

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

TRẦN THỊ ÁI LUYẾN

NGHIÊN CỨU THU NHẬN CHẾ PHẨM AMYLASE
TỪ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* T9

Chuyên ngành : Công nghệ thực phẩm và đồ uống
Mã số : 60.54.02

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ KỸ THUẬT

Đà Nẵng - Năm 2011

Công trình được hoàn thành tại:
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. Trần Thị Xô

Phản biện 1: PGS.TS. Trương Thị Minh Hạnh

Phản biện 2: PGS.TS. Lê Thị Liên Thanh

Luận văn sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận văn tốt nghiệp thạc sĩ kỹ thuật họp tại Đại học Đà Nẵng vào ngày 26 tháng 7 năm 2011

** Có thể tìm luận văn tại:*

- Trung tâm Thông tin - Học liệu Đại học Đà Nẵng
- Trung tâm Học liệu, Đại học Đà Nẵng.

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận văn

Trong những năm gần đây, việc nghiên cứu cải thiện các điều kiện nuôi cấy nhằm thu nhận enzyme có hoạt tính cao và từ đó sử dụng chúng trong sản xuất công nghiệp không còn là mới đặc biệt là enzyme amylase. Song vấn đề đặt ra là giá thành của các chế phẩm này tương đối cao – đây chính là một trong những trở ngại cho việc ứng dụng enzyme rộng rãi trong quá trình sản xuất. Một trong những cách làm giảm giá thành chế phẩm enzyme là thay thế nguồn nguyên liệu đặc trưng trong phòng thí nghiệm bằng các nguồn nguyên liệu tự nhiên rẻ tiền. Và thực tế, chúng đang được sử dụng rộng rãi cho cả quá trình lên men lỏng và rắn không ngoài mục đích này.

Đối với nước ta, các sản phẩm phụ từ nông nghiệp, công nghiệp cũng như từ các quá trình chế biến thủ công rất đa dạng như bột đậu nành, bột sắn thô... Những nguồn nguyên liệu này vốn dĩ rất rẻ và dễ kiếm do đó việc tận dụng chúng để thay thế một lượng tương đương các thành phần dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy sinh enzyme là một điểm nhấn quan trọng nhằm thúc đẩy các ngành công nghiệp sử dụng các chế phẩm enzyme một cách rộng rãi. Tuy nhiên, để các chế phẩm enzyme này khi ứng dụng trong công nghiệp có hiệu quả cao nhất thì việc nghiên cứu xác định các tính chất cơ bản của enzyme trước khi sử dụng chúng là rất cần thiết.

Xuất phát từ những khía cạnh trên, tôi đã chọn đề tài nghiên cứu của mình là “*Nghiên cứu thu nhận chế phẩm amylase từ Bacillus amyloliquefaciens T9*” nhằm tìm ra được điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp amylase cao từ một số nguồn nguyên liệu tự nhiên qua đó thu nhận, tinh chế từng phần và xác định một số đặc tính của chế phẩm enzyme thu được.

2. Mục đích của luận văn

- Thiết lập được quy trình thu nhận chế phẩm amylase trong MTTN ở quy mô phòng thí nghiệm.

- Thử nghiệm khả năng thủy phân tinh bột sắn của chế phẩm enzyme thô.

Để thực hiện mục đích trên, yêu cầu đặt ra là nghiên cứu chọn nguồn nguồn C, N tự nhiên thích hợp, thu nhận chế phẩm enzyme và xác định tính chất của chúng.

3. Nội dung nghiên cứu của luận văn

- Nghiên cứu tìm điều kiện tối ưu cho sự sinh tổng hợp amylase trong MTTN. Từ đó thiết lập quy trình thu nhận chế phẩm amylase từ nguồn nguyên liệu đã được chọn.

- Khảo sát một số đặc tính của các chế phẩm amylase thu được.

- Thử nghiệm khả năng thủy phân tinh bột sắn bởi chế phẩm amylase thu được.

4. Ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn của luận văn

- Mở ra thêm một triển vọng của việc thu nhận enzyme có hoạt lực cao bằng cách sử dụng các sản phẩm phụ, các nguồn nguyên liệu rẻ tiền.

- Giảm chi phí sản xuất enzyme từ đó góp phần đáp ứng được nhu cầu sử dụng chúng trong sản xuất công nghiệp phổ biến hơn.

- Góp phần giải quyết được lượng phế phụ phẩm trong quá trình chế biến công nghiệp, giảm ô nhiễm môi trường

- Giúp ổn định nguồn chế phẩm enzyme trong công nghiệp chế biến tạo đầu ra cho các sản phẩm chế biến có sử dụng enzyme trong quy trình sản xuất.

5. Bố cục của luận văn

Luận văn gồm các chương mục sau:

Mục lục

Mở đầu

Chương 1: Tổng quan tài liệu

Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu.

Chương 3: Kết quả và thảo luận

Kết luận và kiến nghị

Tài liệu tham khảo

Phụ lục

Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về *Bacillus*

1.2. Tổng quan về vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens*

1.3. Tổng quan về enzyme amylase

1.4. Tổng quan về quá trình thu nhận enzyme amylase từ vi sinh vật

1.5. Tổng quan về nguồn phụ phẩm tự nhiên

1.6. Những nghiên cứu trong và ngoài nước

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

- Vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* T9.

- Các nguồn nguyên liệu tự nhiên: bột sắn thô, bột gạo trắng Khang nhân, gạo lứt Khang nhân, bột đậu nành, bột phế liệu tôm, bột cá, tinh bột sắn.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp hoạt hoá giống

- Đánh giá mật độ tế bào vi khuẩn bằng phương pháp đo quang

- Phương pháp xác định hoạt độ amylase bằng phương pháp

Bernfeld

- Phương pháp điện di nhằm xác định phân tử lượng của amylase

- Phương pháp thu nhận chế phẩm enzyme thô

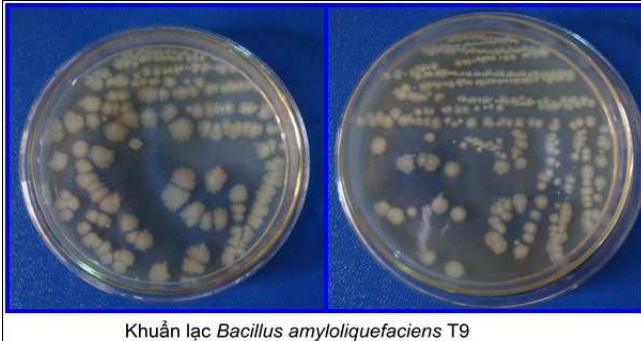
- Phương pháp toán học

Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hoạt hóa giống

Tế bào vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* T9 ban đầu được bảo quản trong glycerol 30% ở điều kiện lạnh đông. Với mục đích hoạt hóa lại chủng vi khuẩn trước khi sử dụng cho nghiên cứu, chúng

tôi tiến hành nuôi cấy ria trên môi trường thạch. Kết quả thu được khuẩn lạc thuần có đặc điểm tròn, có nốt lồi ở giữa, màu trắng hơi đục và có mép răng cưa (hình 3.1). Đặc điểm này giống với mô tả về chủng *Bacillus amyloliquefaciens*.



Hình 3.1. Hình ảnh khuẩn lạc chủng *B. amyloliquefaciens* T9

3.2. Khảo sát ảnh hưởng nguồn carbon (C) và nitơ (N) tự nhiên đến khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào của *B. amyloliquefaciens* T9

Dựa vào hàm lượng N, C trong MTCB và thành phần protein, tinh bột có trong nguyên liệu để xác định hàm lượng nguyên liệu tự nhiên tương đương cần bổ sung vào nhằm thay thế hoàn toàn hàm lượng C, N trong MTCB (Bảng 3.1).

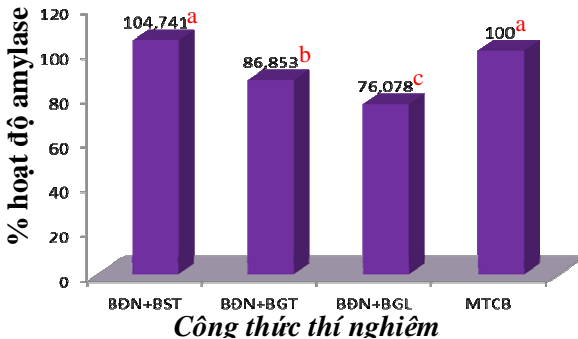
Từ đó, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của sự kết hợp từng nguồn N với các nguồn C khác nhau lên quá trình sinh tổng hợp amylase của chủng vi khuẩn. Hoạt độ amylase của các mẫu thí nghiệm sau nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 40°C, pH = 7,0 trong 24 giờ được xác định theo phương pháp Bernfeld và tính theo % so với mẫu đối chứng là MTCB để xác định hiệu quả của sự kết hợp.

Bảng 3.1. Hàm lượng C, N tự nhiên cần bổ sung vào môi trường nuôi cấy

Số thứ tự	Nguồn N tự nhiên	Hàm lượng (%) cần sử dụng để thay thế hoàn toàn nguồn N trong MTCB (1,3%)	Nguồn C tự nhiên	Hàm lượng (%) cần sử dụng để thay thế hoàn toàn nguồn C trong MTCB (0,75%)
1	Bột đậu nành	3,23	Bột sắn thô	1,65
2	Bột phế liệu tôm	4,64	Bột gạo trắng	1,47
3	Bột cá	2,06	Bột gạo lứt	1,49

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của sự kết hợp này được thể hiện ở hình 3.2 đến hình 3.5

3.2.1. Ảnh hưởng của sự kết hợp bột đậu nành và các nguồn C tự nhiên



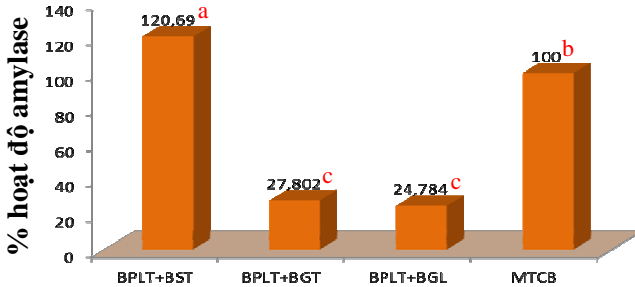
Hình 3.2. Ảnh hưởng của sự thay thế kết hợp bột đậu nành với các nguồn C tự nhiên khác nhau lên khả năng sinh amylase ngoại bào của *B. amyloliquefaciens* T9

(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Kết quả hình 3.2 cho thấy, hoạt độ enzyme cao nhất khi kết hợp bột đậu nành với bột sắn thô. So với mẫu đối chứng, phần trăm hoạt độ đạt được trong thí nghiệm này là 104,741%, tăng 4,741%.

3.2.2. Ảnh hưởng của sự kết hợp bột phế liệu tôm và các nguồn C tự nhiên

Sự kết hợp của bột phế liệu tôm và bột sắn thô là môi trường có sự kích thích rất lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Hoạt độ của enzyme trong môi trường này (120,69%) cao hơn rất nhiều so với hai sự kết hợp còn lại (Hình 3.3).

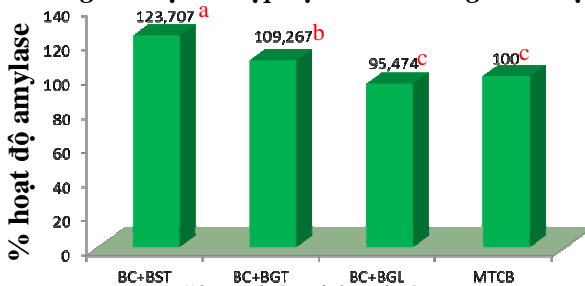


Công thức thí nghiệm

Hình 3.3. Ảnh hưởng của sự thay thế kết hợp bột phế liệu tôm với các nguồn C tự nhiên khác nhau lên khả năng sinh amylase ngoại bào của *B. amyloliquefaciens* T9

(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

3.2.3. Ảnh hưởng của sự kết hợp bột cá và các nguồn C tự nhiên



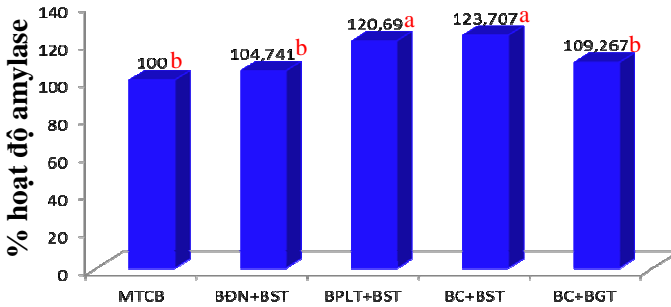
Công thức thí nghiệm

Hình 3.4. Ảnh hưởng của sự thay thế kết hợp bột cá với các nguồn C tự nhiên khác nhau lên khả năng sinh amylase ngoại bào của *B. amyloliquefaciens* T9

(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Bột cá khi kết hợp với các nguồn C khác nhau được sử dụng trong nghiên cứu này đều cho kết quả khả quan. Phần trăm hoạt độ enzyme đạt được cao nhất khi bột cá với bột sắn thô (123,707%)

Từ các kết quả trên, chúng tôi đã lựa chọn được 4 môi trường thay thế để chủng này sinh amylase cao hơn so với MTCB (Hình 3.5)



Công thức thí nghiệm

Hình 3.5. Ảnh hưởng của sự thay thế nguồn C, N tự nhiên lên khả năng sinh amylase ngoại bào của *B. amyloliquefaciens* T9

(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Với kết quả tổng hợp ở hình 3.5 chúng tôi nhận thấy rằng:

- Vi khuẩn có khả năng sinh enzyme tốt nhất trong môi trường có sự kết hợp của bột cá và bột sắn thô (123,707%). Tiếp đến là môi trường chứa bột phế liệu tôm và bột sắn thô. Phần trăm hoạt độ so với đối chứng là 120,69%. Kết quả xử lý ANOVA cho thấy giữa hai môi trường có chứa bột cá, bột sắn thô và môi trường có bột phế liệu tôm, bột sắn thô không có sự sai khác ($p < 0,05$). Do đó, sự kết hợp giữa bột sắn thô và bột phế liệu tôm sẽ là lựa chọn thích hợp nhất cho quá trình sản xuất amylase bởi *B. amyloliquefaciens* T9 ở quy mô sản xuất vì hiệu quả kinh tế mà nó mang lại cũng như mức độ gây ô nhiễm môi trường của nguồn nguyên liệu này.

- Bột sắn thô có tác dụng kích thích tốt nhất đến khả năng sinh tổng hợp amylase bởi chủng vi khuẩn khi phối hợp với các nguồn N khác nhau.

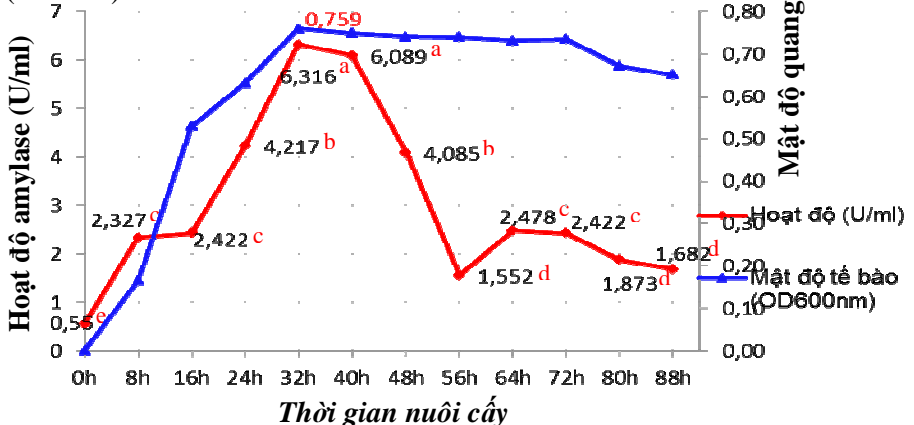
- Bột gạo bao gồm cả bột gạo trắng và gạo lứt đều không phải là nguồn C tự nhiên tốt

Tóm lại, môi trường mà chúng tôi lựa chọn để thực hiện cho các nghiên cứu tiếp theo là môi trường gồm bột phế liệu tằm và bột sắn thô. Môi trường này sẽ gọi là môi trường tự nhiên (MTTN).

3.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp amylase của *B. amyloliquefaciens* T9 trong MTTN

Với mục đích xác định thời điểm sinh enzyme cao nhất trong MTTN, chúng tôi tiến hành nuôi cấy chủng và xác định hoạt độ trong các khoảng thời gian khác nhau. Quá trình sinh tổng hợp amylase từ chủng *Bacillus amyloliquefaciens* T9 đạt cao nhất (6,316U/ml) ở 32 giờ nuôi cấy. Đây cũng là thời điểm mà mật độ tế bào đạt cực đại.

(hình 3.6)

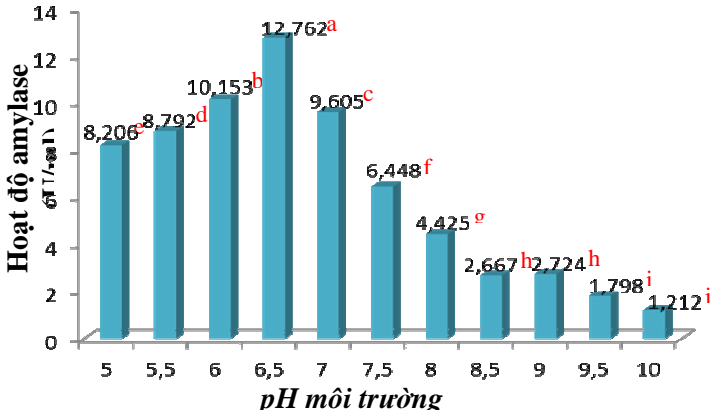


Hình 3.6. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự phát triển vi khuẩn và hoạt tính của amylase

(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

3.4. Ảnh hưởng của pH ban đầu lên khả năng sinh tổng hợp amylase bởi *B. amyloliquefaciens* T9

Thực hiện thay đổi pH của MTTN và tiến hành nuôi cấy theo chế độ trên (nhiệt độ 40⁰C, thời gian 32 giờ) để khảo sát ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng sinh tổng hợp amylase của *B. amyloliquefaciens* T9.



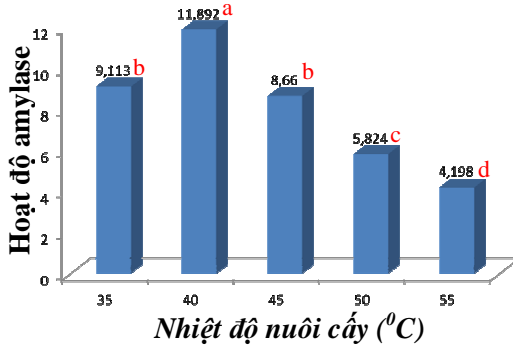
Hình 3.7. Ảnh hưởng của pH ban đầu lên khả năng sinh tổng hợp amylase bởi *B. amyloliquefaciens* T9 (Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Kết quả hình 3.4 cho thấy chủng *B. amyloliquefaciens* T9 có khả năng sinh amylase tốt trong khoảng pH ban đầu từ 5,5 – 7 và đạt cực đại tại pH 6,5 (12,762U/ml). Trong khoảng pH kiềm tính thì hoạt độ enzyme lại giảm theo chiều tăng của pH.

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh tổng hợp amylase bởi *B. amyloliquefaciens* T9

Tiến hành nuôi cấy chủng vi khuẩn ở các mức nhiệt độ khác nhau. Hoạt độ amylase được xác định bằng phương pháp Bernfeld (hình 3.8).

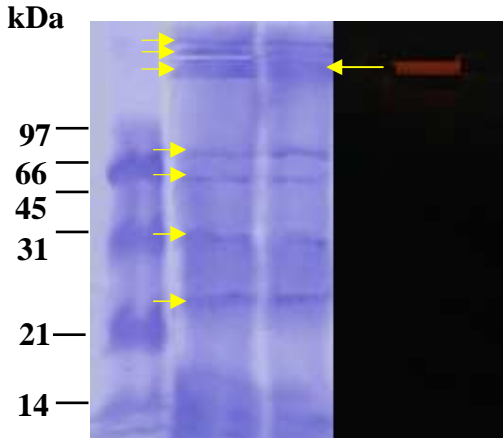
Quá trình sinh tổng hợp amylase của *B. amyloliquefaciens* T9 xảy ra cực đại ở nhiệt độ 40⁰C (11,892U/ml) (Hình 3.8).



Hình 3.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên quá trình sinh tổng hợp amylase bởi *B. amyloliquefaciens* T9 (Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy rằng, chủng *B. amyloliquefaciens* T9 có thể sinh amylase khá tốt trong khoảng nhiệt độ từ 35 – 45°C. Sau 45°C sự sinh tổng hợp enzyme bị giảm.

3.6. Nghiên cứu quá trình thu nhận chế phẩm enzyme thô



Hình 3.9: Khối lượng phân tử protein qua phân tích điện di SDS-PAGE.

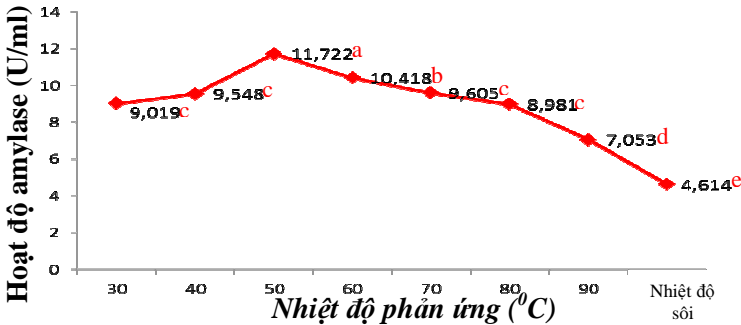
MS: marker (14,4-97,4 kDa); A□ và A□ là mẫu enzyme tủa

Chế phẩm enzyme thô thu được được kết tủa bằng aceton và xác định phân tử lượng của amylase bằng phương pháp điện di biến tính và không biến tính (hình 3.9).

3.7. Khảo sát một số tính chất của chế phẩm amylase thu nhận từ *Bacillus amyloliquefaciens* T9

3.7.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và độ bền nhiệt của chế phẩm enzyme thô

Thực hiện phản ứng ủ hỗn hợp enzyme và cơ chất ở các mức nhiệt độ và thời gian khác nhau. Kết quả thu nhận được trình bày ở hình hình 3.10 và bảng 3.6



Hình 3.10. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hoạt độ amylase từ *B. amyloliquefaciens* T9

(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ và độ bền enzyme cho thấy:

- Khoảng nhiệt độ thích hợp của chế phẩm enzyme hoạt động là 30-80°C, trong đó 50°C là nhiệt độ tối thích cho enzyme hoạt động (hình 3.10)

- Chế phẩm enzyme này bền ở 40 và 50°C sau 120 phút ủ (bảng 3.6)

Bảng 3.6. Độ bền nhiệt của chế phẩm amylase từ *B. amyloliquefaciens* T9 ở pH 6

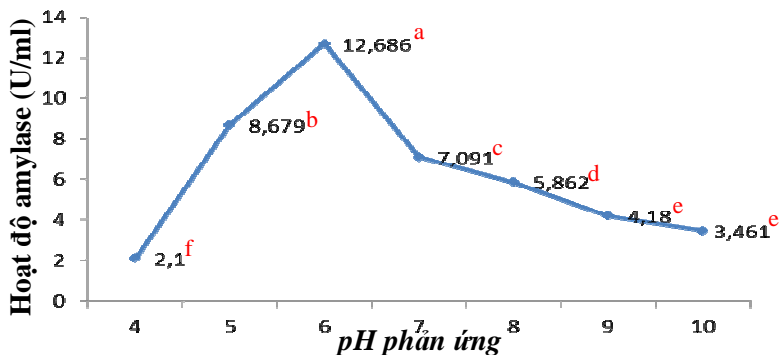
Thời gian ủ (phút)	Phần trăm hoạt độ còn lại ở các mức nhiệt độ ủ (%)				
	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C
0	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
10	98,6 ^{ab}	98,86 ^{ab}	60,22 ^b	38,48 ^b	35,2 ^b
20	97,02 ^{abc}	98,49 ^{ab}	35,38 ^c	30,78 ^c	32,88 ^c
30	97,71 ^{abc}	96,03 ^{cd}	34,46 ^c	29,28 ^c	34,58 ^b
40	97,19 ^{abc}	97,54 ^{bc}	30,35 ^{de}	32,96 ^c	20,38 ^d
50	97,02 ^{abc}	94,52 ^{de}	32,48 ^{cd}	17,57 ^{de}	19,77 ^d
60	96,66 ^{bc}	94,14 ^{def}	32,48 ^{cd}	21,09 ^d	20,07 ^d
70	96,66 ^{bc}	93,19 ^{efg}	28,82 ^{de}	18,07 ^{de}	18,99 ^{de}
80	95,96 ^{bc}	91,68 ^g	26,53 ^e	18,07 ^{de}	17,61 ^{ef}
90	96,31 ^{bc}	92,06 ^{fg}	18,91 ^{fg}	20,08 ^{de}	16,68 ^{fg}
100	95,44 ^c	91,3 ^g	19,53 ^{fg}	17,91 ^{de}	16,06 ^g
110	92,27 ^d	86,77 ^h	22,42 ^f	15,57 ^e	14,37 ^h
120	78,92 ^e	85,82 ^h	16,02 ^g	15,4 ^c	12,05 ⁱ

(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê và sự sai khác thể hiện được xử lý theo cột)

3.7.2. Ảnh hưởng của pH và độ bền pH của chế phẩm enzyme thô

- Hoạt độ của amylase đạt được rất thấp ở pH 4.0 (2.1U/ml/phút) sau đó tăng mạnh và đạt cực đại tại pH 6.0 (12.686 U/ml/phút). Khoảng pH thích hợp cho hoạt động của enzyme nằm trong vùng acid yếu và trung tính (pH=5-7).

- Chế phẩm enzyme thô rất bền sau 120 phút ở 3 mức pH được khảo sát (Bảng 3.7), trong đó độ bền của enzyme ở pH 5 và pH 7 ổn định hơn so với pH 6.



Hình 3.11. Ảnh hưởng của pH môi trường phản ứng đến hoạt độ amylase từ *B. amyloliquefaciens* T9
(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Bảng 3.7. Độ bền pH của chế phẩm amylase từ *B. amyloliquefaciens* T9 ở 50°C

Thời gian ủ (phút)	Phần trăm hoạt độ còn lại ở các mức pH (%)		
	5	6	7
0	100 ^a	100 ^a	100 ^a
10	99.1 ^{ab}	98.43 ^{ab}	98.02 ^{ab}
20	97.06 ^{abc}	96.46 ^b	95.26 ^{ab}
30	96.15 ^{abc}	93.11 ^c	96.04 ^{ab}
40	98.87 ^{abc}	92.71 ^{cd}	96.64 ^{bc}
50	99.1 ^{ab}	90.16 ^{de}	95.44 ^{bcd}
60	95.69 ^{bcd}	92.91 ^{cd}	96.24 ^{bc}
70	97.51 ^{abc}	92.71 ^{cd}	95.64 ^{bcd}
80	94.57 ^{cd}	89.37 ^e	94.46 ^{bcd}
90	94.57 ^{cd}	87.4 ^{ef}	92.28 ^d
100	95.47 ^{bcd}	85.04 ^{fg}	92.68 ^{cd}
110	91.84 ^{de}	86.03 ^{fg}	84.76 ^e
120	88.89 ^e	83.66 ^g	83.17 ^e

(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) và sự sai khác thể hiện được xử lý theo cột)

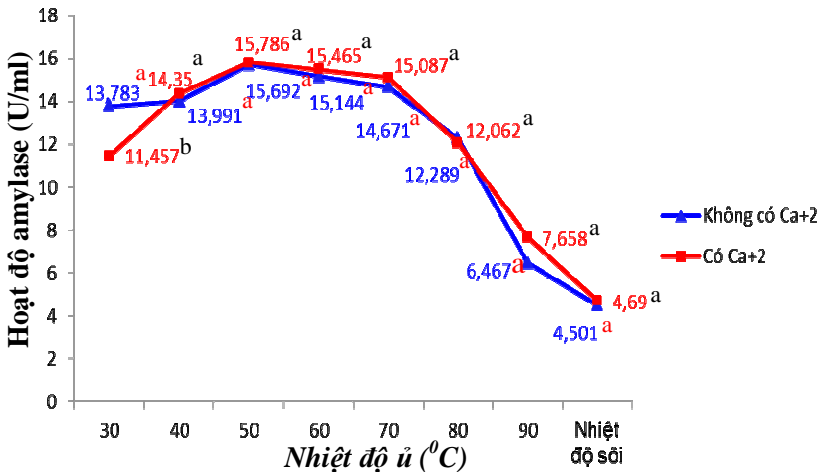
3.7.3. Ảnh hưởng của ion Ca^{2+} đến hoạt độ và độ bền nhiệt của chế phẩm enzyme thô

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của ion Ca^{2+} đến hoạt độ và độ bền nhiệt của chế phẩm enzyme thô cho thấy rằng:

- Hoạt độ của enzyme trong đa số trường hợp với mẫu có bổ sung Ca^{2+} và không bổ sung Ca^{2+} có giá trị xấp xỉ nhau. Ở một số mức nhiệt độ thì mẫu có bổ sung Ca^{2+} cho hoạt độ cao hơn nhưng không đáng kể, một số trường hợp khác thì hoạt độ của mẫu không có Ca^{2+} lại cho giá trị cao hơn.

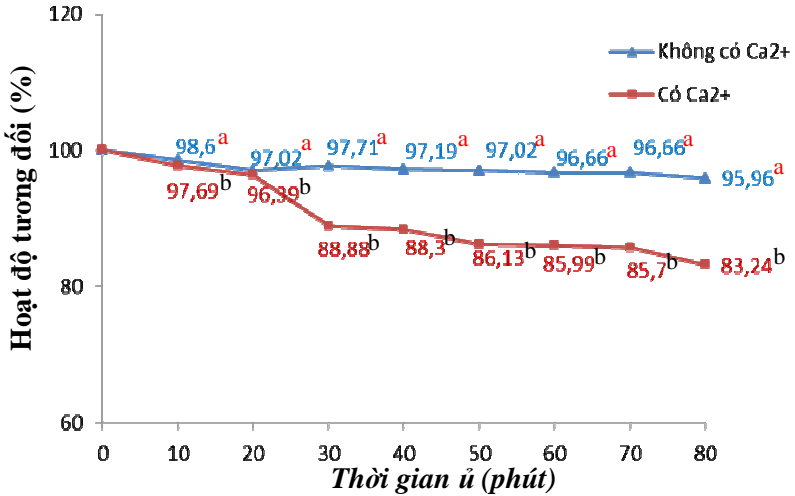
- Ion Ca^{2+} không có tác dụng làm tăng độ bền nhiệt của enzyme theo các khoảng thời gian ủ khác nhau ở các mức nhiệt độ khác nhau.

Qua đó chúng tôi nhận thấy rằng, ion Ca^{2+} hầu như không có tác động rõ rệt đến việc làm tăng độ hoạt độ cũng như độ bền nhiệt của enzyme amylase từ chủng *Bacillus amyloliquefaciens* T9 được nuôi cấy trong MTTN (hình 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 và hình 3.17)

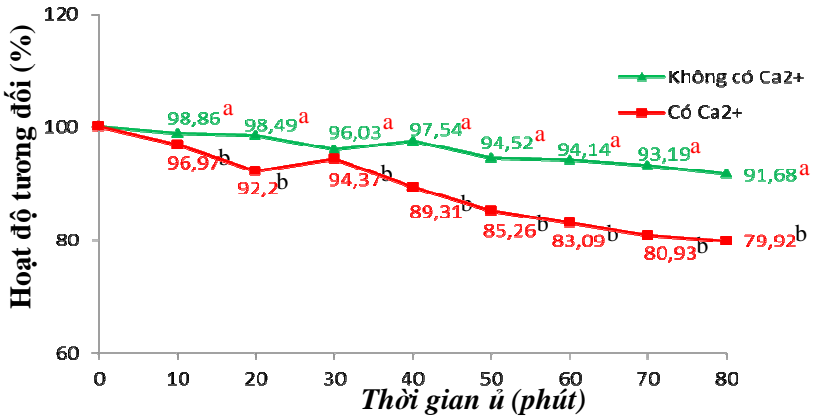


Hình 3.12. Ảnh hưởng của ion Ca^{2+} đến hoạt độ amylase từ *B. amyloliquefaciens* T9 ở các nhiệt độ khác nhau

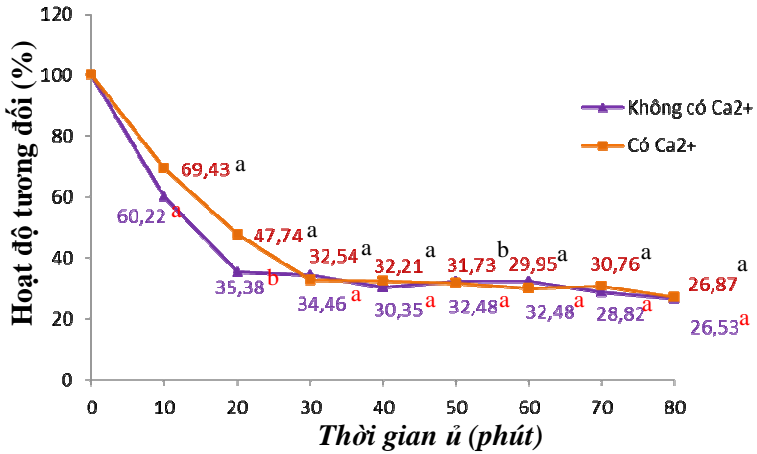
(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))



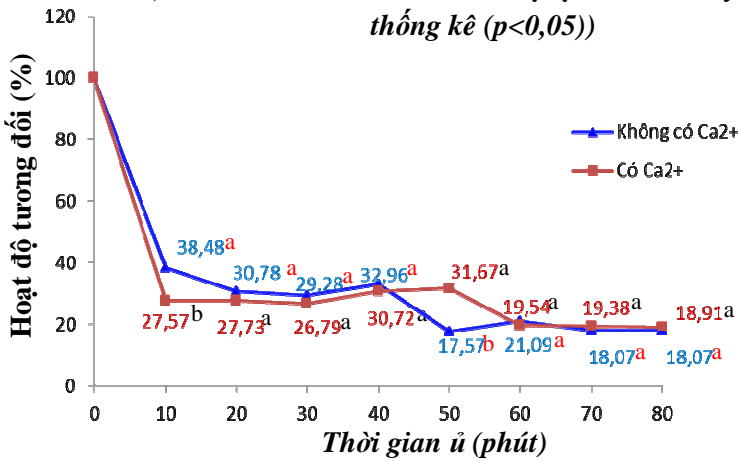
Hình 3.13. Độ bền nhiệt của chế phẩm amylase ở 40⁰C
(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê
($p < 0,05$))



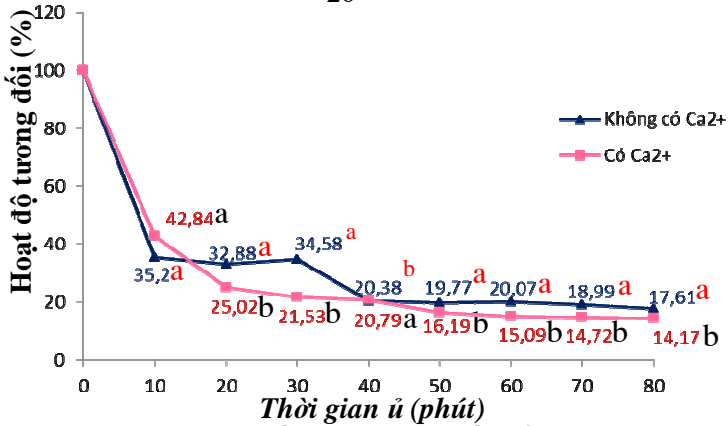
Hình 3.14. Độ bền nhiệt của chế phẩm amylase ở 50⁰C
(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa
thống kê ($p < 0,05$))



Hình 3.15. Độ bền nhiệt của chế phẩm amylase ở 60°C
(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))



Hình 3.16. Độ bền nhiệt của chế phẩm amylase ở 70°C
(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))



Hình 3.17. Độ bền nhiệt của chế phẩm amylase ở 80°C

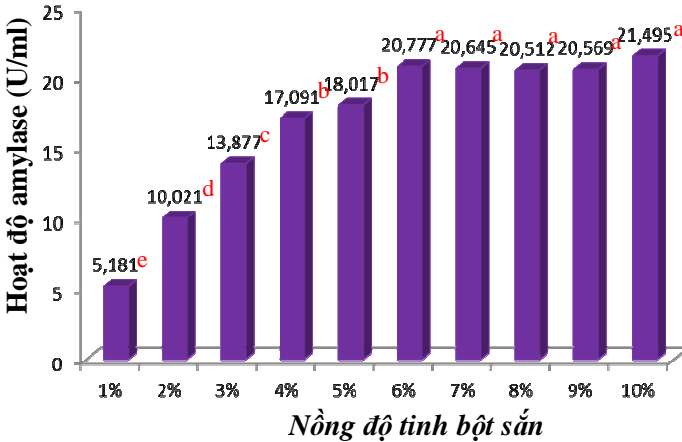
(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

3.8. Thử nghiệm khả năng thủy phân tinh bột sắn của chế phẩm amylase từ *Bacillus amyloliquefaciens* T9

3.8.1. Ảnh hưởng của nồng độ tinh bột sắn đến hoạt động thủy phân của chế phẩm amylase từ *B.amyloliquefaciens* T9

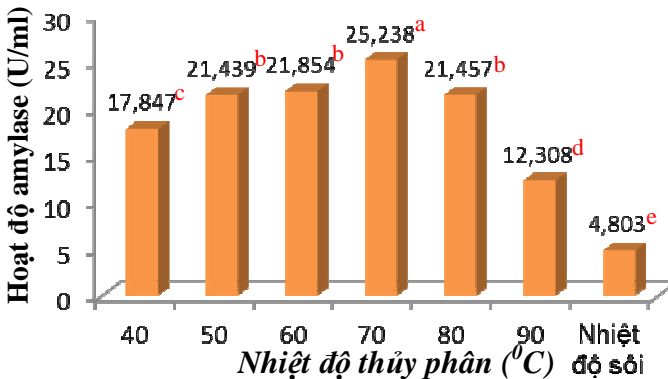
Tiến hành bổ sung một lượng cố định chế phẩm enzyme vào dung dịch tinh bột sắn với nồng độ khác nhau. Kết quả thủy phân tinh bột sắn của amylase từ *Bacillus amyloliquefaciens* T9 được thể hiện ở hình 3.18

Hoạt động xúc tác quá trình thủy phân của enzyme tăng nhanh khi tăng nồng độ tinh bột sắn từ 1% đến 6%. Sau nồng độ 6%, hoạt độ enzyme có xu hướng tăng nhẹ và đạt cao nhất khi nồng độ tinh bột sắn lớn nhất là 10% (21,495 U/ml). Tuy nhiên, kết quả xử lý thống kê cho thấy ở các nồng độ cơ chất 6%, 7%, 8%, 9% và 10% đều không có sự sai khác. Do đó, với cùng một thể tích enzyme và thể tích dung dịch tinh bột sắn sử dụng chúng tôi nhận thấy rằng nồng độ tinh bột sắn phù hợp là 6%.



Hình 3.18. Ảnh hưởng của nồng độ tinh bột sắn đến hoạt động thủy phân của chế phẩm amylase
(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

3.8.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân tinh bột sắn bởi chế phẩm amylase từ *Bacillus amyloliquefaciens* T9

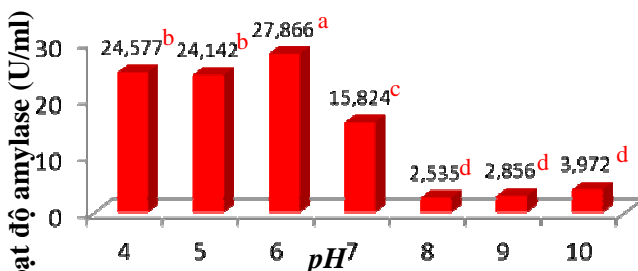


Hình 3.19. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động thủy phân tinh bột sắn của chế phẩm amylase
(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Quá trình thủy phân tinh bột sắn bởi enzyme amylase của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* T9 xảy ra mạnh ở trong khoảng nhiệt độ từ 50 đến 80⁰C (hình 3.19). Hoạt độ xúc tác của enzyme đạt cao nhất tại 70⁰C (25,238U/ml) và khi nhiệt độ phản ứng tăng cao, hoạt độ xúc tác của enzyme giảm hẳn.

3.8.3. Ảnh hưởng của pH đến khả năng thủy phân tinh bột sắn bởi chế phẩm enzyme thô

Tiến hành điều chỉnh pH của dung dịch tinh bột sắn sau đó bổ sung enzyme để khảo sát ảnh hưởng của pH cơ chất đến hoạt độ amylase. Kết quả cho thấy khả năng xúc tác quá trình thủy phân của amylase trên nền cơ chất là tinh bột sắn đạt giá trị cao nhất ở pH 6 (27,866U/ml). Với pH 4, 5 thì sự thủy phân cũng cho hiệu quả cao (hình 3.20).

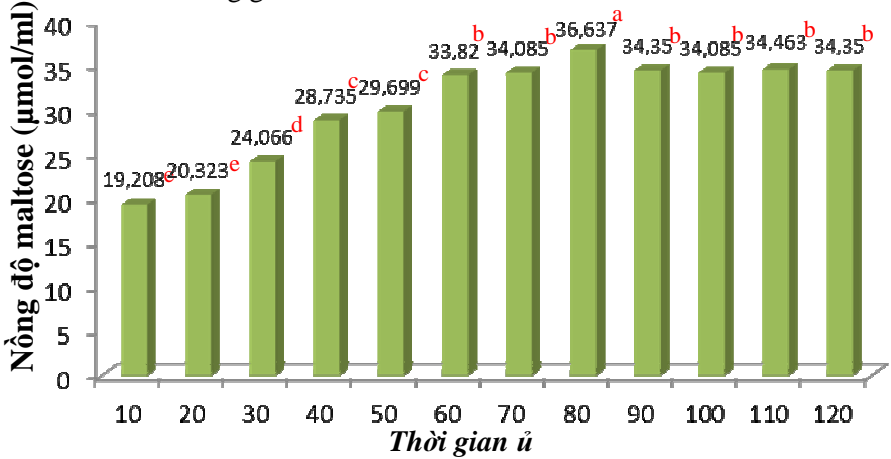


Hình 3.20. Ảnh hưởng của pH đến hoạt động thủy phân tinh bột sắn của chế phẩm amylase (Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

3.8.4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân tinh bột sắn đến hoạt độ của amylase từ *Bacillus amyloliquefaciens* T9

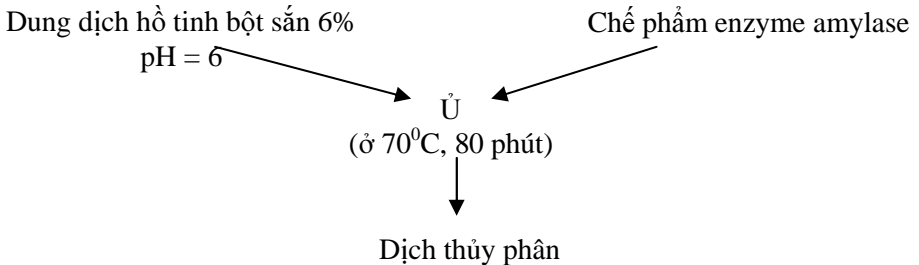
Qua đồ thị hình 3.21 cho thấy, khi thời gian thủy phân càng tăng thì hoạt động thủy phân của chế phẩm enzyme thô của *Bacillus amyloliquefaciens* T9 càng tăng và theo đó sản phẩm tạo ra càng

nhiều. Lượng đường khử tạo ra đạt cực đại sau 80 phút ủ (36,637 μmol maltose) và càng về sau thì lượng đường tạo thành không tăng nữa mà có xu hướng giảm



Hình 3.21. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân tinh bột sắn đến hoạt độ của amylase từ *Bacillus amyloliquefaciens* T9 (Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Từ kết quả thu được chúng tôi đề xuất quy trình thủy phân tinh bột sắn ở quy mô phòng thí nghiệm như sau:



Hình 3.1. Quy trình thủy phân tinh bột sắn bởi amylase từ *Bacillus amyloliquefaciens* T9

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Từ các kết quả đạt được trong nghiên cứu này, chúng tôi đi đến một số kết luận như sau:

1. Đã xác định được nguồn nguyên liệu tự nhiên thích hợp cho chủng *B. amyloliquefaciens* T9 sinh tổng hợp amylase ngoại bào cao và có hiệu quả kinh tế bao gồm bột phế liệu tằm và bột sắn thô.

2. Đã xác định được thời điểm thu nhận enzyme đạt cực đại và các điều kiện nuôi cấy thích hợp: thời gian nuôi cấy là 32 giờ, $t_{opt}=40^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}_{opt}=6,5$.

3. Đã xác định được khối lượng phân tử của amylase từ *Bacillus amyloliquefaciens* T9 là trên 100kDa.

4. Xác định được một số tính chất của chế phẩm enzyme amylase thu nhận được khi nuôi cấy trong MTTN như sau:

- Khoảng nhiệt độ thích hợp là $40-70^{\circ}\text{C}$ và $t_{opt}=50^{\circ}\text{C}$;
- Khoảng pH thích hợp là: 5-7 và $\text{pH}_{opt} = 6,0$;
- Enzyme này bền ở hai mức nhiệt độ là 40, 50°C và ổn định sau 120 phút ủ;
- Độ bền pH của chế phẩm enzyme từ 6-7 trong 120 phút ủ;
- Ion Ca^{2+} bổ sung vào gây ảnh hưởng không đáng kể đến hoạt độ và độ bền nhiệt của enzyme amylase thu được.

5. Đã xác định được các thông số tối ưu cho quá trình thủy phân tinh bột sắn bằng amylase thu được từ *B. amyloliquefaciens* T9 khi nuôi cấy trong MTTN ở quy mô phòng thí nghiệm:

- Nồng độ tinh bột sắn thích hợp nhất là 6%;
- Nhiệt độ thủy phân 70°C ;
- pH dung dịch tinh bột sắn là 6,0;
- Thời gian thủy phân là 80 phút.

2. Kiến nghị

Những kiến nghị về việc tiếp tục nghiên cứu phát triển đề tài như sau:

1. Nghiên cứu lên men sản xuất enzyme với quy mô lớn;
2. Nghiên cứu tinh sạch chế phẩm enzyme để thu được enzyme tinh khiết hơn;
3. Nghiên cứu tiếp tục và ứng dụng enzyme amylase vào quá trình thủy phân tinh bột sắn để có thể phục vụ cho ngành công nghiệp các chế phẩm enzyme thu được vào chế biến thực phẩm.