lần tái sử dụng là $6,07 \pm 0,40$ UI/mg-Pr.

3.3.4. Khả năng thủy phân saccharose của Hạt-Inver 3,5%

Kết quả thí nghiệm 3.2.2 đã xác định khả năng chịu nhiệt của CPInver là 45 °C và kéo dài liên tục trong 24 giờ. Hạt-Inver 3,5% được thí nghiệm với các điều kiện sau: 5 g hạt, 8 ml saccharose 7%, nhiệt độ 45°C, thời gian thủy phân là 12 giờ/lần và xác định lượng đường khử sinh ra (μmol đường khử/ml) và được lặp lại nhiều lần liên tục. Kết quả được thể hiện ở biểu đồ 3.1.



Biểu đồ 3.1. Lượng đường khử sinh ra theo số lần lặp lại

Lượng đường khử tạo ra dao động từ 7,04 – 12,14 μmol đường khử/ml và lượng đường khử trung bình là $9,46 \pm 2,06$ μmol đường khử/ml sau 6 lần lặp lại liên tục với tổng thời gian thí nghiệm là 72 giờ.

4. KẾT LUẬN

Do thời gian thí nghiệm có hạn nên các kết quả thu nhận còn hạn chế. Qua các kết quả thí nghiệm, chúng tôi xác định Hạt-Inver 3,5% đạt những điều kiện tối ưu như sau :

- Hiệu suất cố định protein – enzyme đạt 64, 27%.

- Hiệu suất hoạt độ riêng cố định đạt 39,14% khi nồng độ saccharose 5% và 51,06% khi nồng độ saccharose 7% với pH = 4,5 và nhiệt độ là 55 °C so sánh cùng điều kiện thí nghiệm của CPInver.
- Số lần tái sử dụng là 20 lần với hoạt độ riêng trung bình là $6,07 \pm 0,40$ UI/mg-Pr trong điều kiện thí nghiệm : nhiệt độ là 55 °C, pH = 4,5 và nồng độ saccharose 7%.
- Số lần tái sử dụng là 6 lần với mỗi lần là 12 giờ, lượng đường khử trung bình sinh ra là $9,46 \pm 2,06$ μ mol/ml trong điều kiện thí nghiệm : nhiệt độ là 45 °C, pH = 4,5 và nồng độ saccharose 7%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Alginate. London South Bank University, *Source Alginates (E400-E404) are produced by brown seaweeds (Phaeophyceae, mainly Laminaria)* <http://www.lsbu.ac.uk/water/index.html>, (10/2003)
- [2]. R.Bergamasco, F.J.Bassetti, F.F.de Moraes and G.M.Zanin. *Characterization of Free And Immobilized Invertase Regarding Activity And Energy Of Activation*. Brazilian Journal of Chemical Engineering. vol.17 n.4-7 São Paulo Dec.(2000)
- [3]. Đồng Thị Thanh Thu. *Enzyme Cố định*. Đại học Khoa học Tự nhiên TP Hồ Chí Minh. (1999)
- [4]. Hung Pham and Lisa-Marie Usher. *Enzyme Immobilization Methods*, Immobilized Enzymes are defined as enzymes physically confined in a certain region with retention of their catalytic activities. Method for enzyme emmobilization.
- [5]. <http://www.esb.ucp.pt/~bungah/immob/immob.htm>
- [6]. Nam Sun Wang. *Cell Immobilization With Calcium Alginate*. Department of Chemical Engineering University of Maryland. (2003)
- [7]. Nam Sun Wang. *Enzyme Kinetics Of Invertase Via Initial Rate Determination*. Department of Chemical Engineering University of Maryland. 2003.
- [8]. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). *Enzyme Nomenclature*. EC 3.2.1.26. (2000)
- [9]. Wilbur H. *Lecture 1 Protein Assay*. BL483 Biochemistry Techniques. (1999)