

KHẢO SÁT ĐỘNG HỌC CỦA ENZYME ALPHA-AMYLASE VÀ GLUCOAMYLASE THỦY PHÂN HÓA CHẤT CHUẨN DÙNG LÀM CƠ CHẤT

TRẦN NGỌC ĐIẾP*

Tóm tắt

Nghiên cứu khảo sát các yếu tố (nhiệt độ, pH và nồng độ cơ chất) ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme alpha-amylase và glucoamylase trên hóa chất dextrin chuẩn dùng làm cơ chất được tiến hành tại phòng thí nghiệm Hóa - Công nghệ thực phẩm của Trường Đại học Cửu Long năm 2020. Kết quả cho thấy, nhiệt độ 87°C và pH 6,5 là nhiệt độ và pH tối ưu cho enzyme alpha-amylase hoạt động trên hóa chất dextrin dùng làm cơ chất, giá trị V_{max} và K_m của enzyme alpha-amylase ở nồng độ 0,06% trên cơ chất dextrin là $8,8751 \pm 1,3893$ và $21,8978 \pm 8,1290$ (%). Nhiệt độ 59°C và pH 4,3 là nhiệt độ và pH tối ưu cho enzyme glucoamylase hoạt động trên hóa chất maltose chuẩn dùng làm cơ chất, V_{max} và K_m của enzyme glucoamylase ở nồng độ 0,04% trên cơ chất maltose là $85,9671 \pm 23,6759$ và $58,6989 \pm 26,0868$ (%).

Từ khóa: alpha-amylase, glucoamylase, dextrin, maltose.

Abstract

The study was conducted to investigate the effect of factors (temperature, pH and substrate concentration) to the activities of alpha-amylase and glucoamylase enzymes on standard chemicals used as substrates at the Chemistry – Food technology laboratory of Cuu Long University in 2020. The results showed that the optimal temperature and pH at which alpha-amylase enzyme acted on the standard substance (dextrin) are 87°C and 6.5, respectively V_{max} and K_m values of 0.06% alpha-amylase enzyme on dextrin substrate are: $V_{max} = 8.8751 \pm 1.3893$, $K_m = 21.8978 \pm 8.1290$ (%). Meanwhile, the temperature of 59°C and pH of 4.3 were recorded as the optimal conditions for hydrolytic activity of glucoamylase enzyme on maltose substrate (standard substrate); V_{max} and K_m values of 0.04% glucoamylase enzyme on maltose substrate respectively were: $V_{max} = 85.9671 \pm 23.6759$, $K_m = 58.6989 \pm 26.0868$ (%).

Keywords: alpha-amylase, glucoamylase, dextrin, maltose.

* Viện Công nghệ sinh học - Thực phẩm Chất lượng cao, Trường Đại học Cửu Long
Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Ngọc Điệp (Email: tranngocdiep@mku.edu.vn)

1. Mở đầu

Enzyme là chất xúc tác sinh học có tác dụng làm tăng tốc độ của phản ứng. Chúng đặc trưng cho một loại phản ứng và một, hoặc một số lượng nhỏ các chất phản ứng có liên quan chặt chẽ (Briggs and Haldane, 1925). Động học enzyme là nghiên cứu tốc độ phản ứng của enzyme và các điều kiện ảnh hưởng đến chúng. Mô hình Michaelis-Menten là một trong những cách tiếp cận đơn giản nhất và nổi tiếng nhất đối với động học enzyme (Hill, 1970). Amylase là enzyme đầu tiên được phát hiện và phân lập bởi Anselme Payen vào năm 1833 (Michaelis and Menten, 1913). Tất cả các amylase là hydrolase glycoside và hoạt động trên các liên kết α -1,4-glycosid. Amylase là một enzyme xúc tác sự thủy phân của tinh bột thành đường mà tinh bột là nguồn dự trữ chính của nhiều cây trồng quan trọng như gạo, bắp, khoai mì và khoai tây (Miller, 1959),... Trong những năm qua, sự thủy phân tinh bột đã có sự chuyển dịch từ phương pháp hóa học đến phương pháp sinh học như sử dụng enzyme chuyển hóa tinh bột trong sản xuất maltodextrin, tinh bột biến tính, dịch đường glucose và fructose. Chuyển hóa tinh bột bằng enzyme cũng được sử dụng trong các ứng dụng công nghiệp khác mà trong đó amylase là một trong những enzyme chủ yếu, thủy phân tinh bột thành các phân tử polyme bao gồm các đơn vị glucose. Amylase có ở người, động vật, thực vật và một số vi khuẩn. Amylase có nguồn gốc khác nhau sẽ có các điều kiện hoạt động tối ưu khác nhau (Silverman, 2002).

Trong nghiên cứu này, động học phản ứng enzyme alpha-amylase và glucoamylase (có nguồn gốc từ vi khuẩn chịu nhiệt) gồm các yếu tố như nhiệt độ, pH và nồng độ enzyme trên cơ chất chuẩn được phân tích làm cơ sở

cho việc sử dụng các enzyme này trên các nguồn cơ chất chứa tinh bột khác. Nghiên cứu động học enzyme thể hiện được vai trò quan trọng của lý luận và thực tiễn. Khi lựa chọn các đơn vị hoạt động enzyme, cần phải hiểu rõ những điều kiện tốt nhất đối với hoạt động của enzyme, cũng như các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của chúng nhằm sử dụng enzyme đạt hiệu quả cao.

2. Phương pháp

2.1. Thí nghiệm

- Đối với enzyme alpha-amylase, sử dụng cơ chất chuẩn là dextrin. Mẫu gồm 2gam dextrin trong 200gam nước, bổ sung ion calci với nồng độ 70ppm (0,0385gam calci chlorua). Mẫu được đem chuẩn pH với các mức pH khảo sát, nâng nhiệt độ đến các mức khảo sát. Sau đó, bổ sung 40 micro lít enzyme alpha-amylase (nồng độ 0,02%), thời gian thủy phân là 20 phút. Sau khi thủy phân, mẫu được làm nguội nhanh trong nước lạnh. Tiến hành xác định hàm lượng đường khử.

- Đối với enzyme glucoamylase, cơ chất chuẩn được sử dụng là maltose. Mẫu gồm 0,4 gam maltose trong 100 gam nước, mẫu được đem chuẩn pH với các mức pH khảo sát, nâng nhiệt độ đến các mức khảo sát. Sau đó, bổ sung 20 micro lít enzyme glucoamylase (nồng độ 0,02%), thời gian thủy phân là 30 phút. Sau khi thủy phân, mẫu được nâng nhiệt độ lên 85°C trong 5 phút để bất hoạt enzyme. Tiến hành xác định hàm lượng đường khử.

2.2. Hóa chất sử dụng

- Dextrin: dextrin ($C_6H_{10}O_5$)_n lọ 500g của công ty Xilong, Trung Quốc.

- Maltose: maltose monohydrate ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$) lọ 250g của công ty Duchefa, Hà Lan.

2.3. Phân tích chỉ tiêu

Hàm lượng đường khử được xác định bằng phương pháp Bertrand (Trần Nguyễn An Sa, 2018).

2.4. Phần mềm SAS

SAS là từ viết tắt của *Statistical Analysis System* (Hệ thống phân tích thống kê). Nó thường được sử dụng cho các phân tích nâng cao. Trong bài viết này sử dụng SAS/STAT - SAS STATISTIC 9.4 phần mềm phân tích thống kê để có kết quả.

2.5 Xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Excel và Statgraphics. Phân tích phương sai ANOVA cho sự khác biệt giữa các trung bình nghiệm thức với mức ý nghĩa 5% (Nguyễn Quốc Thái, 2019).

3. Kết quả và thảo luận

Theo lý thuyết về các yếu tố ảnh hưởng

đến động học enzyme, nhiệt độ, pH và nồng độ cơ chất là 3 nhân tố quan trọng ảnh hưởng lớn đến quá trình thủy phân.

3.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và nồng độ cơ chất đến quá trình thủy phân của enzyme alpha-amylase trên cơ chất chuẩn (dextrin)

- Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH

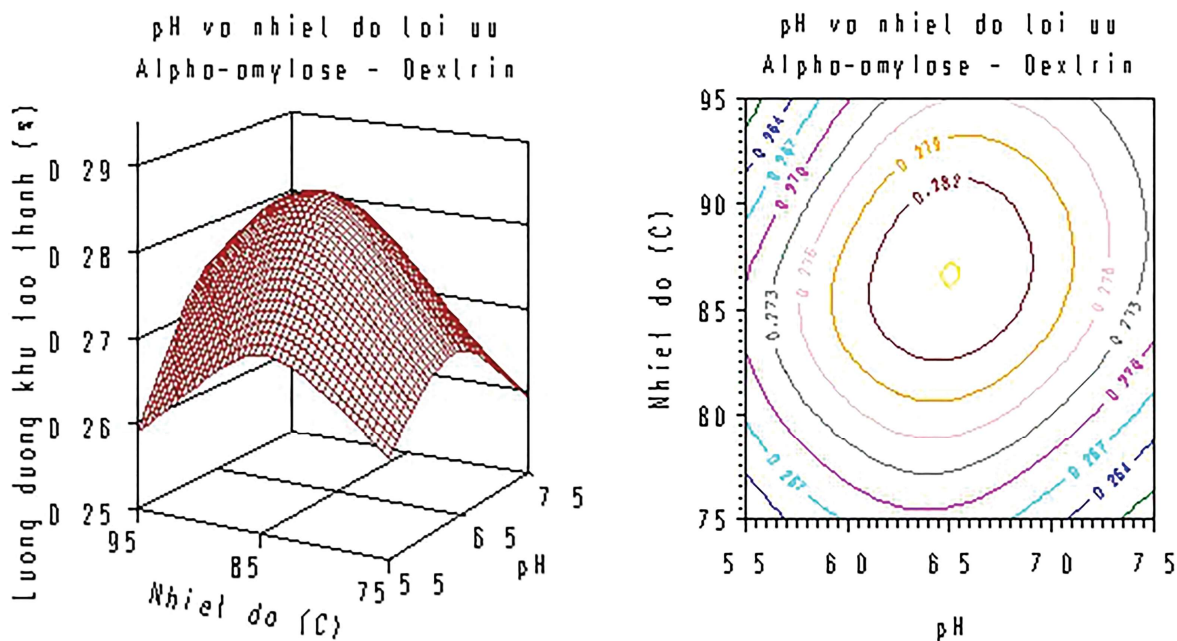
Chế phẩm alpha-amylase từ *Bacillus licheniformis* (Termamyl 120L, type L) được sử dụng cho quá trình thủy phân. Tuy nhiên, để quá trình thủy phân tinh bột đạt hiệu quả cao, các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của alpha-amylase được khảo sát (do mỗi enzyme có một khoảng pH và nhiệt độ tối ưu). Thí nghiệm được tiến hành với các giá trị pH là 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 và 7,5 và nhiệt độ thủy phân là 75, 80, 85, 90 và 95°C với cơ chất dextrin. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 3.1 và Hình 3.1.

Bảng 3.1. Hàm lượng đường khử thu được sau quá trình thủy phân dextrin bằng alpha-amylase ở điều kiện pH và nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ pH	75oC	80oC	85oC	90oC	95oC	Trung bình (pH)
5,5	0,26	0,26	0,28	0,26	0,25	0,26 ^C
6,0	0,27	0,27	0,29	0,28	0,27	0,28 ^B
6,5	0,27	0,28	0,30	0,30	0,28	0,29 ^A
7,0	0,26	0,27	0,29	0,28	0,27	0,28 ^B
7,5	0,26	0,26	0,27	0,27	0,27	0,26 ^C
Trung bình (nhiệt độ)	0,26 ^d	0,27 ^c	0,29 ^a	0,28 ^b	0,27 ^c	

Các giá trị trung bình có cùng chữ cái A, B, C, D hoặc a, b, c, d đi kèm trong cùng một cột hoặc cùng một hàng thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Các giá trị ghi trong bảng được tính bằng đơn vị % và là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại.



Hình 3.1. Đồ thị 3D - Contour biểu diễn ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt động của enzyme alpha-amylase

Kết quả thống kê bảng 3.1 cho thấy các yếu tố nhiệt độ và pH của dịch thủy phân có ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme alpha-amylase.

Đối với ảnh hưởng của nhiệt độ, hàm lượng đường khử thu được tăng dần khi thủy phân ở nhiệt độ từ 75 đến 85°C và sau đó giảm dần từ 90 đến 95°C. Như vậy, nhiệt độ 85°C có thể là nhiệt độ thích hợp cho hoạt động của enzyme alpha-amylase. Kết quả trên phù hợp với nhận định của Nguyễn Đức Lượng (2004), tác giả cho rằng enzyme có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis* hoạt động mạnh ở 85°C (Nguyễn Đức Lượng, 2004). Trong khi đó, Dương Thị Ngọc Hạnh và Nguyễn Minh Thủy (2014) sử dụng enzyme alpha-amylase trong thủy phân tinh bột từ gạo huyết rồng, kết quả nhiệt độ tối ưu cho enzyme này hoạt động là 90°C (Dương Thị Ngọc Hạnh và Nguyễn Minh Thủy, 2014); Bùi Văn Tú (2017) sử dụng enzyme alpha-amylase thủy phân tinh bột từ sản dây với nhiệt độ tối ưu là 75°C (Bùi Văn

Tú, 2017). Các kết quả này phù hợp về mặt lý luận, cùng một loại enzyme nhưng hoạt động trên cơ chất khác nhau sẽ có khoảng nhiệt độ tối ưu khác nhau và đây sẽ là cơ sở để ứng dụng trong thực tiễn sản xuất. Bên cạnh ảnh hưởng của nhiệt độ, pH cũng là yếu tố có ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme alpha-amylase. Ở pH 6,5, hàm lượng đường khử thu được cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các mẫu ở các mức pH còn lại. Như vậy, pH 6,5 là giá trị pH tối ưu cho enzyme alpha-amylase hoạt động trên cơ chất dextrin. Trong nghiên cứu của Bùi Văn Tú (2017), enzyme alpha-amylase thủy phân tinh bột từ sản dây có pH tối ưu là 5,6. Điều này cho thấy, enzyme alpha-amylase hoạt động trên cơ chất khác nhau sẽ có giá trị pH tối ưu khác nhau.

Qua kết quả Bảng 3.1 và Hình 3.1, nhiệt độ 87°C và pH 6,5 là nhiệt độ và pH tối ưu cho enzyme alpha-amylase hoạt động trên cơ chất chuẩn (dextrin).

- Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất (dextrin) hành thí nghiệm tìm nồng độ cơ chất sao cho vận tốc phản ứng của enzyme đạt cực đại. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 3.2 và Hình 3.2.

Ngoài hai yếu tố nhiệt độ và pH ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme alpha-amylase, nồng độ cơ chất cũng ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme. Vì vậy, cần tiến

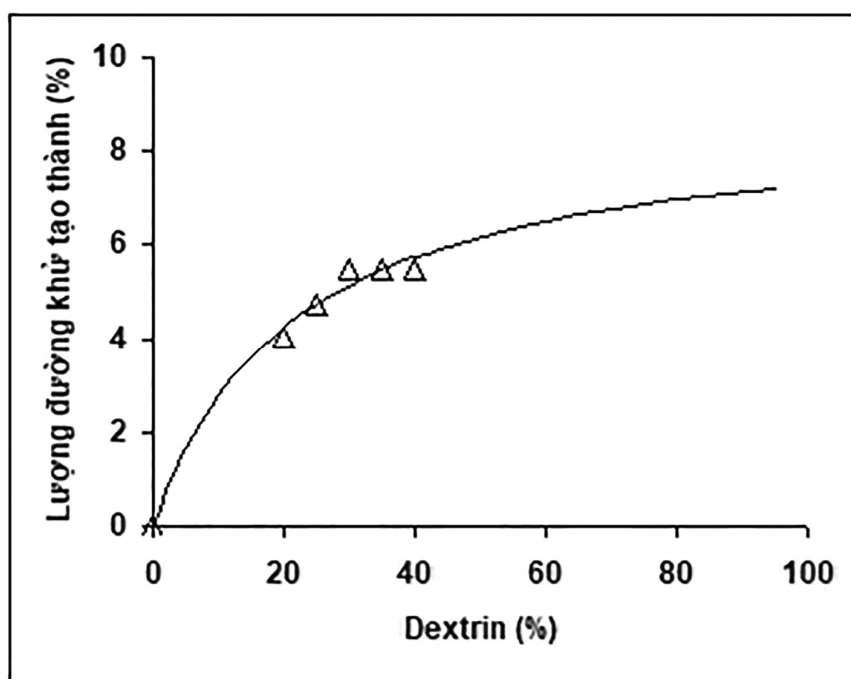
Bảng 3.2. Lượng đường khử thu được với các nồng độ cơ chất dextrin khác nhau khi sử dụng alpha-amylase

Nồng độ dextrin (%)	20	25	30	35	40
Đường khử tạo thành (%)	4,05 ^c	4,73 ^b	5,50 ^a	5,50 ^a	5,50 ^a
$V = \frac{V_{\max} * [S]}{K_m + [S]}$	4,24	4,73	5,13	5,46	5,74

Ghi chú

Các giá trị có cùng chữ cái a, b, c đi kèm trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Các giá trị trong bảng là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại.



Hình 3.2. Đồ thị Michaelis - Menten biểu diễn hàm lượng đường khử thu được theo nồng độ cơ chất dextrin đối với enzyme alpha-amylase

Kết quả bảng 3.2 cho thấy hàm lượng đường khử thu được khi sử dụng enzyme alpha-amylase thủy phân dextrin tăng từ nồng độ 20 đến 30%. Sau đó, hàm lượng đường khử thu được hầu như không tăng khi tăng nồng độ dextrin. Như vậy, trong giai đoạn đầu nồng độ cơ chất tăng, tốc độ phản ứng sẽ tăng. Nhưng khi tốc độ phản ứng đạt cực đại, cho dù có tăng nồng độ cơ chất, tốc độ phản ứng cũng không có khả năng tăng theo. Kết quả xử lý bằng phần mềm SAS, xác định được các giá trị $V_{\max}$ và K_m của enzyme alpha-amylase tương ứng với nồng độ enzyme 0,06% trên cơ chất dextrin như sau:

$$V_{\max} = 8,8751 \pm 1,3893$$

$$K_m = 21,8978 \pm 8,1290 (\%)$$

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và nồng độ cơ chất đến quá trình đường hóa của enzyme glucoamylase trên cơ chất chuẩn (maltose)

- Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH

Chế phẩm enzyme glucoamylase 300L từ chủng vi sinh vật chọn lọc *Aspergillus niger* sử dụng trong quá trình đường hóa.

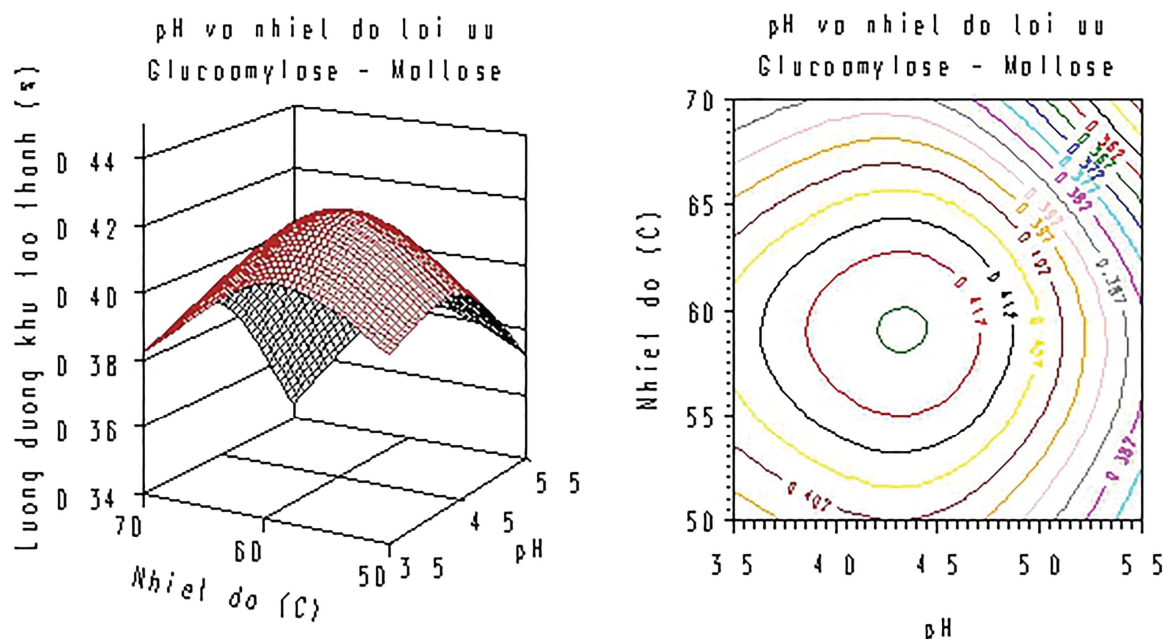
Thí nghiệm được tiến hành với các giá trị pH là: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 và 5,5 và nhiệt độ đường hóa là: 50, 55, 60, 65 và 70°C, cơ chất sử dụng là maltose (cơ chất chuẩn). Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 3.3 và Hình 3.3.

Bảng 3.3: Hàm lượng đường khử thu được sau quá trình đường hóa maltose bằng glucoamylase ở điều kiện nhiệt độ và pH khác nhau

Nhiệt độ pH	50oC	55oC	60oC	65oC	70oC	Trung bình (pH)
3,5	0,37	0,40	0,42	0,39	0,37	0,39 ^C
4,0	0,39	0,42	0,43	0,40	0,39	0,41 ^B
4,5	0,41	0,43	0,44	0,42	0,40	0,42 ^A
5,0	0,38	0,40	0,42	0,40	0,36	0,39 ^C
5,5	0,36	0,38	0,39	0,37	0,31	0,36 ^D
Trung bình (nhiệt độ)	0,38 ^d	0,41 ^b	0,42 ^a	0,39 ^c	0,37 ^e	

Các giá trị trung bình có cùng chữ cái A, B, C, D hoặc a, b, c, d đi kèm trong cùng một cột hoặc cùng một hàng thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Các giá trị ghi trong bảng được tính bằng đơn vị % và là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại.



Hình 3.3. Đồ thị 3D và Contour biểu diễn ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt động của glucoamylase

Kết quả thống kê Bảng 3.3 cho thấy các yếu tố nhiệt độ và pH của dịch thủy phân có ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme glucoamylase.

Đối với ảnh hưởng của nhiệt độ, hàm lượng đường khử thu được tăng dần khi thực hiện quá trình đường hóa ở nhiệt độ từ 50 đến 60°C và có khuynh hướng giảm dần ở nhiệt độ từ 65 đến 70°C. Điều này phù hợp với nhận định của Nguyễn Đức Lượng (2002), khi tăng nhiệt độ, khả năng xúc tác của enzyme tăng nhưng chỉ tăng ở một giới hạn nhất định, vượt quá giới hạn đó phản ứng của enzyme sẽ giảm (Nguyễn Đức Lượng 2002). Như vậy, nhiệt độ tối ưu của enzyme glucoamylase hoạt động trên cơ chất maltose là 60°C. Bên cạnh ảnh hưởng của nhiệt độ, pH cũng có ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme glucoamylase. Hàm lượng đường khử thu được tăng dần khi thực hiện quá trình đường hóa trên cơ chất maltose từ pH 3,5 đến 4,5, sau đó có khuynh hướng giảm dần từ pH 5,0 đến 5,5 và sự tăng giảm này có

khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%. Kết quả này cũng phù hợp với báo cáo của Nguyễn Đức Lượng (2002), khi tăng hoặc giảm giá trị pH tới một điểm xác định nào đó, vận tốc phản ứng enzyme sẽ tăng dần và đạt đến cực đại, khi vượt qua giới hạn pH này hoạt động của enzyme sẽ giảm. Từ đó cho thấy, pH 4,5 là pH tối ưu của enzyme glucoamylase hoạt động trên cơ chất maltose.

Qua kết quả Bảng 3.3 và Hình 3.3, nhiệt độ 59°C và pH 4,3 là nhiệt độ và pH tối ưu cho enzyme glucoamylase hoạt động trên cơ chất maltose (cơ chất chuẩn).

- Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất maltose

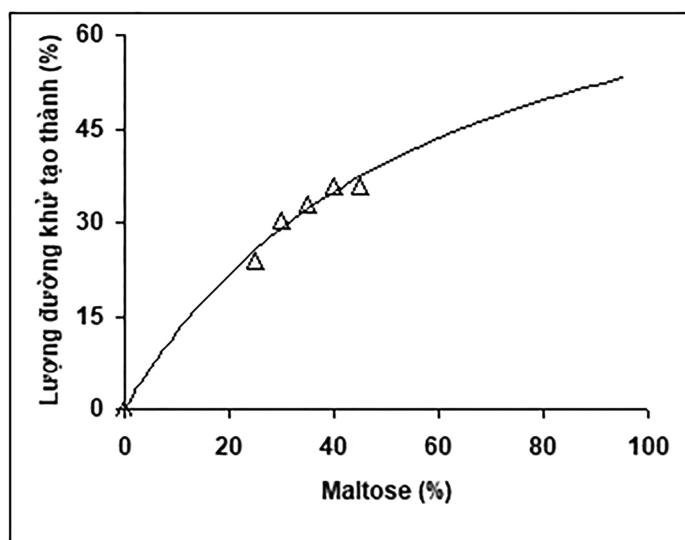
Ngoài hai yếu tố nhiệt độ và pH ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme glucoamylase, yếu tố nồng độ cơ chất cũng ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme. Vì vậy, cần xác định nồng độ cơ chất sao cho vận tốc phản ứng của enzyme đạt cực đại. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3.4 và Hình 3.4.

Bảng 3.4. Lượng đường khử tạo thành với các nồng độ cơ chất maltose khác nhau khi sử dụng glucoamylase

Nồng độ maltose (%)	25	30	35	40	45
Đường khử tạo thành (%)	23,92 ^d	30,36 ^c	32,89 ^b	35,88 ^a	35,88 ^a
$V = \frac{V_{\max} * [S]}{K_m + [S]}$	25,68	29,08	32,11	34,84	37,31

Các giá trị có cùng chữ cái a, b, c, d đi kèm trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Các giá trị trong bảng là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại.



Hình 3.4. Đồ thị Michaelis - Menten biểu diễn hàm lượng đường khử thu được theo nồng độ cơ chất maltose đối với enzyme glucoamylase

Ở giai đoạn đầu của phản ứng, hàm lượng đường khử thu được khi sử dụng enzyme glucoamylase đường hóa tăng dần ở nồng độ từ 20 đến 40% và sau đó hầu như không tăng nữa khi tăng nồng độ cơ chất. Kết quả xử lý bằng phần mềm SAS xác định được các giá trị $V_{\max}$ và K_m của enzyme glucoamylase tương ứng với nồng độ enzyme 0,04% trên cơ chất maltose như sau:

$$V_{\max} = 85,9671 \pm 23,6759$$

$$K_m = 58,6989 \pm 26,0868 (\%)$$

4. KẾT LUẬN

- Nhiệt độ 87°C và pH 6,5 là nhiệt độ và pH tối ưu cho enzyme alpha-amylase hoạt động trên hóa chất dextrin chuẩn dùng làm cơ chất; Giá trị $V_{\max}$ và K_m của enzyme alpha-amylase với nồng độ 0,06% trên cơ chất dextrin là $8,8751 \pm 1,3893$ và $21,8978 \pm 8,1290 (\%)$.

- Nhiệt độ 59°C và pH 4,3 là nhiệt độ và pH tối ưu cho enzyme glucoamylase hoạt động trên hóa chất maltose chuẩn dùng làm cơ chất; $V_{\max} = 85,9671 \pm 23,6759$, $K_m = 58,6989$

$\pm 26,0868$ (%) của enzyme glucoamylase tương ứng với nồng độ enzyme 0,04% trên cơ chất maltose. Giá trị $V_{\max}$ và $K_{\max}$ của enzyme glucoamylase với nồng độ 0,04% trên cơ chất maltose là $85,9671 \pm 23,6759$ và $58,6989 \pm 26,0868$ (%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Briggs, G. E., and Haldane, J. B. (1925), *A Note on the Kinetics of Enzyme Action*, Biochem J 19, 338-339.
- [2] Hill, Robert (1970), Needham, Joseph., *The Chemistry of Life: Eight Lectures on the History of Biochemistry*, London: Cambridge University Press. tr. 17. ISBN 978-0-521-07379-0.
- [3] Michaelis, L., and Menten, M. (1913), *Die kinetik der invertinwirkung*, Biochemistry Zeitung 49, 333-369.
- [4] Miller, G. L. (1959), *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*, Analytical Chemistry, Vol. 31, No. 3. (1 March 1959), pp. 426-428. 8.
- [5] Silverman, Richard B. (2002), *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions* (ấn bản 2), London: Academic Press. tr. 1. ISBN 978-0-12-643731-7.
- [6] Bùi Văn Tú (2017), *Nghiên cứu ứng dụng enzyme amylase thủy phân tinh bột, sản xuất thử nghiệm nước giải khát sẵn dây*, Trường Đại học Sao Đỏ.
- [7] Dương Thị Ngọc Hạnh và Nguyễn Minh Thủy (2014), “Sử dụng enzyme alpha-amylase trong thủy phân tinh bột từ gạo huyết rồng”, *Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ*.
- [8] Nguyễn Đức Lượng (2002), *Vĩ sinh vật học Công nghiệp*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- [9] Nguyễn Đức Lượng (2004), *Công nghệ enzyme*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
- [10] Nguyễn Quốc Thái (2019), *Bài giảng Thống kê và phép thí nghiệm*, Trường Đại học Cửu Long.
- [11] Trần Nguyễn An Sa (2018), *Kiểm tra chất lượng thực phẩm*, Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh.

Ngày nhận bài: 16/2/2022

Ngày gửi phản biện: 23/2/2022

Ngày duyệt đăng: 4/5/2022