

CHỌN LỰA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY TỐI ƯU VI KHUẨN *BACILLUS LICHENIFORMIS* (CHỦNG BCRP) ĐỂ SINH TỔNG HỢP α - AMYLASE CHỊU NHIỆT

Selection of Optimal Conditions for *Bacillus licheniformis* (strain BCRP) Culture to Synthesize Thermostable α - amylase

Ngô Xuân Mạnh, Nguyễn Thị Lâm Đoàn, Võ Nhân Hậu, Ngô Xuân Dũng

Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

TÓM TẮT

Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu thu được về chọn lựa các điều kiện nuôi cấy tối ưu vi khuẩn *Bacillus licheniformis* (chủng BCRP) để sinh tổng hợp enzym α - amylase chịu nhiệt. Các điều kiện nuôi cấy tối ưu cho *B. licheniformis* (chủng BCRP) (môi trường, tỷ lệ tiếp giống, pH môi trường, nhiệt độ nuôi cấy, thời gian nuôi) được chọn theo phương pháp thực nghiệm. Hoạt tính enzym α -amylase được xác định bằng phương pháp quang phổ. Nồng độ protein được xác định bằng phương pháp nhuộm màu Bradford. Các điều kiện nuôi cấy tối ưu vi khuẩn *B.licheniformis* (chủng BCRP) đã được chọn lựa: Môi trường nuôi cấy với 3% bột gạo thay thế tinh bột, pH môi trường 7,5, nhiệt độ 37°C, thời gian nuôi cấy 42 h. Trên cơ sở các kết quả thu được, các tác giả đã đề xuất sơ đồ nuôi cấy *B.licheniformis* (chủng BCRP) để sinh tổng hợp enzym α -amylase.

Từ khóa: Điều kiện nuôi cấy, enzym α - amylase, vi khuẩn *Bacillus licheniformis*.

SUMMARY

In this paper, the results on the selection of optimal culture conditions for *Bacillus licheniformis* (strain BCRP) to synthesize thermostable α – amylase were presented. The selection of optimal culture conditions (medium, inoculation ratio, culture temperature, pH, culture time...) was performed experimentally. α - amylase activity was determined by spectrophotometer. Protein concentration was determined by Bradford method. Culture medium with 3% rice powder instead of soluble starch, inoculation ratio of 3%, medium pH of 7.5, culture at 37°C and culture time of 42 hours were selected for culturing *B.licheniformis* (strain BCRP). The culture schema for *B.licheniformis* (strain BCRP) was presented.

Key words: *B.licheniformis*, culture conditions, thermostable α - amylase.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Enzym α - amylase (α .D1,4 – glucan – glucosylhydrolase) (EC: 3.2.1.1) là enzym thuộc nhóm amylase - một nhóm enzym có khả năng thủy phân các liên kết 1,4 - glucoside trong phân tử tinh bột (Đặng Thị Thu và cs, 2004; Whitaker et al., 2003). Đặc biệt khi tác dụng với tinh bột đã hồ hoá, độ nhớt của tinh bột giảm xuống nhanh do vậy tạo thành một lượng lớn các dextrin, một ít đường maltose và glucose. Lợi dụng khả năng này người ta đã sử dụng α - amylase vào nhiều lĩnh vực khác nhau để dịch hoá tinh bột như sản xuất rượu, bia, đường nha, đường glucose, lên men bánh mỳ, làm thức ăn gia súc hoặc giữ hồ vãi trong công nghiệp dệt. Ngoài ra trong y học, α - amylase còn được dùng để làm thuốc chống suy dinh dưỡng và rối loạn tiêu hoá.

Với khả năng ứng dụng rộng rãi như vậy nên nhu cầu về các chế phẩm của enzym này là rất lớn (Đặng Thị Thu, 2004).

Enzym α - amylase có thể được thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau. Tuy nhiên enzym α - amylase thu nhận từ vi sinh vật được ứng dụng rộng rãi. Trong số các enzym này, enzym vi khuẩn thường chịu được nhiệt độ cao, đặc biệt là các chủng *Bacillus licheniformis* (nhiệt độ tối ưu là 90°C) (Ikram et al., 2003; Whitaker et al., 2003). Tính bền nhiệt của α - amylase vi khuẩn là một ưu điểm lớn. Trong nhiều ngành sản xuất, α - amylase vi khuẩn được sử dụng để xử lý nguyên liệu ở các công đoạn phải dùng nhiệt độ cao.

Hiện nay, với các nước có nền công nghiệp phát triển như Nhật, Mỹ, Đan

Mạch, Thụy Sĩ, Anh, Pháp... việc sản xuất và ứng dụng chế phẩm α - amylase ngày càng được thúc đẩy. Còn ở Việt Nam, mặc dù nhu cầu sử dụng enzym α - amylase của các ngành công nghiệp là khá lớn nhưng chế phẩm này chưa sản xuất được ở trong nước mà phải nhập khẩu từ nước ngoài với giá thành cao. Vì vậy yêu cầu đặt ra cho các nhà sản xuất cũng như các nhà nghiên cứu là làm thế nào để sản xuất chế phẩm enzym α - amylase với số lượng lớn, chất lượng đảm bảo và giá thành hạ.

Bài báo này trình bày các kết quả thu được trong việc chọn lựa các điều kiện nuôi cấy *Bac.licheniformis* (chủng BCRP) để tổng hợp α - amylase chịu nhiệt.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vi khuẩn *B.licheniformis* (chủng BCRP) có khả năng sinh tổng hợp cao - amylase chịu nhiệt trong bộ sưu tập giống của Viện Công nghiệp thực phẩm được sử dụng để chọn lựa các điều kiện nuôi cấy tối ưu, rẻ tiền và thu nhận enzym ở quy mô phòng thí nghiệm. Các hoá chất sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật: Pepton, agar, Yeast extract. Các hoá chất sử dụng đều có độ sạch P và PA.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn *B.licheniformis* trong môi trường giữ giống (LBG) được lấy

ra và hoạt hoá trong môi trường LB - Agar ở 37°C trong 24 h, sau đó nhân giống trong môi trường LB chứa 1% tinh bột tan ở 37°C trong 24 h. Sau khi nhân giống vi khuẩn gốc được sử dụng trong các thí nghiệm chọn lựa điều kiện nuôi cấy.

Để chọn lựa điều kiện nuôi cấy tối ưu, phương pháp thực nghiệm (Đặng Thị Thu, 2004) được sử dụng. Khi chọn điều kiện tối ưu cho yếu tố nào thì chỉ thay đổi yếu tố đó, giữ nguyên các yếu tố khác. Sau khi chọn được điều kiện tối ưu thì sử dụng điều kiện đó trong thí nghiệm tiếp theo. Các điều kiện chọn lựa là môi trường thay thế tinh bột tan, pH, nhiệt độ, thời gian nuôi cấy.

Tốc độ sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn được đánh giá theo độ hấp thụ quang học của môi trường nuôi cấy ở $\lambda = 620$ nm bằng quang phổ kế Cintra 10e (CBS, Mỹ).

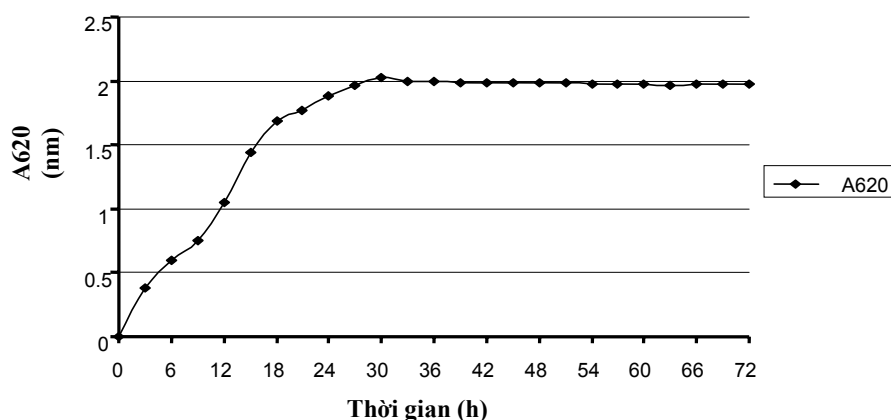
Hoạt tính - amylase được xác định theo phương pháp dừng phản ứng bằng HCl do Tống Kim Thuận và cs., (2003) mô tả.

Nồng độ protein trong dung dịch được xác định theo phương pháp Bradford được Nguyễn Văn Mùi, (2001) mô tả.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chọn lựa điều kiện nuôi cấy tối ưu *B. licheniformis* để sinh tổng hợp cao enzym - amylase

3.1.1. Chọn lựa thời gian nhân giống chủng BCRP



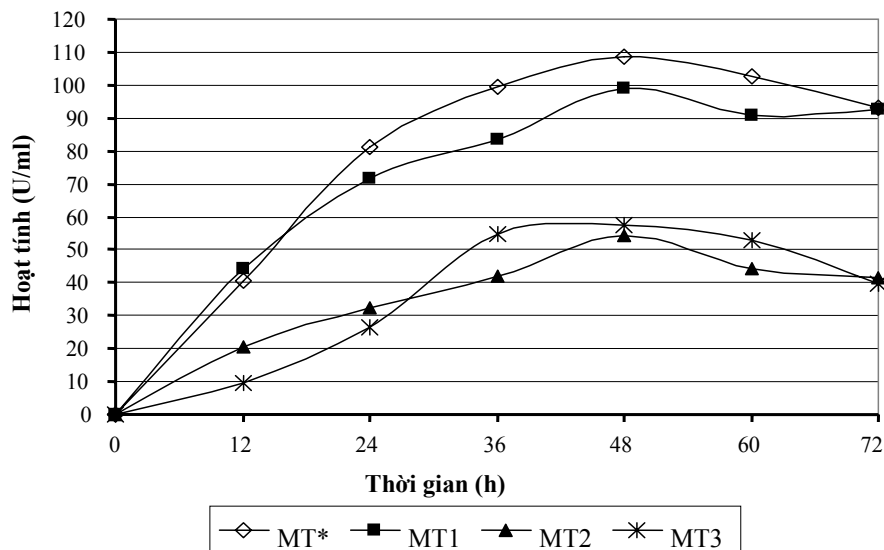
Hình 1. Đường cong động học của chủng BCRP

Đường cong sinh trưởng của chủng *Bac.lichenifotmis* BCRP cho biết giống có chất lượng tốt nhất được lấy ở pha logarit, tương ứng với khoảng thời gian từ 9 - 30 h sau khi bắt đầu nhân giống. Thời gian 24 h được chọn để nhân giống cho nuôi cấy (Hình 1).

3.1.2. Chọn môi trường chứa cơ chất thay thế thích hợp

Để lựa chọn nguồn cơ chất thay thế và đánh giá khả năng sinh tổng hợp α - amylase từ các nguồn tinh bột khác nhau, chủng BCRP được nuôi cấy trên 4 loại môi trường MT* (môi trường chứa tinh bột

tan), MT1 (môi trường chứa 1% bột gạo), MT2 (môi trường chứa 1% tinh bột ngô), MT3 (môi trường chứa 1% tinh bột sắn) với chế độ lắc 200 vòng/phút, ở 37°C và pH = 7. Trong đó, môi trường MT* (chứa 1% tinh bột tan) vẫn là môi trường thích hợp nhất cho sự phát triển và sinh tổng hợp α - amylase của chủng BCRP với hoạt tính α - amylase thể hiện cao nhất sau 48 h nuôi cấy là 108,7 U/ml. Ở môi trường MT1 (chứa 1% bột gạo) hoạt tính enzym thể hiện cũng rất cao (99,1 U/ml sau 48 h), cao hơn hẳn so với hai môi trường còn lại (MT2, MT3) (Hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn cơ chất đến hoạt tính của α - amylase

Mặc dù sự phát triển sinh khối vi khuẩn ở môi trường MT* cao hơn rõ rệt so với môi trường MT1, nhưng lại không có sự khác biệt nhiều về khả năng sinh tổng hợp α - amylase giữa hai môi trường MT* và MT1. Vì vậy môi trường MT1 sẽ được chọn làm môi trường nuôi cấy chủng BCRP để sản xuất enzym α - amylase.

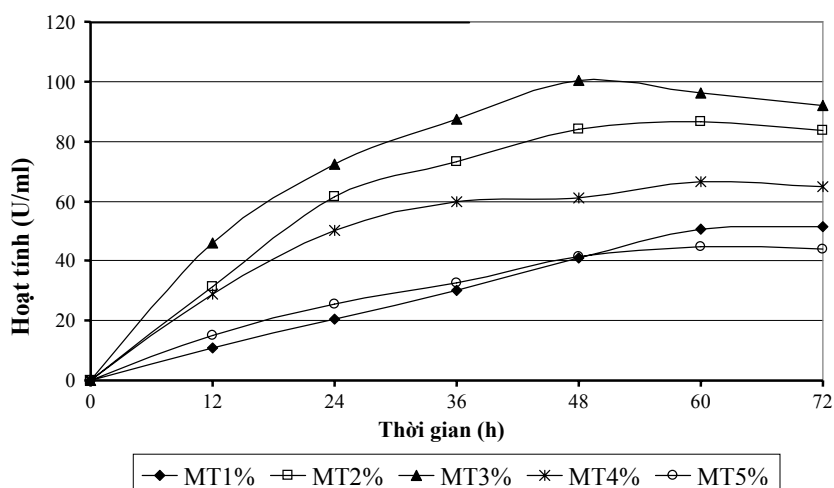
3.1.3. Chọn nồng độ cơ chất thích hợp

Để chọn nồng độ cơ chất, các môi trường MT1 với 5 nồng độ bột gạo khác

nhau là 1%, 2%, 3%, 4% và 5 % được thí nghiệm để nuôi cấy chủng BCRP.

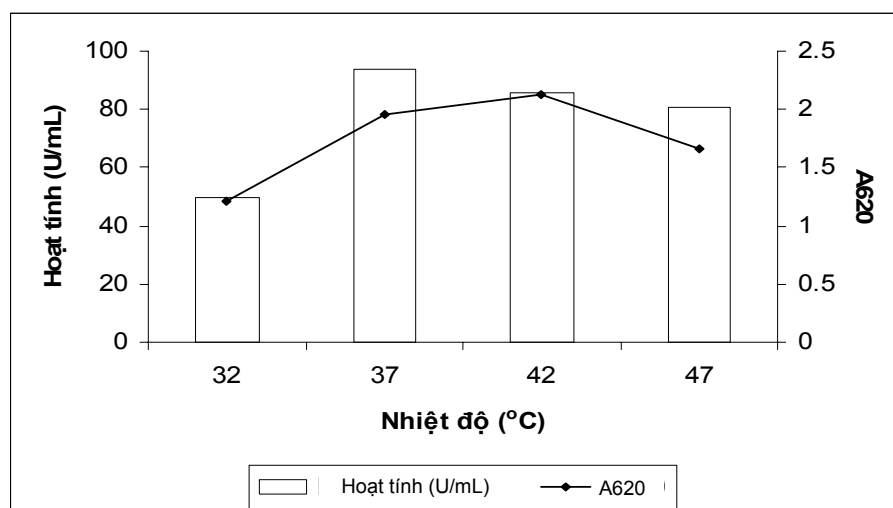
Trên môi trường có hàm lượng bột gạo 2%, vi khuẩn tăng sinh khối mạnh hơn cả nhưng hoạt tính α - amylase lại không cao bằng ở 3% (Hình 3).

Mặc dù ở 3% vi khuẩn không tăng sinh khối mạnh như ở nồng độ 2% nhưng với mục đích là thu nhận enzym α - amylase có hoạt tính cao nên nồng độ tinh bột 3% được chọn để nuôi cấy vi khuẩn.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến hoạt tính của α -amylase

3.1.4. Chọn nhiệt độ nuôi cấy tối ưu



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sự phát triển sinh khối và hoạt tính của α -amylase

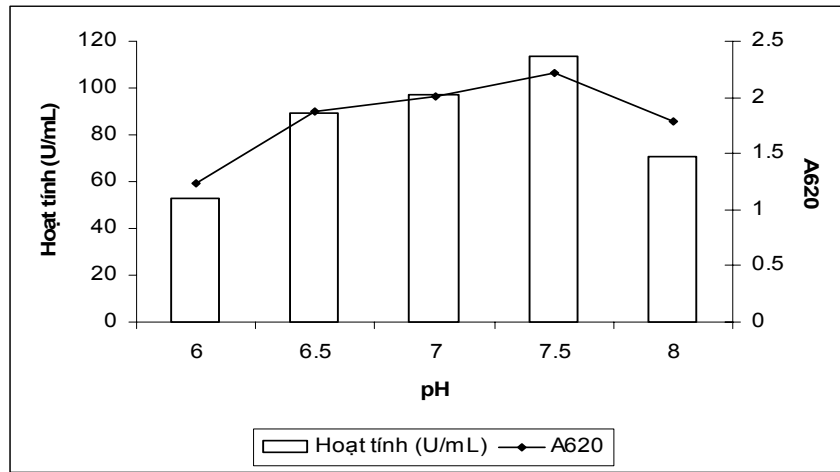
Kết quả được trình bày ở hình 4 cho thấy, cả hoạt tính α -amylase và sinh khối của vi khuẩn đều đạt cao nhất tại thời điểm 48 h nuôi cấy.

Với mục đích là thu enzyme có hoạt tính cao nên chúng tôi lựa chọn nhiệt độ thích hợp cho chủng BCRP sinh tổng hợp α -amylase là 37°C.

3.1.5. Chọn pH môi trường nuôi cấy

Sau khi nuôi cấy 48 h ở pH môi trường trong khoảng pH từ 6,5 - 8,0 vi khuẩn phát triển khá tốt đồng thời hoạt tính của enzyme cũng rất cao (Hình 5). Điều đó cho thấy khoảng pH thích hợp cho chủng BCRP sinh trưởng, phát triển là tương đối rộng. Trong

khoảng này, tại pH = 7,5 cả hoạt tính α - amylase và sinh khối của vi khuẩn đều đạt cao nhất. Còn ở pH = 6, vi khuẩn phát triển kém, hoạt tính của enzym thấp nhất. Trên cơ sở của các kết quả thu được chúng tôi chọn pH môi trường tối thích cho chủng BCRP phát triển và sinh tổng hợp α - amylase là pH = 7,5.

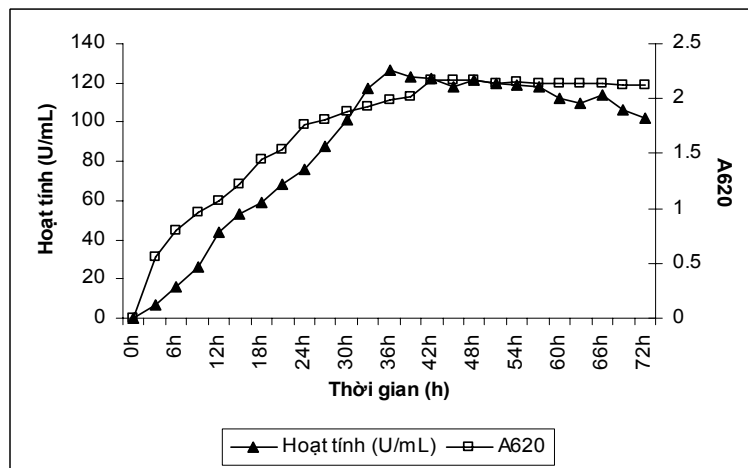


Hình 5. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sự phát triển sinh khối và hoạt tính của α -amylase

3.1.6. Chọn thời gian nuôi cấy

Sau 33 h nuôi cấy, chủng BCRP sinh α - amylase đạt hoạt tính cao nhất (116,9 U/ml). Từ thời điểm này hoạt tính α - amylase giảm chút ít rồi đi vào ổn định. Sự sinh trưởng đạt cực đại ở thời gian 42 h đồng thời ở thời điểm này hoạt

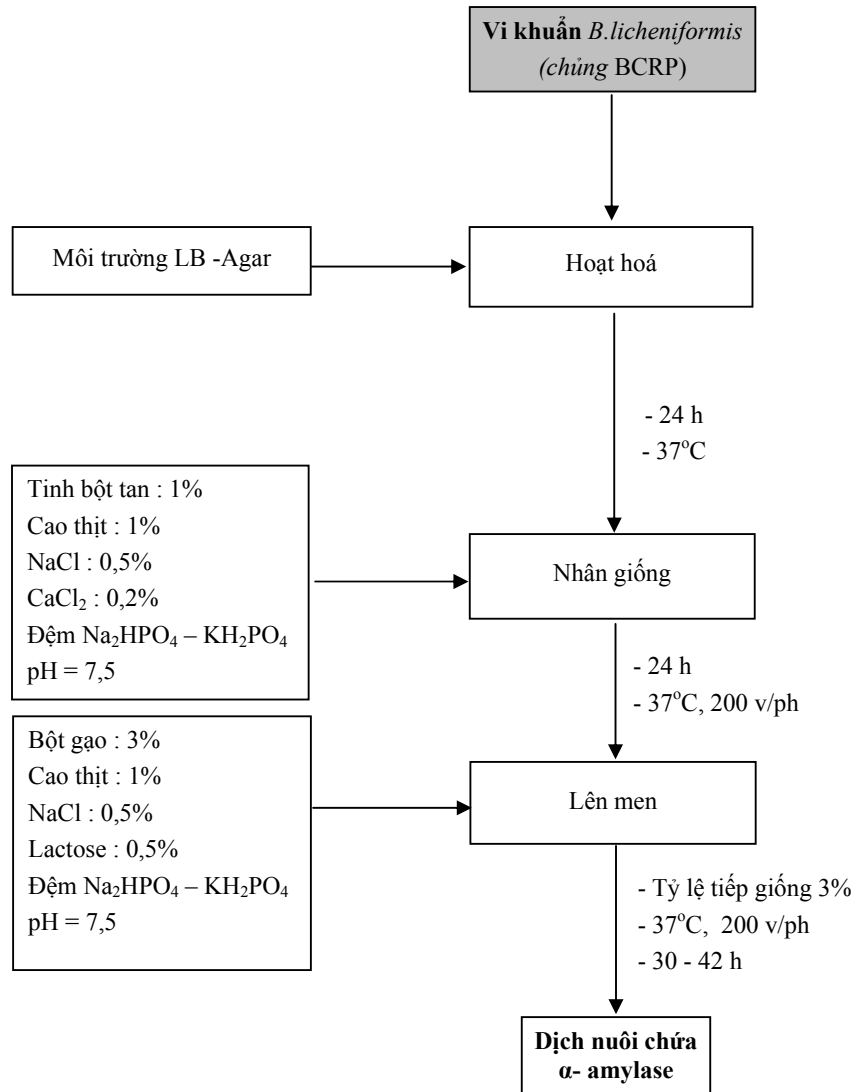
tính của α - amylase vẫn rất cao (122,0 U/ml) (Hình 6). Trên cơ sở này chúng tôi chọn khoảng thời gian thích hợp nhất cho phát triển sinh khối và sinh tổng hợp α - amylase cho chủng BCRP là khoảng thời gian: 30 - 42 giờ kể từ thời điểm bắt đầu nuôi cấy.



Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến phát triển và sinh tổng hợp α - amylase của chủng BCRP

3.2. Quy trình nuôi cấy *B.licheniformis* (chủng BCRP) để sinh tổng hợp enzym α - amylase

Trên cơ sở các kết quả thu được trình bày ở phần 3.1, chúng tôi đề xuất quy trình nuôi *B.licheniformis* (chủng BCRP) (sơ đồ 1).



Sơ đồ 1. Quy trình nuôi *B.licheniformis* (chủng BCRP) để sinh tổng hợp α - amylase

4. KẾT LUẬN

Điều kiện tối ưu cho nuôi vi khuẩn *B.licheniformis*: Thời gian nhân giống 24 h;

môi trường nuôi có bột gạo 3% thay thế tinh bột tan; tỷ lệ tiếp giống 3%; nhiệt độ 37°C; vận tốc lắc 200 V/ph và thời gian nuôi 30 - 42 h.

Quy trình nuôi vi khuẩn *B.licheniformis* (chủng BCRP) để tổng hợp α - amylase đã được đề xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Văn Mùi (2001). *Thực hành hoá sinh học*. Nxb Đại học Quốc Gia, Hà Nội.

Đặng Thị Thu và cs., (2004). *Công nghệ enzym*. Nxb Khoa học Kỹ thuật.

Tống Kim Thuần, Trần Thị Kiều Hương, Trương Nam Hải (2003). *Amylase phân*

giải tinh bột sống của một số chủng vi khuẩn phân lập được ở Việt Nam. Tạp chí Khoa học và công nghệ, tr 14 – 22.

Ikram Haq, Hanad Asharj, Javel Iqbal, M.A. Audeer (2003). *Production of α -amylase by Bacillus licheniformis using economical medium*. Bioresource technology, V 87, p 57-61.

J. Whitaker, Voragen A.G.J & Wong D.W.S., (2003). *Handbook of Food Enzymology*, Marcel Dekker Inc., 1108 p.