

KHẢO SÁT QUÁ TRÌNH SINH TỔNG HỢP PROTEASE TỪ *Aspergillus oryzae* TRÊN MÔI TRƯỜNG BÁN RẮN

Lê Nguyễn Đoàn Duy¹, Huỳnh Thị Phương Thảo¹ và Nguyễn Công Hà¹

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 14/06/2014

Ngày chấp nhận: 28/08/2014

Title:

Study on the biosynthesis of protease from *Aspergillus oryzae* in semi solid – state fermentation

Từ khóa:

Aspergillus oryzae, cám gạo, enzyme protease, gelatin

Keywords:

Aspergillus oryzae, rice bran, enzyme protease, gelatin

ABSTRACT

With the purpose of observation of biosynthesis of protease in gelatin solid – state culture as well as determination of kinetic parameters such as optimum pH, temperature, V_{max} and K_m of the protease, various experiments were done. The result showed that optimal cultivation condition was 70% rice bran, 25% paddy, 5% gelatin, 60% water content, pH 5.72 hours incubation. Kinetic analysis of enzyme showed that optimum pH and temperature was 5.5 and 45°C respectively, $V_{max} = 1.2548 \mu\text{mol/minute}$, $K_m = 0.3932\%$. In addition, the ability of protein solution hydrolysis was also checked. The result showed that at 45°C, pH 3.2, 1 mL acid protein could be hydrolyzed well after 50 minutes reaction by the enzyme. The results indicate that protease biosynthesized from *Aspergillus oryzae* has high ability to hydrolyze protein solution.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành với mục đích khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme protease từ *Aspergillus oryzae* trên môi trường bán rắn với cơ chất cảm ứng là gelatin cũng như xác định các thông số động học của enzyme như pH, nhiệt độ tối ưu, V_{max} và K_m . Kết quả cho thấy thành phần môi trường bán rắn nuôi cấy thích hợp là hỗn hợp 70% cám, 25% trấu, 5% gelatin với độ ẩm môi trường là 60%, nhiệt độ ủ 30°C, pH 5 trong thời gian 72 giờ. Enzyme thu hồi thể hiện hoạt tính tối ưu ở nhiệt độ 45°C và pH = 5,5. Động học của enzyme protease được xác định trên cơ chất casein có $V_{max} = 1,2548 \mu\text{mol/phút}$ và $K_m = 0,3932\%$. Khả năng thủy phân của enzyme protease trong dịch acid protein (da cá tra ngâm acid acetic trong 24 giờ) ứng với thời gian thủy phân là 50 phút với thể tích dung dịch enzyme là 1mL protein, pH dung dịch là 3,2 và nhiệt độ thủy phân là 45°C. Kết quả đã chỉ ra rằng, enzyme protease có nguồn gốc từ *Aspergillus oryzae* được nuôi cấy trên môi trường bán rắn có khả năng sử dụng tốt trong việc thủy phân dung dịch protein.

1 GIỚI THIỆU

Aspergillus oryzae có thể sinh tổng hợp nhiều loại enzyme ngoại bào như amylase, protease, pectinase, lipase, xylanase, cellulase, catalase, phytase, glucoseoxidase (Zhu *et al.*, 2004, Cong Ha Nguyen *et al.*, 2005). Độ pH môi trường nuôi cấy có một ý nghĩa rất lớn đến chủng vi sinh vật và sự tổng hợp enzyme theo mong muốn. Khi pH dịch

về phía acid hoặc kiềm, sự tạo thành sinh khối không bị ảnh hưởng nhưng sự tạo thành enzyme bị kìm hãm. Không những vậy, thời gian nuôi để thu được lượng enzyme tùy thuộc vào giống và thường được xác định bằng thực nghiệm. Đối với nấm sợi *Aspergillus*, sự tạo enzyme cực đại thường kết thúc khi nấm bắt đầu sinh đỉnh bào tử (Nguyễn Đức Lượng và *ctv.*, 2004).

Có nhiều nghiên cứu liên quan đến quá trình thu nhận và sử dụng protease trong nhiều mục đích khác nhau đã được thực hiện. Năm 2004, Vũ Ngọc Bội đã nghiên cứu quá trình thủy phân protein cá bằng protease từ *Bacillus subtilis* S5. Kết quả cho thấy protease có thể thủy phân mạnh mẽ cơ thịt cá mồi và hoàn toàn có thể sử dụng enzyme này trong sản xuất bột đạm thủy phân với nồng độ 0,3% ở 50°C. Năm 2006, Trần Quốc Hiền và Lê Văn Việt Mẫn đã nghiên cứu thu nhận protease từ ruột cá Basa (*Pangasius bocourti*). Dịch chiết protease kiểm thu được từ ruột có tổng hoạt tính cao nhất là 15,79 UI/g (chất khô nội tạng) trong điều kiện chiết: tỷ lệ mẫu/dung môi 1/1(w/w); pH 9,5; nhiệt độ 35°C trong thời gian 10 phút. Năm 2007, Phan Thị Bích Trâm và ctv đã nghiên cứu thu hồi, tinh sạch và khảo sát đặc điểm của các serine protease từ trùn quế (*Perionyx excavatus*). Bước đầu khảo sát hệ protease từ trùn quế cho thấy phần lớn các protease trong dịch chiết enzyme thô có thể tinh sạch sơ bộ bằng tủa phân đoạn với ammonium sulfat nồng độ trong khoảng 30-80%. Nhiệt độ và pH tối ưu cho enzyme thô trên cơ chất casein là 55°C và pH 10-12.

Cơ chất cảm ứng được xem như yếu tố rất quan trọng dùng để điều khiển quá trình sinh tổng hợp enzyme từ vi sinh vật. Khi cho cơ chất vào môi trường nuôi cấy với liều lượng tăng dần thì khả năng tổng hợp enzyme cảm ứng sẽ tăng dần, đến một lúc nào đó quá trình này sẽ chững lại và thậm chí sẽ giảm do hiện tượng tăng áp suất thẩm thấu bởi cơ chất gây nên (Nguyễn Đức Lượng và ctv, 2004). Gelatin là các polypeptide cao phân tử, là thành phần protein chính trong các tế bào liên kết của nhiều động vật bao gồm cả xương và da. Gelatin không phải là protein hoàn hảo về mặt dinh dưỡng vì không chứa tryptophan và thiếu isoleucine, threonine, methionine. Tuy nhiên, gelatin từ da cá tra lại là nguồn nguyên liệu quý để sản xuất collagen thủy phân để sản xuất thực phẩm và mỹ phẩm vì chúng có chứa 2 loại acid amine đặc hiệu là hydroxyproline và hydroxylysine. Vì vậy, để tìm hiểu khả năng sinh tổng hợp protease đặc hiệu dùng để thủy phân protein từ da cá từ *A. oryzae* trên môi trường bán rắn, nghiên cứu này đã được thực hiện.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên vật liệu

Casein, gelatin (độ ẩm 10 - 12%) và các loại hóa chất khác có xuất xứ từ Trung Quốc. L - Tyrosine (C₉H₁₁NO₃), L - Cysteine hydrochlorid - monohydrate có nguồn gốc từ

Merck. *Aspergillus oryzae* nhận được từ Viện Nghiên cứu và phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ được nuôi cấy trên bề mặt thạch môi trường PGA (Potato, Glucose, Agar) và đem ủ ở 30°C trong 3 ngày để tăng sinh. Cắm và trâu được mua trực tiếp từ xí nghiệp xay xát gạo Gentraco (Cần Thơ). Độ ẩm của cám là 13±1% và độ ẩm của trâu là 10 ± 1%.

2.2 Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1 Ảnh hưởng của thành phần và pH ban đầu của môi trường lên men sinh tổng hợp protease

Thí nghiệm được tiến hành nhằm khảo sát ảnh hưởng của thành phần môi trường ban đầu, gồm 3 nghiệm thức: (1) 75% cám, 15% trâu và 10% gelatine; (2) 75% cám, 20% trâu, 5% gelatin; (3) 70% cám, 25% trâu, 5% gelatin và tác động của pH ban đầu của môi trường lên men, gồm 4 mức độ khảo sát từ 3 đến 6 đến hiệu quả thu nhận protease. Thành phần cơ chất ở theo các nghiệm thức khảo sát sẽ được điều chỉnh đến độ ẩm 60% bằng dung dịch đệm citrate có pH tương ứng (từ 3 đến 6). Sau khi thanh trùng ở 121°C trong 15 phút, môi trường được làm nguội trước khi chủng 1 mL huyền phù bào tử nấm *A. oryzae* vào với mật số 5.10⁶ CFU/mL, lắc đều trước khi nuôi cấy trong tủ ủ 30°C trong thời gian từ 24 đến 72 giờ. Lọc thu nhận enzyme, bảo quản chế phẩm enzyme thô ở nhiệt độ khoảng 5°C và tiến hành khảo sát hoạt tính tổng, hoạt tính riêng protease theo phương pháp Kunitz.

2.2.2 Xác định một số tính chất cơ bản của chế phẩm protease từ *Aspergillus oryzae*

- **Nhiệt độ và pH tối thích của enzyme:** Chế phẩm protease từ *A. oryzae* thu nhận được hòa tan vào dung dịch đệm có pH tương ứng từ 4 đến 6,5 (6 mức độ) trước khi ủ ở các nhiệt độ khảo sát từ 35 đến 55°C (khoảng cách 5°C). Tiến hành xác định hoạt tính protease ở các nghiệm thức

- **Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất lên hoạt tính enzyme protease:** Cơ chất được sử dụng là casein với nồng độ từ 0,2 ÷ 1,4%, phản ứng thủy phân được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ 45°C, pH 5,5. Dung dịch sau khi lọc có chứa enzyme protease được đem xác định hoạt tính theo phương pháp Kunitz. Sử dụng phương trình Michaelis-Menten $V_{max} = f(S)$, phần mềm SAS 9.1 để xác định K_m (% casein) và V_{max} (μmol/phút) của chế phẩm protease thu nhận.

2.2.3 Hiệu quả của chế phẩm protease đối với quá trình thủy phân da cá tra

Mục đích của thí nghiệm là đánh giá hiệu quả thủy phân protein của chế phẩm protease thu nhận.

Da cá tra được ngâm trong dung dịch acid acetic 0,3M với thời gian 24 giờ để tạo dung dịch acid protein có pH 3,2. Cho 1 mL dung dịch protease vào 5 mL dung dịch acid protein đã chuẩn bị; tiến hành thủy phân ở nhiệt độ 45°C với thời gian thay đổi từ 10 đến 60 phút. Đánh giá hiệu quả thủy phân protein dựa trên hàm lượng protein còn lại và lượng tyrosine sinh ra theo thời gian thủy phân.

2.3 Xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford

Hàm lượng protein có trong dung dịch được xác định dựa trên phản ứng tạo màu giữa protein và thuốc thử coomassie brilliant blue. Hỗn hợp phản ứng được đo độ hấp thụ ở bước sóng 595 nm và dựa vào đường chuẩn của protein tinh khiết suy ra hàm lượng protein của mẫu (Bradford, 1976).

2.4 Phân tích số liệu

Kết quả được xử lý, thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion 15.1, SAS 9.1.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bảng 1: Ảnh hưởng của thành phần và pH ban đầu của môi trường đến hoạt tính của protease

Thành phần môi trường	pH ban đầu của môi trường	Hoạt tính protease (TU/mL)	Hoạt tính riêng (TU/mg protein)
Môi trường 1: 75% cám, 15% trấu, 10% gelatine	3	0,560 ^b	1,112 ^{de}
	4	0,814 ^{cd}	1,155 ^e
	5	0,874 ^{de}	1,204 ^e
	6	0,758 ^c	1,024 ^{cd}
Môi trường 2: 75% cám, 20% trấu, 5% gelatin	3	0,404 ^a	0,770 ^a
	4	0,616 ^b	0,870 ^{ab}
	5	0,906 ^{ef}	1,149 ^e
	6	0,576 ^b	0,931 ^{bc}
Môi trường 3: 70% cám, 25% trấu, 5% gelatine	3	0,964 ^f	1,200 ^e
	4	0,962 ^f	1,197 ^e
	5	1,126 ^g	1,338 ^f
	6	0,608 ^b	1,011 ^{cd}

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%

Thành phần môi trường và pH ban đầu của môi trường lên men có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả thu nhận protease. Hoạt tính protease thu được tương ứng với 3 môi trường nuôi cấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%, trong đó môi trường nuôi cấy sử dụng kết hợp 70% cám và 25% trấu với sự hiện diện của 5% gelatine cho hoạt tính enzyme trung bình cao nhất, đặc biệt ở pH ban đầu của môi trường là 5 (hoạt tính protease tương ứng thu được là 1,126 TU/mL). Ngoài ra, pH môi trường cũng ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme. Hoạt tính protease thu được tương ứng với quá trình lên men *A. oryzae* ở

3.1 Ảnh hưởng của môi trường và pH đến quá trình sinh tổng hợp protease

Thành phần môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng nhiều đến khả năng sinh tổng hợp enzyme. Thành phần chính của môi trường nuôi cấy nấm mốc *A. oryzae* tạo protease theo phương pháp bề mặt là cám gạo. Tuy nhiên, cần cho thêm 20 ÷ 25% trấu vào môi trường để tạo độ xốp và tạo nên những khoảng trống để không khí lưu thông bên trong môi trường một cách dễ dàng (Nguyễn Đức Lượng và ctv., 2004).

Giá trị pH ban đầu của môi trường nuôi cấy là một trong những nhân tố có ảnh hưởng quan trọng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme. Mỗi loại vi sinh vật khác nhau cần có giá trị pH tối ưu riêng cho hoạt động sinh tổng hợp enzyme đạt hiệu quả cao nhất. Kết quả thống kê ảnh hưởng của thành phần môi trường nuôi cấy và pH ban đầu đối với sự thay đổi hoạt tính tổng protease và hoạt tính riêng của protease được thể hiện ở Bảng 1.

môi trường có pH 3 và pH 6 không có sự khác biệt ý nghĩa nhưng khác biệt so với mẫu trích từ môi trường có pH 4 và 5 ở độ tin cậy 95%. Ở điều kiện pH môi trường nuôi cấy là 5 có hoạt tính enzyme trung bình là cao nhất (0,969TU/mL) và pH 3 có hoạt tính enzyme trung bình thấp nhất khi thay đổi thành phần môi trường lên men khác nhau. Thành phần môi trường có chứa 25% trấu giúp tăng khả năng hoạt động của nấm mốc, tạo thuận lợi cho quá trình tổng hợp enzyme nhiều hơn. Việc bổ sung cơ chất cảm ứng là 5% gelatin trong môi trường đã đủ để nấm mốc sinh enzyme protease có hoạt lực cao nhất. Như vậy, thành phần môi trường thích hợp

cho nấm mốc phát triển và tạo enzyme có hoạt lực cao nhất là 70% cám : 25% trấu : 5% gelatin.

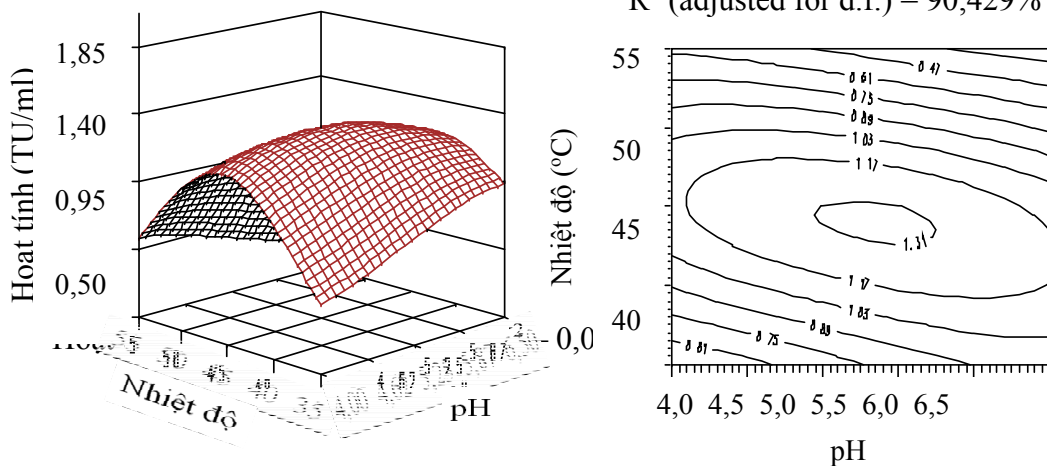
Mặc dù, quá trình nuôi cấy bằng phương pháp bề mặt không chịu ảnh hưởng lớn của pH môi trường, tuy nhiên, pH ban đầu của môi trường cũng có ảnh hưởng không nhỏ đến quá trình phát triển của nấm mốc và tạo ra enzyme. Kết quả từ Bảng 1 và 2 cho thấy hoạt tính enzyme tăng khi pH môi trường ban đầu có sự thay đổi. Hoạt tính enzyme tăng khi tăng pH môi trường từ 3 ÷ 5 nhưng khi pH môi trường bằng 6 thì hoạt tính enzyme lại giảm xuống. Theo Lê Xuân Phương (2004), môi trường thích hợp cho sự phát triển của nấm mốc là môi trường acid yếu. Như vậy, pH thích hợp cho *A. oryzae* phát triển là pH 5.

Tương tự như hoạt tính tổng của enzyme protease, hoạt tính riêng của protease tăng khi có sự thay đổi pH môi trường và thành phần môi trường. Hoạt tính riêng của enzyme tăng đến giới hạn tối đa thì có xu hướng giảm xuống, hoạt tính enzyme tăng từ pH 3 đến pH 5 và giảm khi pH 6. Thành phần môi trường 70% cám: 25% trấu :5% gelatinecho enzyme có hoạt tính riêng cao (1,338 TU/mg) và cũng khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Đây chính là thành phần môi trường được chọn lựa, thích hợp cho nấm mốc phát triển và sinh tổng hợp enzyme có hoạt lực khi kết hợp với việc điều chỉnh pH môi trường ban đầu là 5.

3.2 Xác định tính chất của chế phẩm protease thu nhận

3.2.1 Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên hoạt tính của hệ enzyme protease

Enzyme sau khi được sinh tổng hợp ở điều kiện



Hình 1: Sự ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên hoạt tính của enzyme protease

Trong đó: X là nhiệt độ và Y là pH

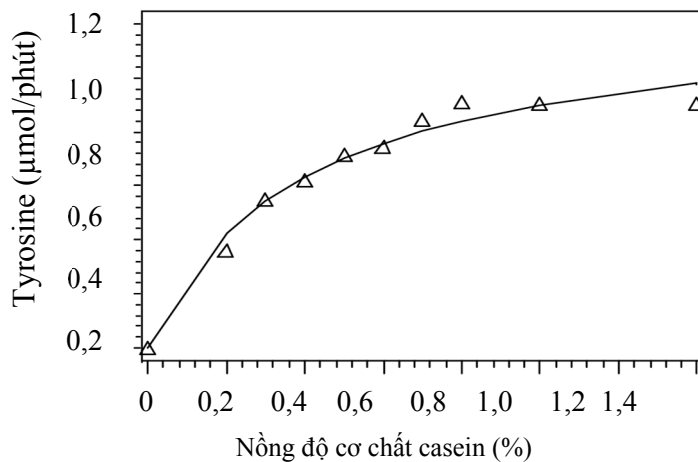
tối ưu trên sẽ được lọc và tinh sạch sơ bộ và được dùng để khảo sát pH và nhiệt độ tối ưu. Dựa vào kết quả ở Hình 1 cho thấy ở mỗi nhiệt độ và pH khác nhau enzyme thể hiện hoạt tính xúc tác khác nhau. Ở những nhiệt độ khác nhau hoạt tính enzyme giữa các nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% (số liệu không trình bày). Nhiệt độ 45°C khác biệt so với nhiệt độ 35°C, 40°C, 50°C và 55°C ở độ tin cậy 95% và có hoạt tính enzyme trung bình cao nhất (1,552 TU/mL). Hình 1 còn cho thấy khi gia tăng nhiệt độ phản ứng từ 35°C đến 55°C, hoạt tính enzyme tăng dần theo nhiệt độ. Nhưng khi nhiệt độ tăng lên đến 45°C thì hoạt tính enzyme trung bình là cao nhất (1,552 TU/mL), khi nhiệt độ tăng cao hơn nữa thì hoạt tính enzyme không tăng thêm mà bắt đầu có xu hướng giảm mạnh do xảy ra hiện tượng biến tính nhiệt của enzyme. Ở nhiệt độ 45°C hoạt tính enzyme trung bình là cao nhất (1,552 TU/mL) khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Như vậy, nhiệt độ 45°C được xem là nhiệt độ tối ưu của phản ứng enzyme.

Tương tự đối với nhiệt độ, khi thay đổi pH thì hoạt tính xúc tác của enzyme cũng thay đổi. pH khác nhau hoạt tính enzyme giữa các nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Ở pH 5,5 khác biệt ý nghĩa so với pH 4; 4,5; 5; 6 và 6,5 ở độ tin cậy 95% và cho hoạt tính enzyme trung bình cao nhất (0,935 TU/mL) (số liệu không trình bày). Kết quả thống kê (số liệu không trình bày) cho thấy hoạt tính xúc tác của protease cao nhất ở pH 5,5 (0,935 TU/mL) khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% so với pH 6 và thấp nhất ở giá trị pH 4. Kết quả ở Hình 1 cho thấy pH và nhiệt độ tối ưu là 45°C và pH 5,5.

Cơ chất được sử dụng là casein với nồng độ từ 0,2 ÷ 1,4%, phản ứng thủy phân được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ 45°C, pH 5,5. Dung dịch sau khi lọc có chứa enzyme protease được đem xác định hoạt tính theo phương pháp Kunitz. Động học enzyme được xác định thông qua việc xử lý bằng chương trình SAS 9.1 và kết quả protease thành phẩm có $V_{max} = 1,2548 \mu\text{mol/phút}$ và $K_m =$

0,3932% và đồ thị phương trình Michaelis – Menten được thể hiện ở Hình 2. Kết quả cho thấy hoạt tính enzyme cao nhất ứng với nồng độ cơ chất là 0,8% (0,910TU/mL) khác biệt không có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% so với nồng độ cơ chất là 1,0%. Khi tăng nồng độ cơ chất vượt quá giới hạn tối ưu thì hoạt tính enzyme gần như không tăng.

3.2.2 Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất lên hoạt tính enzyme protease



$V_{max} = 1,2548 \mu\text{mol/phút}$

$K_m = 0,3932\%$

Hình 2: Ảnh hưởng của nồng độ casein lên hoạt tính protease theo phương trình Michaelis – Menten

3.3 Khả năng thủy phân của protease trên dung dịch acid protein

Dựa vào những điều kiện tối ưu về nhiệt độ và pH, việc khảo sát khả năng thủy phân của protease trên dung dịch acid protein (da cá tra ngâm acid acetic trong 24 giờ) đã được thực hiện. Dung dịch acid protein có pH dung dịch là 3,2, nhiệt độ thủy phân được cố định ở 45°C. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu quả thủy phân protein acid bằng chế phẩm, protease thu nhận được thể hiện ở Bảng 2.

Dựa vào kết quả thống kê ở Bảng 2 cho thấy hàm lượng protein hoà tan còn lại sau quá trình thủy phân giữa các nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Thời gian thủy phân 50 và 60 phút khác biệt so với thời gian thủy phân là 10, 20, 30 và 40 phút ở độ tin cậy 95% và có hàm lượng protein còn lại trong dung dịch là thấp nhất (0,082 mg/mL). Thời gian đầu (0 phút) do chưa bổ sung enzyme, hàm lượng protein trong dung dịch acid protein còn cao (0,341 mg/mL). Sau 10 phút thủy phân, hàm lượng protein bắt đầu giảm mạnh và từ 40 phút đến 60 phút hàm lượng protein giảm rất chậm và gần như không đổi. Điều này là do enzyme đã thủy phân dung dịch acid protein tạo ra

các amino acid làm cho hàm lượng các chất hoà tan trong dung dịch giảm xuống và thời gian càng dài thì amino acid tạo ra càng nhiều, hàm lượng protein hoà tan giảm. Nhưng từ 50 phút trở đi hàm lượng protein hoà tan không giảm nữa, có thể do hàm lượng protein trong dung dịch không còn nữa, hàm lượng protein đo được lúc này chỉ là hàm lượng protein còn lại của enzyme sau khi thủy phân và cũng có thể là do hoạt tính enzyme bắt đầu giảm và mất hẳn nên không thủy phân hết lượng protein còn lại trong dung dịch acid protein.

Bảng 2: Hàm lượng protein còn lại và lượng tyrosine sinh ra sau quá trình thủy phân

Thời gian thủy phân (phút)	Hàm lượng protein (mg/mL)	Tyrosine (μmol/phút)
10	0,275 ^d	0,698 ^d
20	0,189 ^c	0,784 ^c
30	0,139 ^b	0,912 ^b
40	0,109 ^{ab}	0,966 ^b
50	0,082^a	1,049^a
60	0,089^a	1,053^a

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%

Lượng tyrosine sinh ra trong quá trình thủy phân giữa các nghiệm thức cũng có sự khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Thời gian thủy phân 50 và 60 phút khác biệt so với thời gian thủy phân là 10, 20, 30 và 40 phút ở độ tin cậy 95% và có hàm lượng tyrosine sinh ra cao nhất trong quá trình thủy phân. Nhưng thời gian thủy phân 30 và 40 phút khác biệt không có ý nghĩa. Thời gian thủy phân 10 phút có hàm lượng tyrosine thấp nhất (0,698 $\mu\text{mol}/\text{phút}$). Bảng 4 cho thấy khi thời gian thủy phân càng dài thì hàm lượng tyrosine sinh ra càng nhiều, lượng tyrosine sinh ra tỷ lệ thuận với thời gian thủy phân. Khi tăng thời gian thủy phân từ 10 ÷ 40 phút lượng tyrosine tăng lên một cách nhanh chóng, thời gian thủy phân từ 40 ÷ 60 phút lượng tyrosine cũng tăng nhưng chậm hơn thời gian đầu. Do quá trình xử lý nhiệt trong môi trường ẩm, các sợi collagen bị co ngắn lại. Có thể thấy trong thí nghiệm này hàm lượng tyrosine sinh ra cao nhất ở 60 phút là 1,049 $\mu\text{mol}/\text{phút}$. Như vậy, để tiết kiệm chi phí cho quá trình thủy phân thời gian thích hợp là 50 phút.

4 KẾT LUẬN

Quá trình nuôi cấy *A. oryzae* sinh tổng hợp protease đạt hoạt tính tổng cao nhất thì điều kiện môi trường bao gồm 70% cám : 25% trấu : 5% gelatin bổ sung làm cơ chất cảm ứng, bổ sung 1 mL (trên 40 mL môi trường) huyền phù bào tử *A. oryzae* với mật số 5.10^6 cfu/mL, điều kiện pH môi trường là 5, độ ẩm 60%, nhiệt độ ù 45°C trong thời gian 42 giờ. Chế phẩm protease thể hiện hoạt tính cao nhất trong khoảng pH dung dịch đệm là 5 ÷ 5,5 với nhiệt độ 45°C. Chế phẩm protease cho hoạt tính cao nhất ở nồng độ casein là 0,8%; $V_{\text{max}} = 1,2548 \mu\text{mol}/\text{phút}$ và $K_m = 0,3932\%$. Protease thể hiện khả năng thủy phân dung dịch acid protein tốt nhất ở thời gian là 50 phút với 1 mL dung dịch enzyme và nhiệt độ thủy phân là 45°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248 – 254.
2. Cong Ha NGUYEN, Ryoji T, Sato, T., Takeuchi, M, 2005. Taka-amylase A in the conidia of *Aspergillus oryzae* RIB40. *Journal of Biosci Biotechnol Biochem* 69(11): 2035-2041.
3. Lê Xuân Phương, 2007. Sinh lý đại cương vi sinh vật. *Nhà xuất bản Xây Dựng*.
4. Zhu, L. Y., C.H.Nguyen, T. Sato, and M. Takeuchi, 2004. Analysis of secreted proteins during conidial germination of *Aspergillus oryzae* RIB40. *Journal of Bioscience Biotechnology Biochem* 68(12): 2607-2612.
5. Nguyễn Đức Lượng, 2004. Công nghệ enzyme. *NXB Đại học quốc gia Tp Hồ Chí Minh*.
6. Phan Thị Bích Trâm và cộng sự, 2007. Nghiên cứu tinh sạch và khảo sát đặc điểm của các serine protease từ trùn quế. Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Cần Thơ.
7. Simone Roe, 2001. Protein purification techniques, *Oxford University Press Inc*.
8. Vũ Ngọc Bội, 2004. Nghiên cứu thủy phân protein cá bằng enzyme protease từ *Bacillus subtilis* S5. Luận án Tiến sĩ, trường Đại học tổng hợp TP. HCM.
9. Trần Quốc Hiền và Lê Văn Việt Mẫn, 2006. Nghiên cứu thu nhận chế phẩm protease từ ruột cá Basa (*Pangasius bocourti*). Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ -ĐHQG TP.HCM tập 09, số 11: 59-67.