

# P PHẦN NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT GLUCOAMILAZA THỦY PHÂN TINH BỘT SỐNG TỪ ASPERGILLUS NIGER

DƯƠNG VĂN HỢP

Đến nay những kết quả nghiên cứu và ứng dụng glucoamilaza thủy phân tinh bột sống là một tiến bộ kỹ thuật, nó đưa lại hiệu quả kinh tế đáng kể trong công nghiệp sản xuất rượu từ tinh bột.

Cấu trúc phân tử của loại enzym này có vai trò quyết định đến khả năng phân tinh bột sống của nó. Phân tử enzym có hai vị trí chức năng khác nhau vị trí giúp cho khả năng bám của phân tử enzym vào hạt tinh bột sống, còn vị kia là trung tâm hoạt động xúc tác cho quá trình thủy phân tinh bột [10].

Khả năng sinh tổng hợp glucoamilaza thủy phân tinh bột sống được tìm ở các vi sinh vật khác nhau: *Amilomices* [10] *Aspergillus niger* [11] *Aspergillus awamori* [7] *Rhizopus* [4]. Glucoamilaza thủy phân tinh bột sống cũng được thấy ở nấm men *Endomycopsis fibuligera* [12] và vi khuẩn *Rhodospseudomonas gelatinosa* [9].

Ở Nhật Bản đang thương phẩm của loại enzym này Glucozim — GNL và Glucozim GR—2, chủ yếu được sản xuất từ *Aspergillus niger* và *Rhizopus sp.* Đặc lý hoa của Glucoamilaza thủy phân tinh bột sống đã được nghiên cứu trong báo cáo của Jaturaporn trên đối tượng *Amilomices sp.* [10], Y.Koba trên đối tượng *Asp. awamori* [7].

Báo cáo này góp phần nghiên cứu sản xuất enzym Glucoamilaza thủy phân tinh bột sống từ một chủng nấm mốc *Asp. niger* trên môi trường cám mì. Khả năng thủy phân các loại tinh bột khác nhau của loại enzym này và điều kiện bảo quản nó trong sản xuất cũng được đề cập đến.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

**Vi sinh vật:** Chủng nấm mốc *Asp. niger* có khả năng sinh tổng hợp Glucoamilaza thủy phân tinh bột sống hiện đang được bảo quản tại Trường Đại học Kyushu Nhật Bản.

**Môi trường sản xuất enzym:** Bình tam giác 300ml chứa 20 gam cám mì, 2 gam bột khoai tây, 10ml nước máy, trộn đều và khử trùng ở 120°C, 1 at, 30 phút

**Xác định hoạt độ enzym:**

Hoạt độ  $\alpha$  amilaza được xác định theo phương pháp của Fuwa 1954 [3].

— Hoạt độ glucoamilaza được xác định bằng số mg glucoza giải phóng từ hỗn dịch phản ứng gồm 5ml tinh bột tan 1%, 1ml đệm axetat 0,2M pH = 4,5, nước cất và 1ml enzym cần xác định hoạt độ. Toàn bộ hỗn dịch được giữ trong 10 phút. Đường khử giải phóng được xác định theo phương pháp của Brand [8]. Một đơn vị Glucoamilaza là lượng enzym làm giải phóng 1mg trong 1ml ở điều kiện trên.

— Hoạt độ của xelluloza, pectinaza, xylaza được xác định theo phương pháp của Fujio và cộng sự [5].

— Khả năng thủy phân tinh bột sống được xác định bằng số phần trăm bột bị thủy phân từ hỗn dịch gồm 100mg tinh bột sống, 2ml enzym (có 5 đơn vị hoạt độ glucoamilaza), 1ml đệm axetat pH = 4,5 0,02M, 2ml nước cất. Tổng dung dịch được giữ ở 40°C trong 18 giờ. Đường khử giải phóng từ phần tinh bột được xác định theo phương pháp micro — Bertrand.

4. Tối ưu hóa thành phần môi trường sản xuất Glucoamilaza từ *Asp. niger* trên môi trường cám mì. Sử dụng phương pháp ô vuông La tinh của thuật Box — Willson như đã mô tả trong báo cáo của Nguyễn Lân Dũng [13].

## KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Hoạt độ của  $\alpha$  amilaza, glucoamilaza, xellulaza, pectinaza, xylaza trên môi trường cám mì.

Một lượng bào tử  $10^6 - 10^7$  được cấy vào bình tam giác chứa môi trường cám mì đã thanh trùng. Sau 72 giờ ở nhiệt độ 30°C enzym được chiết bằng nước cất ở 4°C qua đêm. Kết quả xác định hoạt độ của các enzym ghi trong bảng 1.

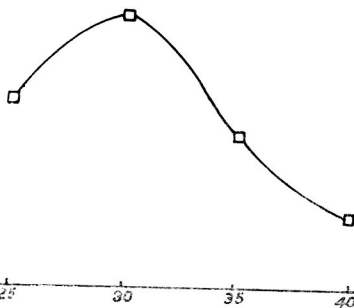
Bảng 1: Hoạt độ  $\alpha$  amilaza, glucoamilaza, xellulaza, pectinaza, xylaza của *Asp. niger* trên môi trường Cám mì.

Enzim	Hoạt độ (đv/g khô)
$\alpha$ amilaza	61880
glucoamilaza	177,0
xellulaza	6,7
pectinaza	10,9
Xylaza	17,1

2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình sinh tổng hợp glucoamilaza của *Asp. niger*.

Môi trường sản xuất glucoamilaza sau khi đã cấy bào tử *Asp. niger* được nuôi ở các nhiệt độ khác nhau 25°, 30°, 35°, 40°C. Kết quả xác định được hoạt độ glucoamilaza của các mẫu nuôi cấy ở các nhiệt độ khác nhau được trình bày ở bảng 2.

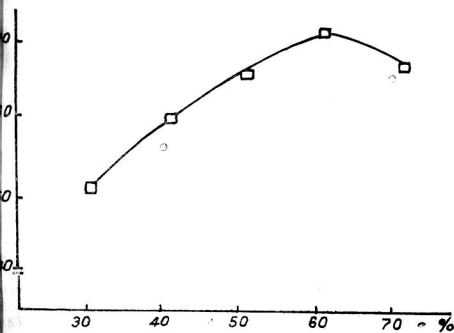
Hoạt độ glucoamilaza (đv/g)



Hình 1: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình sinh tổng hợp glucoamilaza

Kết quả trên hình 1 cho thấy nhiệt độ thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp pamilaza ở *Asp. niger* trên môi trường cám mì là 30°C.

Hoạt độ (glucoamilaza đv/g)



Hình 2: Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường đến quá trình sinh tổng hợp enzym.

### 3. Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường đến quá trình sinh tổng hợp glucoamylaza

*Asp. niger* được nuôi cấy trên môi trường cám mì có độ ẩm môi trường khác nhau 30%, 40%, 50%, 60%, 70%. Kết quả xác định hoạt độ glucoamylaza sau khi nuôi cấy *Asp. niger* 72 giờ ở 30°C, được trình bày ở hình 2.

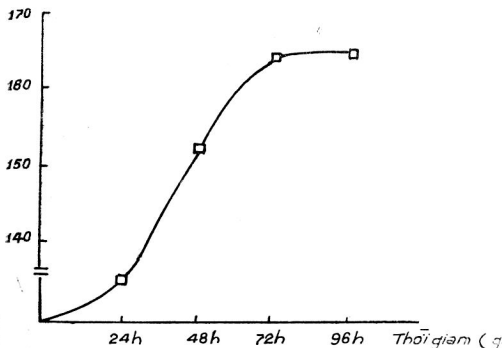
Qua hình 2 ta thấy độ ẩm 60% được coi là thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp glucoamylaza của chủng *Asp. niger* này. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Amaret [1]. Theo tác giả này thì độ ẩm ban đầu càng cao, độ thông khí là những yếu tố quan trọng ảnh hưởng rõ rệt đến quá trình sinh tổng hợp glucoamylaza của *Asp. niger* trên môi trường đặc.

Ở cùng một độ ẩm ban đầu thì hoạt độ glucoamylaza tăng hơn dần những mẫu có độ thông khí và độ ẩm cuối cùng cao.

### 4. Động học quá trình sinh tổng hợp glucoamylaza của *Asp. niger* trên môi trường cám mì.

*Asp. niger* được nuôi trên môi trường cám mì có độ ẩm 60% tại 30°C. Hoạt độ glucoamylaza được xác định theo thời gian kết quả được trình bày ở hình 3.

Hoạt độ glucoamylaza (đv/g)



Hình 3: Động học quá trình sinh tổng hợp glucoamylaza của *Asp. niger* trên môi trường cám mì.

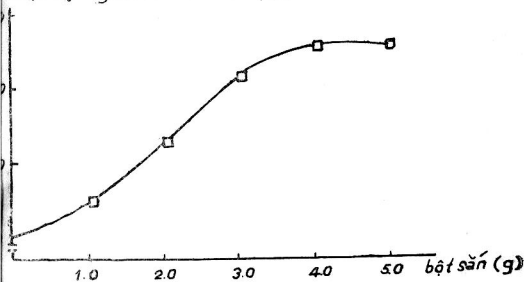
Kết quả trên hình 3 cho thấy hoạt độ glucoamylaza đạt cực đại sau 72 giờ nuôi cấy trong điều kiện thí nghiệm.

### 5. Tối ưu hóa thành phần môi trường:

Carbon (C) Nitơ (N) Phospho (P) cho sản xuất glucoamilaza từ *Asp. niger* môi trường cám mì. Việc lựa chọn các nguồn C, N, P thích hợp cho sản xuất glucoamilaza từ *Asp. niger* trên môi trường cám mì thực hiện dựa vào phương pháp ô vuông la tinh. Phương pháp này đã được sử dụng có hiệu quả quá trình tối ưu hóa môi trường sản xuất enzym từ vi sinh vật [2]. Kết quả các nghiệm C (tinh bột tan, tinh bột sắn, tinh bột khoai tây): N ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), P ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) thì tinh bột sắn,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  kết quả cao hơn cả.

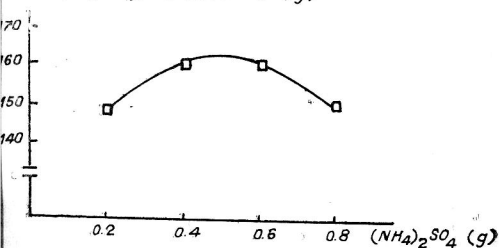
Tiếp đó là thí nghiệm lập đường cong tối ưu cho từng yếu tố thành phần: P. Kết quả được minh họa trong hình 4, 5, 6.

#### Hoạt độ glucoamilaza (đv/g)



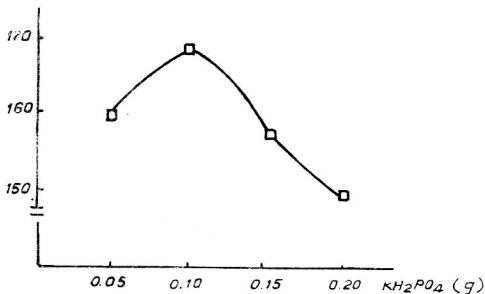
4. Ảnh hưởng của lượng tinh bột sắn đến quá trình sinh tổng hợp glucoamilaza ở *Asp. niger*.

#### Hoạt độ glucoamilaza (đv/g)



5. Ảnh hưởng của lượng  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  đến quá trình sinh tổng hợp glucoamilaza ở *Asp. niger*

Hoạt độ glucoamilaza (đv/g)



Hình 6: Ảnh hưởng của lượng  $KH_2PO_4$  đến quá trình sinh tổng hợp glucoamilaza của *Asp. niger*.

Trên cơ sở đường cong tối ưu cho từng yếu tố thành phần vừa được lập, bước quy hoạch hóa thực nghiệm và tối ưu hóa thành phần môi trường bằng thuật toán của Box-Willson [13] được tiến hành. Kết quả đã chọn ra được môi trường cám mì có các thành phần sau: Tinh bột sắn—4g,  $(NH_4)_2SO_4$ —0,5g,  $KH_2PO_4$ —0,13g. Khi nuôi cấy *Asp. niger* trên môi trường cám mì có thành phần như trên hoạt độ glucoamilaza đạt 270 đv/g trong khi đó ở môi trường ban đầu hoạt độ chỉ vào khoảng 170—190 đv/g.

6. Khả năng thủy phân các loại tinh bột sống khác nhau của glucoamilaza sản xuất từ *Asp. niger* trên môi trường cám mì.

Dịch enzym thô được kết tủa bằng  $(NH_4)_2SO_4$ —80% bão hòa, sau đó rửa muối bằng thẩm tích. Dịch enzym thu được dùng để thủy phân các loại tinh bột sống khác nhau. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

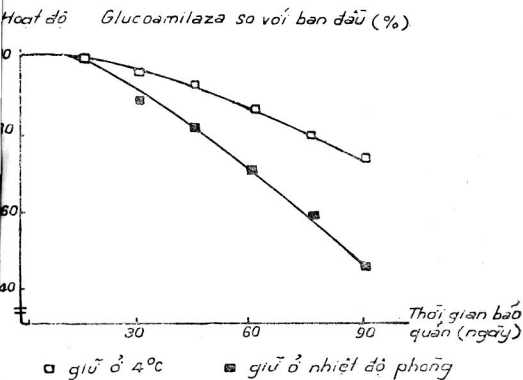
Bảng 2: Khả năng thủy phân các loại tinh bột sống khác nhau của glucoamilaza.

Loại tinh bột	Mức độ thủy phân (%)
Khoai lang	5,3
Sắn	6,5
Ngô nếp	8,5
Ngô	11,3
Bột mì	13,0
Gạo nếp	16,3

Kết quả ở bảng 2 cho thấy mức độ thủy phân của glucoamilaza đối với các tinh bột khác nhau là không giống nhau. Sự sai khác về khả năng thủy phân glucoamilaza đối với các loại tinh bột này có thể là do khả năng bám của enzyme vào các loại hạt tinh bột khác nhau. Khả năng này phụ thuộc số vị trí bám có trên các hạt tinh bột. Điều này đã được đề cập đến trong báo cáo khác của chúng tôi [6]

### 7. Biến động hoạt độ glucoamilaza theo thời gian bảo quản ở 4°C và nhiệt độ phòng

Kết quả nghiên cứu được thực hiện sau 90 ngày giữ glucoamilaza của *Asp.* trên môi trường cám mì ở 4°C và nhiệt độ phòng: Hoạt độ glucoamilaza các mẫu lấy ra tại các thời điểm khác nhau được trình bày ở hình 7.



Hình 7: Biến động hoạt độ glucoamilaza theo thời gian bảo quản ở 4°C và nhiệt độ phòng

Kết quả ở hình 7 cho thấy hoạt độ glucoamilaza vẫn còn 65% khi giữ ở 4°C sau 90 ngày trong khi đó chỉ còn 45% hoạt độ ban đầu khi giữ ở nhiệt độ phòng. Khi bảo quản ở 4°C sau 45 ngày hoạt độ glucoamilaza vẫn giữ được 90% so với ban đầu. Kết quả này có thể dùng cho việc bảo quản glucoamilaza (trên môi trường đặc: cám mì, cám gạo) trong sản xuất lớn.

## KẾT LUẬN

1. Lựa chọn thành phần môi trường và điều kiện sản xuất glucoamilaza thủy phân tinh bột sắn từ *Asp. niger* trên môi trường cám mì ở môi trường được lựa chọn hoạt độ glucoamilaza đạt 270 đv/g khô.

2. Khả năng thủy phân tinh bột sắn của glucoamilaza đối với các loại bột khác nhau là không giống nhau.

3. Trong sản xuất glucoamilaza trên môi trường cám mì từ *Asp. niger* chế phẩm enzym này, nên được bảo quản ở 4°C sau khi đã làm khô. Ở điều kiện sau 15 ngày hoạt độ glucoamilaza vẫn đạt 90% so với ban đầu.

## REFERENCES

1. Amaret, B et al Microbiology and Utilization of Renewable Resou Vol. 5, P. 92-96. 1987.
2. Dũng, N.L. Cộng sự. Báo cáo đề tài 610 20 409. 1981.
3. Fuwa, H. Biochem. Vol. 41. P. 583 1954.
4. Fujio, Y. et al Biotech and Bioen. Vol 19. P. 1270-1273. 1985.
5. Fujio, Y. et al. Ferment technol. P. 161-168. 1985.
6. Hop, D.V. Fujio, Y. Annual report of IC Biotech. Vol. 11-1988.
7. KoBa, Y. et al. Annual report of IC Biotech. Vol. 8. P. 109-119. 1985.
8. Klein, G. et al. Handbuch der pflanzenanalyse, II spezielle analyse ( weinp 786)
9. Lerbuck, B. Microbiol. Utilization of Renewable Resources Vol. 5, P. 119. 1987.
10. Jaturaporn, et al. Annual report of IC Biotech. Vol. 7. P.93 - 100. 1985.
11. Ueda, S. et al. Annual report of IC Biotech. Vol. 8. P.58 -69. 1985.
12. Ueda, S. et al. Appl. Microbiol. Biotechnol, Vol. 19. P. 341-346. 1984.
13. Schroder, et al. Biotechnol. and bioengineer. Sym. N°4. P. 713-720. 1984.

DƯƠNG VĂN HỢP

### PRODUCING RAW STARCH HYDROLYZING GLUCOAMYLASE FROM ASPERGILLUS NIGER

Activities of  $\alpha$  amylase, glucoamylase, xellulose, pectinase, xylanase *Aspergillus niger* on wheat brand medium were determined. Optimal temperature, innitial moisture, time course for glucoamylase production on wheat brand medium was studied too. A medium was optimized containing wheat brand 20 grams, cassava starch 4 grams  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,55 grams,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,13gr tap water 10mls. When culturing *Aspergillus niger* on this medium glucoamylase activity reaches 270 U/gram (tried weigh).

Hydrolyzations of glucoamylase on various kinds of raw starch are different. That likely to depend on the different structures of those raw starch types. On wheat brand medium, glucoamylase activity still reaches 90% of initial activity when storing at 4°C for 90 days.

Trung tâm Vi sinh ứng dụng  
ĐHTH Hà Nội

Đón tòa soạn ngày 15/12/1988