

BƯỚC ĐẦU THĂM DÒ ĐIỀU KIỆN CHIẾT RÚT, BẢO QUẢN VÀ MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA DỊCH CHIẾT PROTEINAZA TỪ CHẾ PHẨM THÔ PROTEINAZA CỦA *BACILLUS SUBTILIS* CNTP - B - 009

Lê Đức Mạnh, Ngô Tiến Hiến
Viện Công nghiệp thực phẩm Hà Nội

Lê Đức Ngọc
Đại học Khoa học tự nhiên - ĐHQGHN

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Proteinaza đã được nghiên cứu và ứng dụng nhiều ngành khác nhau: Y học, Công nghiệp thực phẩm, Công nghiệp nhẹ,... (Jepsen, 1993; Hansen, 1994). Người ta có thể thu nhận Proteinaza từ nhiều nguồn khác nhau: Động vật, thực vật, vi sinh vật. Nhưng kinh tế nhất vẫn là thu nhận từ vi sinh vật, do lên men chìm hoặc lên men bề mặt tạo ra (Adler - Nissen, 1987; Whitaker, 1990).

Công trình này chúng tôi nghiên cứu thu nhận Proteinaza từ chế phẩm lên men bề mặt của vi khuẩn *Bacillus subtilis* với mục đích ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm như bia, đậu tương thủy phân..., trong công nghiệp nhẹ làm chất tẩy rửa, thuộc da... với các nội dung:

- Nghiên cứu các điều kiện chiết rút thích hợp để có hiệu suất thu hồi cao, chế phẩm Proteinaza có hoạt độ mạnh, chế phẩm tương đối sạch.
- Nghiên cứu điều kiện bảo quản Proteinaza thu được.
- Nghiên cứu một số đặc tính của Proteinaza thu nhận được.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu: Chế phẩm thô Proteinaza do lên men bề mặt của vi khuẩn *Bacillus subtilis* CNTP - B - 009 của Viện Công nghiệp thực phẩm.
2. Phương pháp nghiên cứu:
 - Xác định hoạt động Proteinaza theo phương pháp Anson cải tiến (Anson unit - viết tắt Au).
 - Xác định số tế bào vi khuẩn bằng cách đếm khuẩn lạc được nuôi cấy trong môi trường thạch - thịt - pepton.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Có rất nhiều phương pháp khác nhau để thu nhận chế phẩm Enzim. Tuy nhiên tùy mục đích sử dụng khác nhau mà người ta đặt nhiệm vụ thu nhận Enzim với mức độ tinh khiết khác nhau,

bằng các phương pháp khác nhau.

Đặt vấn đề thu nhận chế phẩm Enzim bán tinh khiết để có thể ứng dụng với số lượng lớn trong công nghiệp, chúng tôi nghiên cứu chiết tách Enzim bằng nước cất, bằng dung dịch điện phốt phát với các tỷ lệ chế phẩm Enzim trong nước, tỷ lệ chế phẩm Enzim thô trong dung dịch đệm khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy chiết trong dung dịch đệm ở nồng độ Na_2HPO_4 1/15 M, KH_2PO_4 1/15 M ở giá trị pH = 6,4 cho kết quả tốt nhất.

Bảng 1. Ảnh hưởng tỷ lệ dịch chiết và hàm lượng Enzim thu được

TT	Tỷ lệ chiết	Dịch lọc thu được (ml)	Hoạt độ (Au)	Tổng hoạt độ (Au)
1	10g Enzim thô + 30ml H ₂ O	25	0,70	17,5
2	10g Enzim thô + 40ml H ₂ O	32	0,65	20,8
3	10g Enzim thô + 50ml H ₂ O	38	> 0,4	15,2
4	10g Enzim thô + 30ml dd đệm	25	0,80	20,0
5	10g Enzim thô + 40ml dd đệm	32	0,70	22,4
6	10g Enzim thô + 50ml dd đệm	38	0,45	17,1

Từ kết quả bảng 1 cho thấy tỷ lệ chất thô trong dung dịch đệm bằng 1/4 là tốt nhất, hiệu suất thu hồi Enzim cao, tuy nhiên hoạt độ riêng không phải là lớn nhất. Ở tỷ lệ chất thô trong dung dịch đệm bằng 1/3 hoạt độ riêng lớn nhưng tổng thu hồi lại thấp, do đó chúng tôi đề nghị chọn tỷ lệ 1/4 là phù hợp.

Enzim sau chiết thô vẫn còn một lượng lớn tế bào vi khuẩn và có mùi đặc trưng của *Subtilis*. Tiến hành làm sạch sơ bộ bằng chất trợ lọc, sau khi làm sạch xác định hoạt độ Enzim và số lượng tế bào vi khuẩn còn lại. Kết quả trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả sử dụng chất trợ lọc

TT	% chất trợ lọc	Hoạt độ (Au/g)	Vi khuẩn (số tế bào/g)	Mùi subtilis
1	0	0,70	10 ⁵	Đậm đặc
2	0,1	0,72	10 ⁵	Đậm đặc
3	0,2	0,72	< 10 ⁴	Đậm đặc
4	0,3	0,72	8.10 ⁴	Nhẹ hơn
5	0,4	0,70	8.10 ⁴	Nhẹ hơn
6	0,5	0,65	6.10 ⁴	Không mùi
7	0,6	0,60	5.10 ⁴	Không mùi
8	Novonordish		10 ⁴	Không mùi

Khi cho chất trợ lọc vào chiết Proteinaza, lượng dịch thu được không thay đổi ở ngưỡng 0,5% thì hoạt độ Proteinaza không giảm, ở những nồng độ thấp, hoạt độ Proteinaza có tăng lên một lượng nhỏ, có thể giải thích bằng sự tinh sạch hơn của chế phẩm Proteinaza đã làm cho hoạt

hoạt độ Proteinaza tăng lên, nhưng ở nồng độ cao hơn hoạt độ Proteinaza giảm đi, có lẽ là do một phần Proteinaza bị hấp thụ vào chất trợ lọc. Ở nồng độ chất trợ lọc cao thì mùi của chế phẩm giảm nhưng hoạt độ Proteinaza cũng giảm đáng kể, tuy nhiên vẫn còn cao hơn chế phẩm Novonordish. Do đó chúng tôi đề nghị sử dụng 0,5% chất lọc là đủ.

Để chiết được tối đa Proteinaza có trong chế phẩm thô mà chỉ xác định tỷ lệ chất không rong dệm là chưa đủ, chúng tôi tiến hành xác định thời gian chiết, nhiệt độ chiết có lắc ở trên sàng lọc (180 vòng/1 phút) và không có lắc. Kết quả được trình bày ở bảng 3 và 4.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian chiết tới hoạt độ Enzim

STT	Thời gian chiết (phút)	Hoạt độ (Au/g)
1	30'	0,6
2	60'	0,7
3	90'	0,7
4	120'	0,7

Bảng 4. Ảnh hưởng nhiệt độ chiết tới hoạt độ Enzim

STT	Thời gian chiết (phút)	Hoạt độ (Au/g)
1	30°C không lắc	0,50
2	37°C không lắc	0,65
3	32°C lắc 180 v/phút	0,60
4	37°C lắc 180 v/phút	0,70

Kết quả bảng 3 và 4 cho thấy để chiết được tối đa lượng Proteinaza trong chế phẩm thô cần tiến hành ở 37°C trong thời gian 60 phút trên sàng lọc 180 v/phút.

Bảng 5. Hoạt độ Proteinaza (Au/gr) trong môi trường bảo quản

TT	Nồng độ chất bảo quản (%)	Thời gian bảo quản (ngày)				
		0	30	60	90	105
1	1%	0,65	0,3	0,25	0,2	0,1
2	2%	0,65	0,45	0,34	0,2	0,145
3	3%	0,65	0,55	0,5	0,4	0,3
4	4%	0,65	0,6	0,6	0,58	0,55
5	5%	0,65	0,65	0,62	0,58	0,58
6	6%	0,65	0,65	0,6	0,55	0,52
7	7%	0,65	0,6	0,6	0,51	0,51

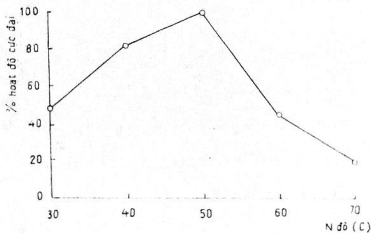
Sau khi có được chế phẩm Proteinaza chúng tôi tiến hành bảo quản trong các điều kiện khác nhau với các chất bảo quản khác nhau. Có thể bảo quản chế phẩm Proteinaza trong các chất bảo

quản khác nhau ở điều kiện lạnh ($5 - 10^{\circ}\text{C}$). Chúng tôi tiến hành bảo quản chế phẩm Proteinaza trong các chất bảo quản nói trên nhưng nhận thấy việc bảo quản Proteinaza trong glicerol là không thích hợp. Bảo quản chế phẩm Proteinaza trong Natri benzoat $\text{C}_6\text{H}_5\text{COONa}$ mang lại kết quả khả quan, được trình bày ở bảng 5.

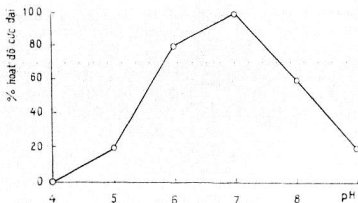
Nồng độ chất bảo quản càng cao hoạt độ Proteinaza càng giảm chậm.

Chế phẩm Proteinaza bảo quản sau 4 tháng ở nồng độ 5% hoạt độ Proteinaza gần không đáng kể, không tạo váng. Chúng tôi cho rằng việc bảo quản chế phẩm Proteinaza trong 5% chất trợ lọc ở điều kiện lạnh ($5 - 10^{\circ}\text{C}$) là thích hợp.

Xác định ảnh hưởng của nhiệt độ, pH tới hoạt độ Proteinaza và độ bền nhiệt của Enzim, kết quả được trình bày ở các đồ thị 1, 2 và 3.



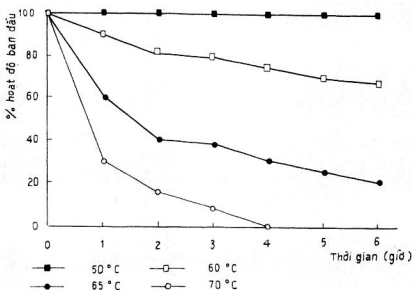
Đồ thị 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ Enzim



Đồ thị 2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ Enzim

Từ đồ thị 1, 2, 3 cho thấy nhiệt độ và pH có ảnh hưởng rất lớn đến hoạt độ Proteinaza vì khuẩn hoạt động tốt nhất ở $48 - 52^{\circ}\text{C}$. Ở nhiệt độ thấp hơn (dưới 40°C) hoạt độ Proteinaza rất thấp, ở nhiệt độ cao hơn (trên 60°C) Proteinaza đã mất hoạt độ đáng kể chỉ còn lại khoảng 40%. pH thích hợp cho hoạt động của Proteinaza là 6,4 - 7,0. Ở pH = 4 Proteinaza đã

ất hoàn toàn hoạt độ, ở pH cao hơn (lớn hơn 7) hoạt độ Proteinaza cũng giảm đáng kể. Từ đồ thị 3 cho thấy Proteinaza vi khuẩn rất bền với nhiệt, ở nhiệt độ 50°C hoạt độ Proteinaza không giảm sau 6 giờ. Ở nhiệt độ cao hơn thì hoạt độ Proteinaza giảm dần theo thời gian và đặc biệt ở 70°C hoạt độ của Proteinaza giảm rất mạnh. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của tác giả S. Jepsen (1993) công bố một số đặc tính của chế phẩm Proteinaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus subtilis*.



Đồ thị 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ bền hoạt độ Enzim

IV. KẾT LUẬN

1. Đã xác định được điều kiện chiết cách Proteinaza nuôi cấy trên bề mặt của vi khuẩn *Bacillus subtilis* CNTP - B - 009 trong đệm phốt phát ở pH = 6,4 với tỷ lệ chất khô trong đệm là 4 có hồ sùng 5% chất trợ lọc, lắc 180 v/phút trong 1 giờ ở 37°C.

2. Khi sử dụng Natri benzoat để bảo quản dịch chiết Proteinaza thành phẩm, đã xác định được nồng độ chất bảo quản thích hợp nhất là 5% ở 5 - 10°C.

3. Điều kiện tối ưu cho hoạt động của Proteinaza là 48 - 52°C, pH 6,4 - 7,0 và Enzim bền ở nhiệt độ ở 50°C trong 6 giờ. Như vậy chế phẩm Proteinaza này hoàn toàn có thể ứng dụng được trong công nghệ sản xuất bia.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- J. Adler - Nissen. Newer uses of microbial enzymes in food processing *Tibtech*. June, Vol. 5 (1987), 170 - 173.
- T. Akin, N. Nakamura, K. Horikosiki. *Appl. Microb. Biotechnol*, Vol. 26 (1987), 323 - 327.
- N. D. Hansen. *Biotimes* Published by Novo - Nordisk A/s Denmark, (1994), 10 - 12.
- S. Hemmingsen. *Applied biochemistry and bioengineering*, Vol. 2 Enzymatic technology (Wingard, Jr. Katchalski - Katzir L. B. and Goldstein L. eds), Academic press (1979), 157 - 183.

5. S. Jepsen. *Enzymatic Brewing Aids - Latest Developments and Status Novo Nordisk Ferment Ltd.* (1993), 2-3.
6. W. John. *Methods in enzymology.* London Academic press (1991), 106-121.
7. G. Reed. *Enzymes in food processing.* Academic press (1966) 301-303.
8. R. J. Whitaker. *New and Future uses of enzymes in food processing.* *Food Biotechnology* Vol. 4 (1990), 669-697.
9. Y. Yamagata, M. Arakawa Kobayashi. *Functional changes of dextran modified alkaline proteinase from alkalophilic Bacillus sp.* *Enzyme and microbial technology*, Vol. 6 (1994), 99-104.

VNU. JOURNAL OF SCIENCE, NAT. SCI., t.XI, n°4, 1995

INITIAL STEP ON EXPLORING CONDITIONS FOR EXTRACTION,
PRESERVATION AND SOME CHARACTERS OF PROTEINAZA SOLUTION
FROM CRUDE PROTEINAZA OF *BACILLUS SUBTILIS* CNTP-B-009

Le Duc Manh, Ngo Tien Hien
Food industries research Institute - Hanoi

Le Duc Ngoc
College of Natural Sciences - VNU

Proteinaza has been extracted from the crude preparation obtained from the *Bacillus subtilis* CNTP-B-009 by phosphate buffer solution at pH 6.4 concentration of solution 1:4 adding substrate 5%, shaking 180/min at 37°C/in 1 hour.

Optimal preservation condition of Protease product is in preservation solution.

Optimal condition for Protease activity is pH 6.4 - 7 at 50°C in 6 hours.