

B. KH&CN
VCNTP

B. KH&CN
VCNTP

B. KH&CN
VCNTP

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM
301 Nguyễn Trãi, Thanh xuân, Hà nội

BÁO CÁO TỔNG KẾT **KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT**

Đề tài

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ ENZYM
TRONG CHẾ BIẾN MỘT SỐ NÔNG SẢN THỰC PHẨM
MÃ SỐ : KC 04 – 07

Chủ nhiệm đề tài cấp nhà nước : PGS. TS. Ngô Tiến Hiến

Đề tài nhánh

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN VÀ TẠO CHỦNG GIỐNG
BẰNG KỸ THUẬT DI TRUYỀN ĐỂ SINH TỔNG HỢP
ENZYM β -GALACTOSIDAZA CÓ HIỆU SUẤT CAO

Chủ nhiệm đề tài nhánh cấp nhà nước : TS. Nguyễn Văn Cách

Hà nội, 10 – 2004

Bàn quyền:

*Đơn xin sao chép toàn bộ hoặc từng phần tài liệu này phải gửi đến Viện trưởng
Viện Công Nghiệp Thực Phẩm, trừ trường hợp sử dụng với mục đích nghiên cứu.*

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM
301 Nguyễn Trãi, Thanh xuân, Hà nội

BÁO CÁO TỔNG KẾT KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

Đề tài cấp nhà nước

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ ENZYM
TRONG CHẾ BIẾN MỘT SỐ NÔNG SẢN THỰC PHẨM**

MÃ SỐ : KC 04 – 07

Chủ nhiệm đề tài cấp nhà nước : PGS. TS. Ngô Tiến Hiến

Đề tài nhánh cấp nhà nước

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN VÀ TẠO CHỦNG GIỐNG
BẰNG KỸ THUẬT DI TRUYỀN ĐỂ SINH TỔNG HỢP
ENZYM β -GALACTOSIDAZA CÓ HIỆU SUẤT CAO**

Chủ nhiệm đề tài nhánh cấp nhà nước : TS. Nguyễn Văn Cách

Hà nội, 10 – 2004
Bản thảo viết xong tháng 09 – 2004

*Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện đề tài cấp nhà nước,
mã số : KC 04 - 07.*

DANH SÁCH CÁN BỘ THAM GIA THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

1. **Nguyễn Văn Cách**, Tiến sĩ, Chủ nhiệm đề tài nhánh
2. Nguyễn Tú Anh, Thạc sĩ
3. Quãn Lê Hà, Tiến sĩ
4. Nguyễn Lan Hương, Thạc sĩ
5. Nguyễn Phương Linh, Cử nhân
6. Đặng Minh Hiếu, Kỹ sư
7. Trịnh Ngọc Phương, Kỹ sư
8. Nguyễn Thị Hải Yến, Kỹ sư

Cơ quan chủ trì đề tài nhánh

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

1 Đại Cồ Việt

Quận Hai Bà Trưng

Hà nội, Việt nam

Tel.: 04.8692764

<http://www.hut.edu.vn>

Mục lục

Tóm tắt Báo cáo kết quả thực hiện đề tài nhánh	Trang
Danh sách cán bộ tham gia đề tài	2
Tóm tắt nội dung	4
Tóm tắt tiến độ thực hiện đề tài nhánh	6
I. Mở đầu	8
II. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu	10
2.1. Nguyên vật liệu và trang thiết bị	10
2.1.1. Nguồn phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật	10
2.1.2. Hoá chất	10
2.1.3. Trang thiết bị	11
2.2. Phương pháp nghiên cứu	12
III. Kết quả và thảo luận	15
3.1. Phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn và nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ lên men thu enzyme β -galactozidaza	15
3.2. Nghiên cứu quy trình tách tinh chế thu chế phẩm enzyme β -galactozidaza	20
3.3. Nghiên cứu phân lập, tuyển chọn và sử dụng nấm mốc để lên men thu nhận enzyme β -galactozidaza	22
3.4. Nghiên cứu thử nghiệm ứng dụng enzyme β -galactozidaza để thủy phân đường lactoza trong sữa	25
IV. Kết luận	27
V. Tài liệu tham khảo	29
VI. Phụ lục	30
6.1. Hợp đồng nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ số 02/2001/HĐ-ĐTCT-KC 04-07, ngày 10 tháng 12 năm 2001	31
6.2. Hợp đồng nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ số 02/2002/HĐ-ĐTCT-KC 04-07, ngày 01 tháng 01 năm 2002	37
6.3. Hợp đồng nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ số 02/2003/HĐ-ĐTCT-KC 04-07, ngày 01 tháng 01 năm 2003	43
6.4. Danh sách cán bộ và sinh viên được đào tạo liên quan đến hoạt động của đề tài	49
6.5. Hợp tác quốc tế (liên quan đến đề tài)	54

TÓM TẮT NỘI DUNG

Sữa là nhóm sản phẩm có giá trị dinh dưỡng cao và rất tốt cho sức khỏe. Tuy nhiên, ở đại đa số người trưởng thành và người già thường xuất hiện hội chứng thiếu năng chuyển hoá lactoza nên sẽ không sử dụng được các sản phẩm sữa thường, do trong sữa vốn đã chứa nhiều lactoza. Đồng thời, lượng đường lactoza trong nguyên liệu sữa cao cao còn ảnh hưởng xấu đến một số chỉ tiêu chất lượng sản phẩm và gây khó khăn cho công nghệ chế biến. Enzym β -galactosidaza (β -D-galactoside-galactohydrolase, E.C.3.2.1.23) là enzym có khả năng xúc tác phản ứng thủy phân đường lactoza thành hai đường đơn để chuyển hoá là galactoza và glucoza, trong khi nước ta có nguồn tài nguyên vi sinh vật vô cùng phong phú; Với mục tiêu giải quyết vấn đề lactoza bằng phương pháp vi sinh vật, đề tài Nghiên cứu phân lập tuyển chọn và tạo chủng giống bằng kỹ thuật di truyền để sinh tổng hợp enzym β -galactosidaza có hiệu suất cao đã được triển khai.

Trên cơ sở khai thác nguồn vi sinh vật từ một số sản phẩm thực phẩm, đề tài đã tiến hành phân lập, tuyển chọn, nghiên cứu và xác định nhiều chỉ tiêu khoa học và công nghệ khác nhau. Tổng hợp kết quả nghiên cứu thu được cho phép rút ra một số kết luận sau:

1. Đã phân lập và tuyển chọn được 16 chủng vi khuẩn và 4 chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp enzym β -galactosidaza cao từ hệ sinh thái Việt nam, trong đó hai chủng vi khuẩn có hoạt lực sinh tổng hợp cao hơn cả là: *Sphingomonas paucimobilis* BK16 và *Aeromonas sobria* BK41; hai chủng nấm mốc có hoạt lực cao được lựa chọn là *Aspergillus aculeatus* BK-M₄ và *Penicillium implicatum* BK-M₁₂. Đã nghiên cứu xác định được một số đặc tính sinh lý và sinh hoá của các chủng đã tuyển chọn và một vài đặc tính enzym β -galactosidaza được tổng hợp.

2. Đã xây dựng được quy trình công nghệ lên men và quy trình công nghệ tách tinh chế thu chế phẩm enzym β -galactozidaza, với các thông số công nghệ chính là:

+ Sử dụng chủng vi khuẩn *S. paucimobilis* BK16, lên men hiếu khí trên môi trường dịch thải phomat bổ xung thêm đường lactoza 15,4g/l; bổ xung pepton và NH_4NO_3 (theo tỉ lệ 3:1,41) để đạt hàm lượng nitơ tổng số 3,022g/l và điều chỉnh pH về giá trị pH=7; tỉ lệ cấp giống 5%, nhiệt độ lên men 30°C và kết thúc quá trình sau thời gian lên men là 36 giờ. Hiệu quả tích tụ enzym trong thực tế đạt 6420 MU/ml và khả năng tích tụ lý thuyết có thể đạt 7456 MU/ml.

+ Phương trình điều chỉnh tối ưu cho quá trình lên men là:

$$Y = 5317,65 + 126,85.X_1 - 488,72.X_2 + 74,47.X_3$$

Với: Y là hoạt độ enzym tích tụ, MI/ml
 X_1 là hàm lượng lactoza bổ xung vào dịch thải phomat, g/l
 X_2 là hàm lượng pepton + NH_4NO_3 (tỉ lệ 3:1,41), g/l Tổng
 X_3 là pH môi trường

+ Kết thúc lên men ly tâm ở 8000v/ph, trong 10 phút để thu sinh khối; nghiền tế bào 10 phút, bằng siêu âm tần số 14kHz, trong đệm photphat pH=7 ở 4°C; rồi ly tâm thu dịch trong; kết tủa thu enzym bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 57,5%; loại muối; tách qua cột trao đổi ion cellulose Hiprep® 16/10 DEAE; rửa tách bằng dung dịch muối NaCl 2M với gradient nồng độ biến thiên từ 0,0-0,8M thu các phân đoạn tương ứng nồng độ muối tách trong khoảng 0,08-0,18M; loại muối rồi cô đặc thu chế phẩm enzym.

3. Đã thu được hai chủng nấm mốc *A. aculeatus* BK-M₄ và *P. implicatum* BK-M₁₂ có khả năng sinh tổng hợp enzym β -galactozidaza bền nhiệt và đã xác định được một vài đặc tính của chúng là: pH_{opt} = 4,7-6,0, t_{opt} = 55°C; bảo tồn >80% hoạt lực ở điều kiện trên sau 7 giờ và nồng độ galactoza cho phép dưới 3,0g/l.

4. Đã kết hợp sử dụng kinh phí đề tài vào việc đào tạo 02 thạc sĩ và 4 kỹ sư công nghệ sinh học. Đồng thời đã tạo điều kiện hỗ trợ tích cực trong việc thiết lập và triển khai hợp tác quốc tế.

TÓM TẮT TIẾN ĐỘ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI NHÁNH

Tên đề tài nhánh: Nghiên cứu phân lập tuyển chọn và tạo chủng giống bằng kỹ thuật di truyền để sinh tổng hợp enzym β -galactosidaza có hiệu suất cao

Mã số đề tài : KC- 04-07

Năm	Theo hợp đồng	Vượt kế hoạch	Chưa hoàn thành
Năm 2001	1. Đã phân lập được 5 chủng vi khuẩn có hoạt tính β-galactosidaza từ hệ sinh thái vi sinh vật trong nước 2. Bước đầu nghiên cứu đặc tính sinh lý của 2 chủng có hoạt lực cao nhất là KC-02-07-BK01 và KC-02-07-BK05 về: đặc điểm hình thái, đặc điểm về sự phát triển trên môi trường đặc, dải nhiệt độ phát triển thích hợp 3. Đã phân lập được 2 chủng nấm mốc có hoạt tính β-galactosidaza	Không	
Năm 2002	1. Đã phân lập và tuyển chọn được 7 chủng vi khuẩn và 4 chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp enzym β-galactosidaza cao từ hệ sinh thái trong nước. 2. Đã tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn và 2 chủng nấm mốc có hoạt tính và đặc tính enzym cao hơn cho các nghiên cứu tiếp. 3. Đã tiến hành nghiên cứu về điều kiện lên men, tốc độ phát triển sinh khối và tốc độ tích tụ enzym, các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển và năng lực sinh tổng hợp enzym của chủng như: nhiệt độ, pH, hàng loạt nguồn dinh dưỡng cacbon và nitơ khác nhau... 4. Đã xác định được một số đặc tính của enzym β-galactosidaza từ chủng BK16	1. Tuyển chọn chủng vượt mức đăng ký 2. Đang triển khai nghiên cứu thử nghiệm trong công nghệ sản xuất phomat theo hướng khai thác lượng chất tan trong nước dịch và xử lý chất thải bảo vệ môi trường. Hướng nghiên cứu này bước đầu cho kết quả khả quan và đã lên men đạt nồng độ enzym 7456 MU/ml.	

Năm 2003	1. Nghiên cứu về điều kiện lên men, tốc độ phát triển sinh khối và tốc độ tích tụ enzym, các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển và năng lực sinh tổng hợp enzym của chủng như: nhiệt độ, pH, hàng loạt nguồn dinh dưỡng cacbon và nitơ khác nhau...(tiếp theo kỳ trước) 2. Nghiên cứu thử nghiệm trong công nghệ sản xuất phomat theo hướng khai thác lượng chất tan trong nước dịch và xử lý chất thải bảo vệ môi trường. Hướng nghiên cứu này bước đầu cho kết quả khả quan và đã lên men đạt nồng độ enzym 7456 MU/ml. 3. Đã nghiên cứu, đánh giá và lựa chọn sơ bộ về các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp enzym bền nhiệt cho các nghiên cứu sau này. 4. Đã nghiên cứu, xác định đặc tính và định tên 4 chủng vi sinh vật BK16, BK41, M4 và M12. Đã triển khai nghiên cứu tách và tinh chế thu chế phẩm enzym và xác định một số đặc tính của enzym β-galactosidaza *** Đề tài đã kết hợp sử dụng kinh phí để đào tạo 02 thạc sĩ khoa học kỹ thuật, 4 sinh viên nghiên cứu khoa học và tạo điều kiện hợp tác và giúp đỡ cho 01 nghiên cứu sinh Ph.D. nước ngoài cùng tham gia nghiên cứu về enzym β-galactosidaza (trong khuôn khổ thoả thuận hợp tác nghiên cứu và hỗ trợ đào tạo song phương giữa trường Đại học Bách khoa Hà nội và trường Đại học BOKU-Vienna, Cộng hoà áo).	Đã nghiên cứu, đánh giá và lựa chọn sơ bộ về các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp enzym bền nhiệt cho các nghiên cứu sau này.	
---------------------	--	---	--

1. mở đầu

Sữa là nhóm sản phẩm có giá trị dinh dưỡng cao, đầy đủ các chất khoáng và có hoạt tính kháng thể; Do vậy, sữa rất tốt cho sức khỏe, nhất là cho trẻ em và cho người già. Đường lactoza là một thành phần rất quan trọng trong sữa với hàm lượng trong sữa tươi dao động trong khoảng 4,5-5,0%. Tuy nhiên, khả năng hấp thu và chuyển hoá đường lactoza ở người thay đổi theo tuổi tác và có sự dao động đáng kể giữa các cộng đồng dân cư khác nhau trên thế giới. Trẻ sơ sinh có khả năng đồng hoá rất tốt lactoza nhờ hệ enzym β -galactosidaza được tổng hợp trên thành ruột non; Tuy nhiên năng lực sinh tổng hợp enzym này sẽ bị mất dần khi trẻ qua tuổi cai sữa. Kết quả ở đại đa số người trưởng thành và người già khi sử dụng nhiều sản phẩm sữa, do bị suy giảm hay không còn năng lực đồng hoá lactoza, thường bị xuất hiện các triệu chứng như: đau bụng, đầy hơi, đau bụng quặn, đi ngoài dữ dội....(hội chứng thiếu năng chuyển hoá lactoza, *lactose maldigestion* - hay ở mức trầm trọng hơn không thể sử dụng được các sản phẩm sữa có chứa lactoza, *lactose intolerance*). Ngoài ra, trong công nghệ chế biến sữa, lượng đường lactoza cao còn ảnh hưởng xấu đến một số chỉ tiêu chất lượng sản phẩm như làm sẫm màu (làm tăng cường độ caramen và cường độ melanoidin) hoặc có thể tái kết tinh đường khi bảo quản sản phẩm... Chính vì vậy, việc tìm kiếm giải pháp công nghệ để làm giảm hàm lượng đường lactoza trong sữa là vấn đề có giá trị thực tiễn và khả năng ứng dụng triển khai cao; Đặc biệt ở nước ta, trong những năm gần đây các sản phẩm sữa có xu hướng được sử dụng ngày càng nhiều và ngày càng rộng rãi hơn.

Enzym β -galactosidaza (β -D-galactoside-galactohydrolase, E.C.3.2.1.23) là enzym có khả năng xúc tác phản ứng thủy phân đường lactoza thành hai đường đơn galactosa và glucoza. Enzym β -galactosidaza có mặt trong nhiều tổ chức của động vật, thực vật và rất nhiều loài vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp hệ enzym này. Ưu thế to lớn của công nghệ ứng dụng vi sinh vật trong sinh tổng hợp enzym đã

được khẳng định trong thực tiễn sản xuất công nghiệp, trong khi nước ta có nguồn tài nguyên vi sinh vật vô cùng phong phú, là tiền đề thuận lợi để triển khai nghiên cứu và sản xuất nhóm chế phẩm enzym β -galactosidaza.

Với luận điểm đã nêu, chúng tôi đã triển khai đề tài "Nghiên cứu phân lập tuyển chọn và tạo chủng giống bằng kỹ thuật di truyền để sinh tổng hợp enzym β -galactosidaza có hiệu suất cao". Nội dung chính của đề tài tập trung giải quyết bốn nhiệm vụ là:

- + Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp enzym β -galactosidaza cao từ hệ sinh thái vi sinh vật trong nước; áp dụng các kỹ thuật tuyển chọn và tạo giống tiên tiến (bao gồm cả việc tách dòng gen β -galactosidaza và biến nạp tạo chủng siêu tổng hợp enzym để thu chủng sinh tổng hợp β -galactosidaza hiệu suất cao.
- + Nghiên cứu đặc tính sinh lý, sinh hoá chủng đã tuyển chọn, đặc tính enzym β -galactosidaza của chủng và nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ lên men thích ứng để sản xuất chế phẩm enzym β -galactosidaza.
- + Nghiên cứu thử nghiệm khả năng ứng dụng chế phẩm enzym β -galactosidaza thu được trong chế biến sữa.

Điểm riêng biệt của đề tài là đã định hướng nghiên cứu nhằm sản xuất nhóm chế phẩm enzym β -galactosidaza, là hướng nghiên cứu đang được triển khai ở một số nước tư bản công nghiệp; qua đó mở ra khả năng tiếp cận xu thế nghiên cứu hiện đại và kết hợp đào tạo, bồi dưỡng năng lực cán bộ để hội nhập và hợp tác nghiên cứu khoa học với các đối tác nước ngoài.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ TRANG THIẾT BỊ

2.1.1. Nguồn phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật

Nguồn phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật là các sản phẩm thực phẩm lưu hành trên thị trường như:

- Sữa chua, sản phẩm lưu hành trên thị trường của các hãng Vinamilk, Nestle' và sản phẩm sữa chua lên men thủ công.
- Sữa tươi, nem chua, tương lưu hành trên thị trường Hà nội
- Mốc tương Bần (Hưng yên), men rượu cổ truyền Vân hà (Bắc ninh), Chương xá (Hưng yên) ...

2.1.2. Hoá chất

- + Các loại cơ chất sử dụng để pha chế môi trường, bao gồm: lactoza, glucoza, saccaroza, fructoza, xyloza, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , pepton, cao nấm men là sản phẩm tinh khiết của Trung quốc.
- + Thuốc thử X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) của hãng USBTM, Italy
- + Cơ chất oNPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) của Sigma Aldrich, Germany
- + Enzym β -galactozidaza tinh khiết từ *E. coli* là sản phẩm của hãng Fluka Chemie GmbH và Sigma Aldrich GmbH, Germany

- + Một vài nguyên liệu tự nhiên khác: dịch đường hoá malt, dịch thải phomat của Trung tâm nghiên cứu thỏ và dê, Ba vò, Hà tây.
- + Các hoá chất dùng trong phân tích: Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Na_2SO_4 , $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, SDS (sodium dodecyl sulfate)... đều là các hoá chất tinh khiết của các nước tư bản.

2.1.3. *Trang thiết bị*

- Kính hiển vi huỳnh quang Nikon eclipse E800 (camera Fujix Digital HC-300Zi), Japan
- Tủ nuôi lác ổn nhiệt 1575R SL Shel Lab -Sheldon manufacturing inc, USA; tủ ấm B12 Heraeus - Kendo Laboratory Products
- Thiết bị lên men chìm 5 lít New brunswish fermentor, USA
- Máy ly tâm eppendorf 1K15-Sigma laborzentrifuger, Germany; máy ly tâm nhiệt độ thấp Allegra TM 64R Centrifuge-Beckman, Germany; và máy ly tâm thường EBA 20-Hettich zentrifuger, Germany
- Máy so màu quang phổ Ultrospec[®] 2000 UV/Visible Spectrophotometer - Amersham pharmacia biotech, Germany
- Thiết bị sắc ký cột Pharmacia Biotech, Sweden
- Thiết bị sắc ký HPLC HP Agilent 1100 Series
- Eppendorf AG Thermomixer comfort, Freezing drying, HICLAVETM HV10-Hirayama...

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- + ***Thí nghiệm phân lập và tuyển chọn sơ bộ chủng vi sinh vật sinh tổng hợp enzym β -galactozidaza*** được thực hiện bằng phương pháp pha loãng và nuôi trên hộp thạch, phân lập vi khuẩn sử dụng môi trường lactoza-Broth, nuôi phân lập nấm mốc bằng môi trường sapec thay thế glucoza bằng lactoza, sử dụng chỉ thị X-Gal; gieo cấy vi sinh vật và nuôi trong tối ở điều kiện nhiệt độ thích hợp, các khuẩn lạc vi khuẩn dương tính với chỉ thị X-Gal sẽ xuất hiện màu xanh da trời được tách phân lập lại đến thuần khiết (Chỉ thị X-Gal trong nghiên cứu trước hết được pha thành dung dịch gốc X-Gal 20mg/ml trong demethylformamide, bảo quản ở 4°C; khi sử dụng bổ xung dung dịch X-Gal vào môi trường đến nồng độ khoảng 4 μ g/ml, ở nhiệt độ môi trường khi bổ xung khoảng 55°C).
 - + ***Thí nghiệm nghiên cứu năng lực sinh tổng hợp và hoạt tính enzym β -galactozidaza*** của chủng được thực hiện bằng lên men trên các điều kiện nghiên cứu tương ứng (thay đổi loại và nồng độ các cấu tử thức ăn, thời gian và điều liên lên men), nuôi trên máy lắc hay sử dụng thiết bị lên men chìm.
- * ***Hoá chất và thiết bị*** sử dụng gồm:
- Dung dịch đệm Z: Na₂HPO₄.12H₂O 0,06M (M=358,14g); NaH₂PO₄.2H₂O 0,06M (M=156,01); KCl 0,01M và MgSO₄ 0,001M; pha trong nước, bảo quản ở 4°C; Khi sử dụng bổ sung 0,27ml 2-mercaptoethanol/100ml dung dịch đệm
 - Dung dịch đệm photphat 0,1M, pH=7,0 (Na₂HPO₄.7H₂O 0,06M và NaH₂PO₄.H₂O 0,04M); điều chỉnh về pH=7,0 bằng NaOH hay H₃PO₄; bảo quản ở nhiệt độ phòng
 - Dung dịch cơ chất oNPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)
 - Dung dịch đệm Na₂CO₃ 1M. bảo quản ở nhiệt độ phòng

- Thiết bị ly tâm lạnh siêu tốc, máy so màu quang phổ, thiết bị điều nhiệt và các dụng cụ khác

*** Phương pháp xác định hoạt độ enzym β -galactozidaza nội bào vi khuẩn**

tiến hành theo trình tự sau: Dịch lên men được xử lý phá vỡ tế bào bằng siêu âm ở 18MHz thời gian 5 phút (siêu âm gián đoạn 30", ngừng 30", đặt mẫu trong cốc nước đá), tiếp theo ly tâm thu dịch trong, hoặc sử dụng toàn bộ cả thành tế bào để xác định phản ứng enzym.

Nhóm mẫu xử lý trực tiếp không qua nghiền phá vỡ tế bào bằng ly tâm ở 6000v/ph ở 4°C, trong 10 phút; gạn bỏ phần dịch trong và hoà tái tạo lại huyền phù bằng dung dịch đệm Z đã làm lạnh trước; Đo cường độ hấp thụ OD ở 600nm, sử dụng mẫu trắng là dung dịch đệm Z (Pha loãng tiếp dịch huyền phù trên bằng đệm Z lạnh đến độ pha loãng thích hợp, phụ thuộc vào nồng độ enzym trong mẫu sao cho mật độ quang nằm trong dải đo).

Lấy 1ml dịch huyền phù đã pha loãng rồi bổ sung 100 μ l cloroforc và 50 μ l dung dịch SDS 0,1% rồi lắc đều và để ổn định ở 28°C, trong 5 phút. Bổ xung thêm vào 0,2ml dung dịch cơ chất oNPG vào mẫu, giữ hỗn hợp phản ứng ở 28°C cho đến khi xuất hiện màu vàng rõ quan sát được. Tính thời gian và đình chỉ phản ứng, bằng bổ xung thêm vào ống 0,5ml dung dịch Na₂CO₃ 1M. Chuyển hỗn hợp sang ống eppendorf và ly tâm ở tốc độ 8000v/phút, sau 5 phút rồi thu dịch trong. Đo mật độ quang ở sóng 420nm và 550nm, sử dụng mẫu trắng với thành phần như trên nhưng bổ xung Na₂CO₃ ngay từ đầu để đình chỉ phản ứng enzym rồi mới bổ sung cơ chất oNPG. Hoạt độ enzym trong mẫu dịch phản ứng được xác định bằng biểu thức:

$$E = \frac{1000.(OD_{420} - 1,75.OD_{550})}{V.T.OD_{600}}$$

Trong đó: - E là hoạt độ enzym trong mẫu (MU/ml)
 - V là thể tích dịch mẫu phản ứng (ml),

- T là thời gian phản ứng (phút)
- OD₄₂₀, OD₅₅₀ và OD₆₀₀ là mật độ quang mẫu sau phản ứng đo ở các bước sóng tương ứng 420nm, 500nm (với mẫu trắng đã vô hoạt enzym) và 600nm (với mẫu trắng là dung dịch đệm Z)

*** Phương pháp xác định hoạt độ enzym β -galactozidaza nội bào vi khuẩn**

tiến hành tương tự như trên, chỉ khác những điểm sau:

- Chuẩn bị mẫu: sử dụng phần dịch trong sau khi ly tâm mẫu 10 phút, với tốc độ 6000v/ph ở 4°C; Pha loãng mẫu bằng đệm Z (không bổ sung cloroforc và SDS); lắc đều và để ổn định ở 28°C, sau 5 phút
- Thao tác phân tích tương tự như trên, song chỉ đo mật độ quang ở 420nm.
- Hoạt độ enzym được xác định bằng biểu thức sau:

$$E = \frac{1000 \cdot OD_{420}}{V \cdot T}$$

* **Hàm lượng đường** glucoza, lactoza trong mẫu nghiên cứu được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp, sắc ký lớp mỏng và trong dịch thải phomat bằng phương pháp Nelson Somogyi.

* **Hàm lượng nitơ tổng số** xác định bằng phương pháp Kjeldahl.

* **Độ axit** của dịch được tính theo độ Therner (°T : là số ml dung dịch NaOH 0,1N, hoặc KOH 0,1N, cần thiết để trung hoà lượng axit có trong 100ml dịch mẫu, sử dụng chỉ thị phenolphthalein 1%).

* **áp dụng phương pháp quy hoạch** toán học bậc 1 để xử lý dữ liệu xác định điều kiện lên men tối ưu.

III Kết quả và thảo luận

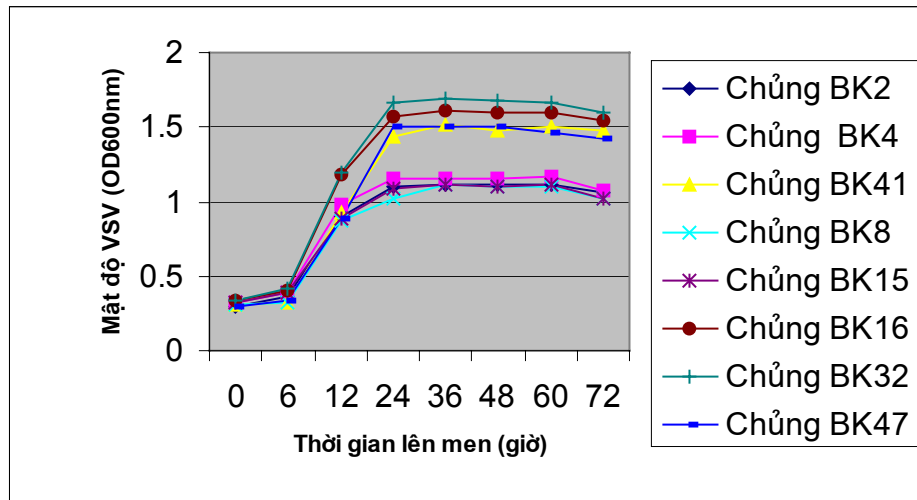
3.1. Phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn và nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ lên men thu enzym β -galactosidaza

Từ các nguồn sữa chua (Sản phẩm của công ty Vinamilk, Nestle' và sản phẩm thủ công) và các loại nem chua lưu hành trên thị trường Hà nội, phân lập sơ bộ trên môi trường *Lactosa-broth* đã tách được 64 dạng khuẩn lạc phản ứng dương tính rõ nét trên môi trường chứa chỉ thị X-Gal; từ các khuẩn lạc trên tuyển chọn lại thu được 16 chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp enzym β -galactosidaza. Giữa các chủng sự khác nhau đáng kể giữa cường độ màu và thời gian xuất hiện màu, trong phần lớn khuẩn lạc các chủng hiện màu rõ nét trong khoảng thời gian 24-48 giờ, khuẩn lạc một vài chủng hiện màu sau 3-4 ngày nuôi. Từ các chủng trên đã lựa chọn ra 8 chủng có khuẩn lạc tạo màu đậm sau 48 giờ để kiểm tra lên men tiếp trong môi trường lỏng. Tốc độ phát triển của các chủng và hoạt lực enzym β -galactosidaza nội bào trên môi trường cơ sở được biểu thị trên hình 1 và 2.

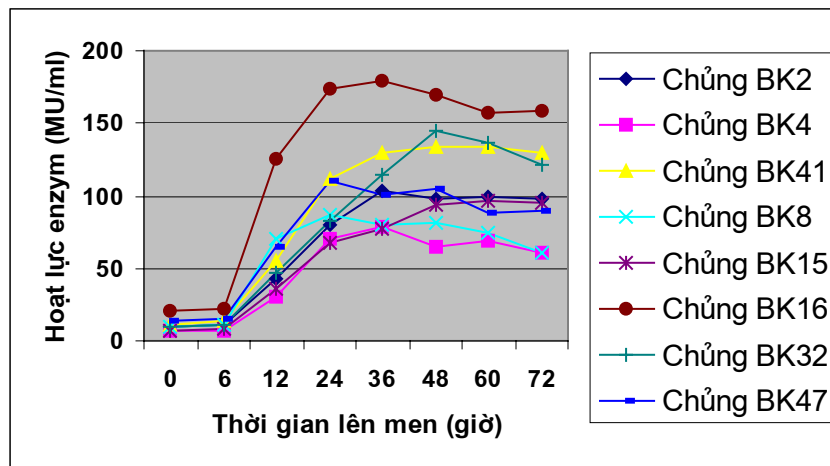
Trên hình 1 và 2 cho thấy hầu hết các chủng kiểm tra đều phát triển mạnh trong 24 giờ lên men đầu tiên và hoạt lực enzym nội bào cũng tăng mạnh mẽ trong giai đoạn phát triển logarit và đạt giá trị cao nhất vào đầu đến giữa giai đoạn phát triển cân bằng, dường như đồng biến với mật độ tế bào trong canh trường trong thời kỳ này. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy chủng BK16 được xem có nhiều ưu thế hơn cả, tiếp theo là chủng BK41. Phân tích theo kit trên máy định tên vi khuẩn *Mini API Bio Merieux* (CH Pháp; sử dụng các chỉ tiêu phân loại theo: *List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature* - URL : <http://www.bacterio.cict.fr/> hay www.bacterio.net) đã định danh được:

- + chủng BK 16 đồng nhất khá cao với loài *Sphingomonas paucimobilis* nên được định tên là *S. paucimobilis* BK16 và

+ chủng BK41 đồng nhất rất cao với loài *Aeromonas sobria* nên được định tên là *A. sobria* BK41.



Hình 1: Sự phát triển của vi khuẩn trong môi trường lên men

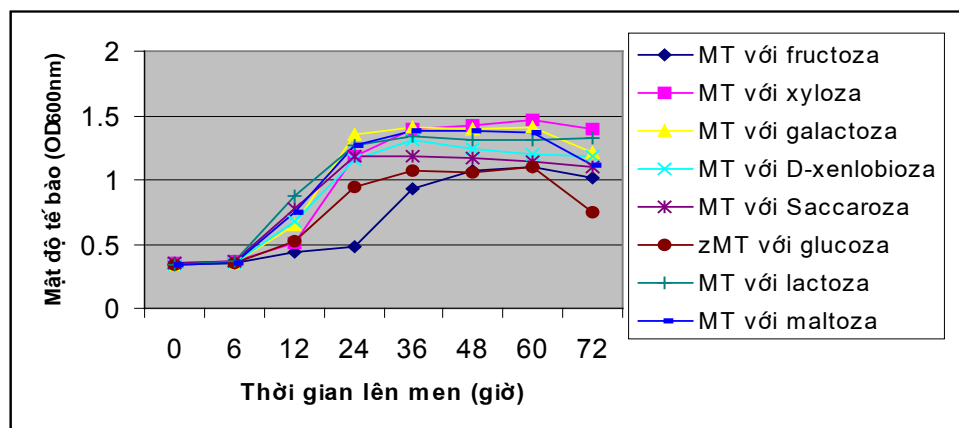


Hình 2: Sự biến đổi hoạt lực enzyme của chủng trong quá trình lên men

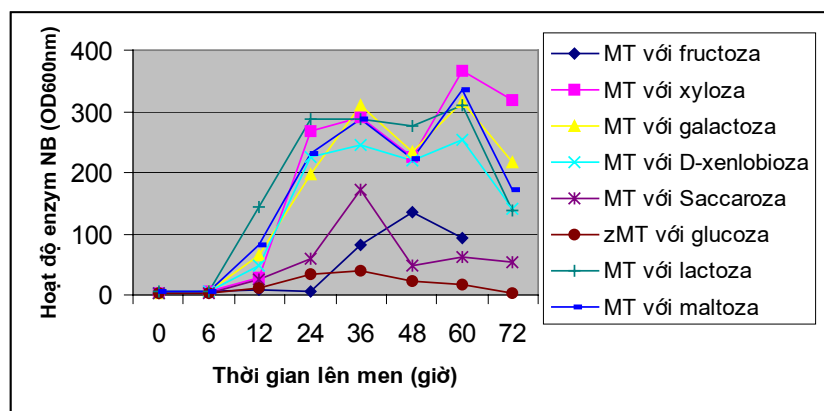
Hai chủng vi khuẩn trên được lựa chọn làm đối tượng cho phần nghiên cứu sau. Đồng thời, thử nghiệm kiểm tra hoạt lực enzyme tự do trong dịch lên men, ở dịch nghiên cứu sinh khối vi khuẩn đã cho thấy ở tất cả các chủng kiểm tra hoạt lực enzyme

nội bào cao hơn nhiều so với enzym ngoại bào và hoạt lực enzym tăng khi kéo dài thời gian xử lý siêu âm. Từ kết quả trên cho phép rút ra kết luận enzym β -galactosidaza là enzym nội bào liên kết trong tế bào chất. Một số thực nghiệm xử lý tạo biến chủng siêu tổng hợp bằng tia cực tím đã được triển khai; tuy nhiên chưa mang lại hiệu quả mong đợi.

Khả năng phát triển sinh khối và năng lực tích tụ enzym trên các nguồn thức ăn cacbon đã được xác định bằng việc thay thế các cơ chất: fructoza, xyloza, galactoza, xenlobioza, saccaroza, glucoza, lactoza và maltoza, với hàm lượng 20g/l, trên nền môi trường cơ bản (pepton 3g/l; NaNO_3 3,0g; KH_2PO_4 1g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g; KCl 0,5g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g và $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05g/l). Kết quả thí nghiệm cho thấy với các nguồn thức ăn kiểm tra (trừ fructoza) sự phát triển sinh khối của chủng xảy ra mạnh mẽ trong khoảng từ 12-36 giờ lên men, trong đó sinh khối tích tụ tốt hơn trên cơ chất: galactoza, lactoza, xyloza và maltoza (xem hình 3). Thí nghiệm xác định năng lực sinh tổng hợp enzym nội bào của chủng, tương ứng với điều kiện trên, cũng cho thấy (xem hình 4) khả năng sinh tổng hợp enzym β -galactosidaza cao hơn trên các cơ chất: lactoza, xyloza, maltoza, galactoza và xenlobioza, trong đó trong môi trường lactoza tốc độ sinh tổng hợp enzym xảy ra mạnh mẽ hơn ngay từ 12-24 giờ lên men đầu. Kết quả trên, cũng phù hợp với nhiều công trình đã công bố, đã khẳng định vai trò cảm ứng sinh tổng hợp β -galactosidaza của cơ chất lactoza.

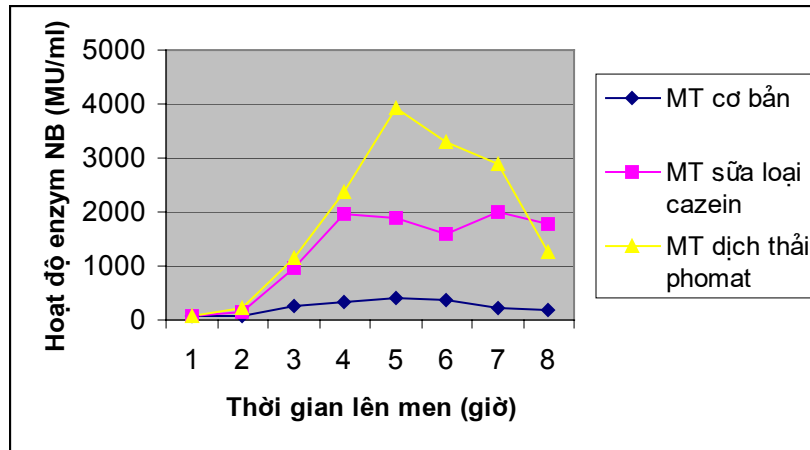


Hình 3: Sự phát triển của *S. paucimobilis* BK16 trên nguồn C khác nhau



Hình 4: Khả năng tích tụ enzym của *S. paucimobilis* BK16 trong môi trường

Với mục tiêu tìm kiếm khả năng sản xuất công nghiệp các thí nghiệm tiếp được định hướng trên nguồn nguyên liệu tự nhiên giàu lactoza là nước thải công nghệ sản xuất phomat. Sử dụng sữa tươi đã loại casein (bằng cách sử dụng HCl hạ pH xuống pH=4,8-4,9, giữ 30 phút ở 10°C để casein đông tụ, ly tâm ở 8000v/ph, trong 10 phút thu dịch trong) có bổ xung thêm nguồn thức ăn nitơ: pepton, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , pepton, cao nấm men ... đã xác định được khả năng đồng hoá rộng rãi các nguồn thức ăn nitơ khác nhau của *S. paucimobilis* BK16 ; tuy nhiên, tốc độ phát triển sinh khối cao nhất khi sử dụng cao nấm men phối hợp với $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và thấp nhất trên môi trường sử dụng NaNO_3 . Trong khi đó khả năng tích tụ enzym β -galactozidaza dao động khá lớn khi thay đổi nguồn nitơ này, trong đó hoạt độ enzym cao nhất trên môi trường sử dụng phối hợp pepton và NH_4NO_3 (sau 24 giờ lên men đạt 1938UI/ml, sau 60 giờ đạt 2046,9UI/ml). Kết quả này được áp dụng để so sánh năng lực tích tụ enzym trên ba môi trường sau: môi trường cơ bản (thay NaNO_3 bằng NH_4NO_3), bổ xung nitơ trên vào môi trường dịch sữa trong và bổ xung vào dịch thải phomat công nghiệp. Kết quả nghiên cứu (trên hình 5) cho thấy dịch thải phomat có hiệu quả tích tụ enzym cao hơn hẳn hai trường hợp trên; Hiện tượng này có thể lý giải là chủng *S. paucimobilis* BK16 được phân lập chính từ môi trường sữa, vì vậy chúng cần có các yếu tố thuận lợi do quá trình lên men sữa tạo ra để vi khuẩn sinh tổng hợp enzym.



Hình 5: Năng lực tích tụ enzym của *S. paucimobilis* BK16 trong môi trường

Kết quả nghiên cứu này rất tích cực vì đây chính là nguồn nguyên liệu rẻ tiền và hiệu quả để định hướng lên men sản xuất chế phẩm enzym β -galactozidaza (vừa chi phí nguyên liệu rẻ, vừa góp phần giảm tải ô nhiễm môi trường cho cơ sở chế biến sữa). Quá trình lên men tổng hợp enzym trong môi trường lỏng phụ thuộc vào nhiều yếu tố: thành phần môi trường lên men (bản chất và nồng độ cấu tử thức ăn chính), nhiệt độ, pH, thời gian lên men, tỉ lệ cấp giống... Theo một số tác giả tỉ lệ giống cấp giữa 5%-10% hầu như không ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp β -galactozidaza của vi khuẩn và kết hợp với các kết quả nghiên cứu đã trình bày trong phần trên, áp dụng phương pháp tối ưu hoá, chúng tôi đã lựa chọn hoạt độ enzym tích tụ làm hàm mục tiêu với các biến thay đổi:

- Thành phần môi trường cơ sở: dịch thải phomat, từ trung tâm nghiên cứu dê và thỏ, Ba vò, Hà tây
- X_1 là nguồn cacbon bổ xung: lactoza, với các mức 0g, 5g, 10g, 15g và 20g
- X_2 là nguồn thức ăn nitơ bổ xung: pepton kết hợp với NH_4NO_3 (1,41g/l $\approx$ 3g NaNO_3); với các mức: không bổ xung thêm, bổ xung thêm 1, 2, 3 và 4 lần hàm lượng trên
- X_3 là pH môi trường thay đổi theo mức pH=4, pH=5, pH=6 và pH=7

Đề tài đã triển khai các thí nghiệm và xử lý theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm đã thu được hàm tối ưu là:

$$Y = 5317,65 + 126,85.X_1 - 488,72.X_2 + 74,47.X_3$$

Với: Y là hoạt độ enzym tích tụ, MI/ml

X_1 là hàm lượng lactoza bổ xung vào dịch thải phomat, g/l

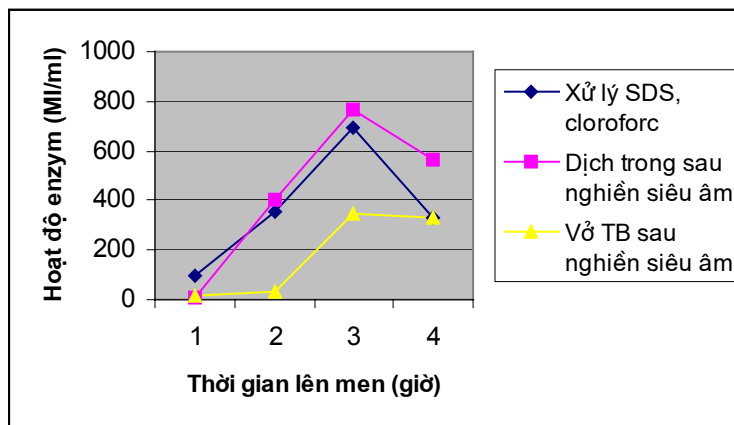
X_2 là hàm lượng pepton + NH_4NO_3 (tỉ lệ 3:1,41), g/l Tổng

X_3 là pH môi trường

Theo kết luận trên, hoạt độ enzym β -galactozidaza có thể đạt giá trị cực đại 7456MU/ml, tương ứng với chế độ lên men sử dụng dịch thải phomat, có bổ xung 15,4g/l lactoza, bổ xung pepton và NH_4NO_3 (theo tỉ lệ 3:1,41) để đạt hàm lượng nitơ tổng số 3,022g/l và điều chỉnh pH về giá trị pH=7, tỉ lệ cấp giống 5%, nhiệt độ lên men 30°C và kết thúc quá trình sau thời gian lên men là 36 giờ.

3.2. Nghiên cứu quy trình tách tinh chế thu chế phẩm enzym β -galactozidaza

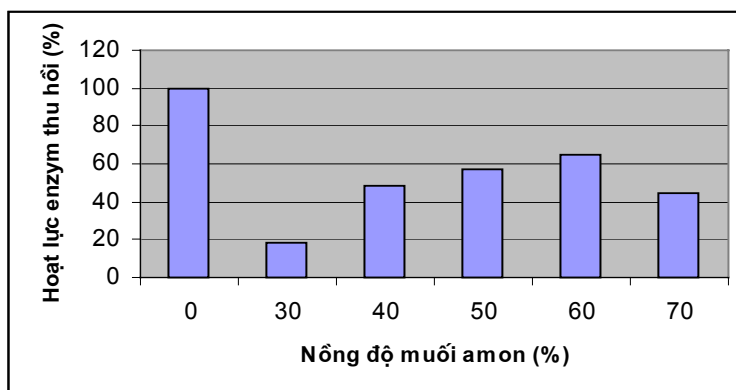
Kết thúc quá trình lên men, dịch lên men được ly tâm ở 8000v/ph, sau 10 phút thu sinh khối. Tiếp theo, hoà lại sinh khối vào dung dịch đệm Z lạnh ở 4°C, pH=8,0; rồi xử lý tế bào vi khuẩn theo 3 phương án là: xử lý hoá chất (bổ xung cloroforc và SDS 0,1% để làm tăng tính thấm thành tế bào vi khuẩn), nghiền tế bào bằng siêu âm 18MHez, thời gian 7 phút (trong đá lạnh, gián đoạn nghiền 30" lại dừng nghiền 30") rồi ly tâm 8000v/ph thu dịch trong và thu vỏ tế bào (ở dạng phân cặn, hoà tan lại trong đệm Z). Kết quả thu được cho thấy hoạt độ enzym trong phần dịch trong ly tâm sau khi nghiền siêu âm lớn nhất, tuy nhiên vẫn còn lượng đáng kể enzym liên kết với xác tế bào (khoảng 30-40%), nghĩa là việc tìm kiếm các giải pháp hỗ trợ nhằm làm tăng hiệu quả thu hồi enzym cần thiết phải được triển khai thêm trong các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 6: Hiệu quả thu hồi enzym trong các điều kiện xử lý khác nhau

Việc thay đổi thời gian siêu âm xử lý phá vỡ tế bào trong khoảng 15 phút đầu có tác dụng làm tăng đáng kể lượng enzym tự do trích ly được (đạt tới khoảng 73%); tuy nhiên nếu thời gian tăng quá giá trị trên hầu như không cải thiện thêm được hiệu quả khai thác enzym.

Dịch trong thu được sau ly tâm được xử lý kết tủa enzym bằng sử dụng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, với nồng độ thay đổi trong khoảng 30-70% đã cho thấy khả năng kết tủa enzym thuận lợi trong khoảng nồng độ 50-60% (xem hình 7); thử nghiệm kiểm tra lại trong dải nồng độ trên đã xác định được nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ thích hợp nhất là 47,5%.



Hình 7: Hiệu quả thu hồi enzym khi kết tủa bằng sulphatamon

Sau khi ly tâm ở 8000v/ph, 10 phút rồi gạn bỏ phần dịch trong, phần cặn được chuyển vào túi xelophan, ngâm trong đệm photphat pH=7 ở 4°C qua đêm để loại muối; tiếp theo hoà tan lại vào đệm photphat pH=7, lọc qua màng lọc rồi tách sắc ký qua cột trao đổi ion cellulose Hiprep® 16/10 DEAE; sử dụng dung dịch đệm Tris-HCl 10 mmol, pH=7,5, rửa tách bằng dung dịch muối NaCl 2M, với gradient nồng độ biến thiên từ 0,0-0,8M. Kết quả thu được cho thấy hoạt độ enzym tập trung trong các phân đoạn tách tương ứng với trường nồng độ muối NaCl trong khoảng 0,08-0,18M. Phân thí nghiệm xác định đặc tính enzym được tiến hành theo trình tự: thu gom các phân đoạn trên, cô đặc trên thiết bị đông khô, loại muối và cô đặc lại để thu chế phẩm lỏng. Kết quả nghiên cứu cho thấy enzym β -galactozidaza của vi khuẩn *S. paucimobilis BK16* có nhiệt độ tối thích trong khoảng 40-50°C, cao nhất ở 45°C; pH tối ưu quanh giá trị pH=7 và hoạt lực enzym vẫn đạt >80% sau thời gian phản ứng 60 phút.

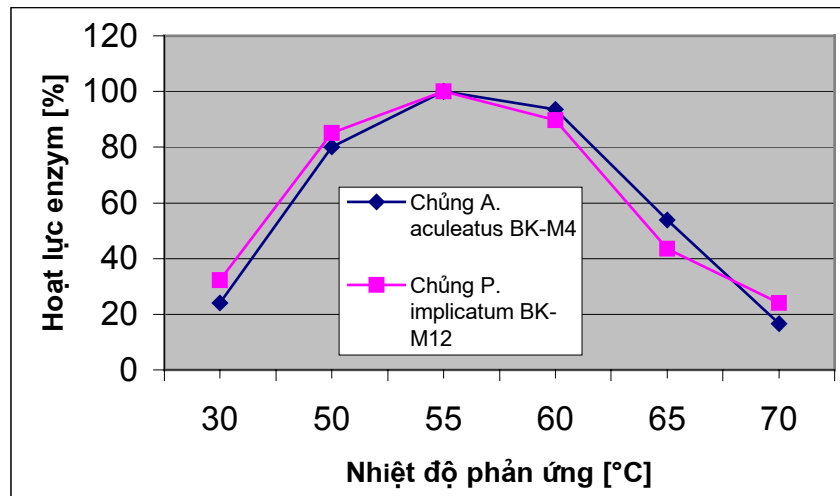
3.3. Nghiên cứu phân lập, tuyển chọn và sử dụng nấm mốc để lên men thu nhận enzym β -galactozidaza

Nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp enzym β -galactozidaza được phân lập từ một số sản phẩm sữa, từ mốc tương và từ bánh men rượu (sử dụng chỉ thị X-Gal; trên môi trường gồm: lactoza 30g/l; NaNO₃ 3,0g; KH₂PO₄ 1,0g; MgSO₄.H₂O 0,5g; KCl 0,5g; FeSO₄ 0,01g và aga-agar 25g/l). Kết quả phân lập sơ bộ thu được 10 chủng nấm mốc khác nhau phản ứng dương tính với môi trường X-Gal. Tiếp tục tuyển chọn phân lập lại thu được 6 chủng, ký hiệu là M₄, M₆, M₇, M₈, M₉ và M₁₂ phản ứng rõ nét với chỉ thị. Với mục tiêu tìm kiếm nguồn nấm mốc sinh tổng hợp enzym β -galactozidaza bền nhiệt, đề tài tiếp tục triển khai thử nghiệm nuôi cấy trong môi trường lỏng, ở pH=6,0; 30°C và tốc độ lắc 200v/ph, sau 72 giờ thu dịch lên men để xác định hoạt lực enzym nội bào (tiến hành như trên đối tượng vi khuẩn) ở hai chế độ phản ứng là 30°C và 60°C. Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy có 4 chủng nấm mốc M₄, M₆, M₉ và M₁₂ sinh tổng hợp enzym β -galactozidaza

bền nhiệt, đặc biệt nguồn enzyme β -galactozidaza của hai chủng M_4 và M_{12} vẫn thể hiện hoạt tính sau thời gian phản ứng là 8 giờ, trong đó chủng M_{12} có hoạt lực cao hơn. Kết quả nghiên cứu hình thái và đặc điểm sinh lý và áp dụng chỉ tiêu phân loại Raper đã cho phép phân loại định tên cho hai chủng là:

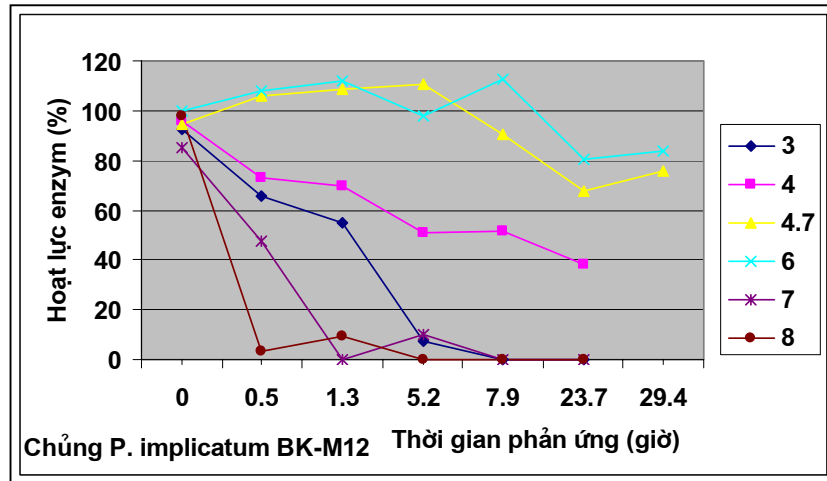
- + Chủng nấm mốc M_4 định tên là *Aspergillus aculeatus* BK- M_4
- + Chủng nấm mốc M_{12} định tên là *Penicillium implicatum* BK- M_{12}

Hai chủng nấm mốc trên đã được lên men hiếu khí trong môi trường lỏng trong fermentor 5 lít (môi trường lên men gồm dịch đường hoá malt 10,6°Bx 10%; pepton 0,3% và lactoza 7%). Sau 3 ngày lên men thu dịch, ly tâm 5000v/ph, trong 10 phút để thu sinh khối. Hoà lại sinh khối nấm trong đệm photphat pH=6,9 (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 ; 10 mM KCl; 1 mM MgSO_4) và bổ xung thêm vài giọt SDS 0,1% rồi nghiền siêu âm ở 14kHz trong nồi đá lạnh, trong 5 phút, sau đó ly tâm thu dịch trong làm dung dịch enzyme. Kết quả tiến hành phản ứng trong những điều kiện nhiệt độ khác nhau đã cho thấy enzyme từ cả hai đối tượng trên đều có nhiệt độ tối thích ở khoảng 55°C (xem hình 8).



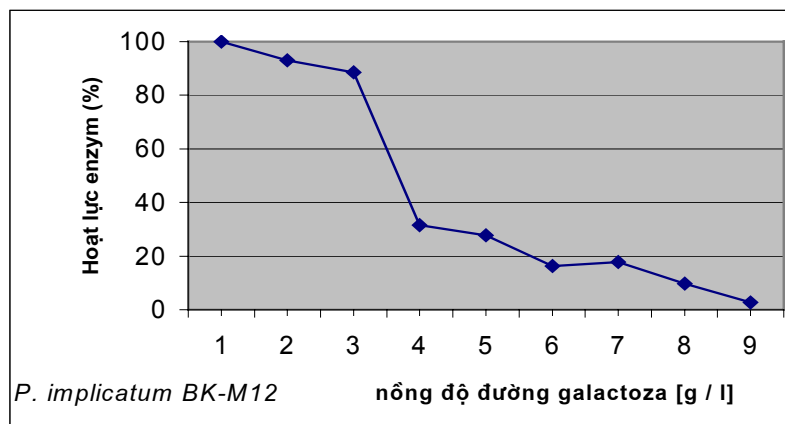
Hình 8: ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính enzyme β -galactozidaza của nấm

Thử nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến hoạt tính enzyme đã cho thấy enzyme β -galactozidaza của *P. implicatum* BK-M12 có pH tối thích trong khoảng pH=4,7-6,0 và dường như chúng rất bền trong điều kiện pH này, đến mức hoạt tính enzyme gần như suy giảm không đáng kể sau 29 giờ phản ứng (hình 9).



Hình 9: ảnh hưởng của pH đến hoạt tính enzyme β -galactozidaza của *P. implicatum* BK-M12

ảnh hưởng của nồng độ sản phẩm tạo thành đã được kiểm tra trên cơ chất galactosa; kết quả thí nghiệm củng cố thêm kết luận cho rằng hoạt tính enzyme bị kìm hãm do nồng độ galactosa cao trong môi trường; tuy nhiên, ở nồng độ galactosa trong khoảng 0-3,0g/l ảnh hưởng trên ở mức chấp nhận được.



Hình 10: ảnh hưởng của nồng độ sản phẩm cuối galactosa đến hoạt tính enzyme β -galactozidaza của *P. implicatum* BK-M12

3.4. Nghiên cứu thử nghiệm ứng dụng enzym β -galactozidaza để thuỷ phân đường lactoza trong sữa

Khả năng ứng dụng chế phẩm enzym β -galactozidaza để thuỷ phân lactoza trong sữa được triển khai theo hai phương án là:

Sử dụng chủng vi khuẩn *S. paucimobilis BK16* làm tác nhân, lên men ở điều kiện đã xác định được trong mục 3.1. để thu sinh khối vi khuẩn rồi đưa đi đông khô. Thực nghiệm từ 1 lít dịch lên men với hoạt độ enzym 6420 MU/ml đã thu được 5,2g sinh khối đông khô với hoạt độ 1012MU/mg; nghĩa là khả năng thu hồi enzym khoảng 82%. Sữa tươi có đường, sản phẩm thương mại của công ty Vinamilk, được điều chỉnh đến hàm lượng đường xấp xỉ 30g/l; rồi bổ xung chế phẩm sinh khối đông khô 0,5g/500ml sữa (tương ứng nồng độ enzym xấp xỉ 2000MU/ml). Giữ hỗn hợp phản ứng ở 30°C, trong 1 giờ; tiến hành xác định hàm lượng đường lactoza và glucoza tại hai thời điểm trước và sau khi xử lý. Kết quả thu được cho thấy hàm lượng đường lactoza đã giảm đáng kể (từ 12,81g xuống còn 4,63g - tương ứng làm giảm 63,86%; xem chromatogram 2 trong phần phụ lục); trong khi đó hàm lượng glucoza tăng từ 11,75g/l lên 13,61g/l, nghĩa là có thể một phần lactoza không bị thuỷ phân thành glucoza và galactoza. Nguyên nhân của hiện tượng suy giảm trên cần được nghiên cứu tiếp, trong đó một khả năng mong đợi là có thể nguồn enzym trên có hoạt tính galactozyl hoá đáng kể, nên một phần đường lactoza đã được chuyển hoá theo hướng tạo sản phẩm galacto-oligosaccharide.

Sử dụng chế phẩm enzym β -galactozidaza tái tổ hợp có nguồn gốc từ vi khuẩn *E. coli ATCC 11105* (do nhóm tác giả Viện Công nghệ sinh học, Trung tâm khoa học tự nhiên và Công nghệ quốc gia sản xuất) để xử lý sữa tươi trong thời gian 30 phút ở 30°C, với nồng độ enzym khác nhau: 1, 2, 4, 6, 8 và 10 lần nồng độ cơ sở tương ứng với nồng độ cơ chất trong sữa tươi, mỗi đơn vị nồng độ cơ sở tương ứng với 1 μ mol lactoza trong sữa) đã thu được kết quả trong bảng sau:

Bảng 1: Sự biến đổi hàm lượng đường lactoza trong sữa khi xử lý

enzym β -galactozidaza tái tổ hợp từ *E. coli* ATCC 11105

Nồng độ enzym	x	2X	4X	6X	8X	10X
Hàm lượng lactoza còn lại sau xử lý (%)	69,73	60,07	38,67	28,80	12,60	7,93

Như vậy có thể ghi nhận hiệu quả tích cực đối với khả năng sử dụng enzym β -galactozidaza tái tổ hợp để làm giảm hàm lượng đường lactoza trong sữa; tuy nhiên vấn đề này cần được nghiên cứu chi tiết hơn.

IV. KẾT LUẬN

Tổng hợp kết quả nghiên cứu trên cho phép rút ra kết luận sau:

1. Đã phân lập và tuyển chọn được 16 chủng vi khuẩn và 4 chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp enzym β -galactozidaza cao từ hệ sinh thái Việt nam, trong đó hai chủng vi khuẩn có hoạt lực sinh tổng hợp cao hơn cả là: *Sphingomonas paucimobilis* BK16 và *Aeromonas sobria* BK41; hai chủng nấm mốc có hoạt lực cao được lựa chọn là *Aspergillus aculeatus* BK-M₄ và *Penicillium implicatum* BK-M₁₂. Đã nghiên cứu xác định được một số đặc tính sinh lý và sinh hoá của các chủng đã tuyển chọn và một vài đặc tính enzym β -galactozidaza được tổng hợp.
2. Đã xây dựng được quy trình công nghệ lên men và quy trình công nghệ tách tinh chế thu chế phẩm enzym β -galactozidaza, với các thông số công nghệ chính là:
 - + Sử dụng chủng vi khuẩn *S. paucimobilis* BK16, lên men hiếu khí trên môi trường dịch thải phomat bổ xung thêm đường lactoza 15,4g/l; bổ xung pepton và NH₄NO₃ (theo tỉ lệ 3:1,41) để đạt hàm lượng nitơ tổng số 3,022g/l và điều chỉnh pH về giá trị pH=7; tỉ lệ cấp giống 5%, nhiệt độ lên men 30°C và kết thúc quá trình sau thời gian lên men là 36 giờ. Hiệu quả tích tụ enzym trong thực tế đạt 6420 MU/ml và khả năng tích tụ lý thuyết có thể đạt 7456 MU/ml.
 - + Phương trình điều chỉnh tối ưu cho quá trình lên men là:

$$Y = 5317,65 + 126,85.X_1 - 488,72.X_2 + 74,47.X_3$$

Với: Y là hoạt độ enzym tích tụ, MU/ml
 X_1 là hàm lượng lactoza bổ xung vào dịch thải phomat, g/l
 X_2 là hàm lượng pepton + NH₄NO₃ (tỉ lệ 3:1,41), g/l Tổng
 X_3 là pH môi trường

- + Kết thúc lên men ly tâm ở 8000v/ph, trong 10 phút để thu sinh khối; nghiền tế bào 10 phút, bằng siêu âm tần số 14kHz, trong đệm photphat pH=7 ở 4°C; rồi ly tâm thu dịch trong; kết tủa thu enzym bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 57,5%; loại muối; tách qua cột trao đổi ion cellulose Hiprep[®] 16/10 DEAE; rửa tách bằng dung dịch muối NaCl 2M với gradient nồng độ biến thiên từ 0,0-0,8M thu các phân đoạn tương ứng nồng độ muối tách trong khoảng 0,08-0,18M; loại muối rồi cô đặc thu chế phẩm enzym.
3. Đã thu được hai chủng nấm mốc *A. aculeatus* BK- M_4 và *P. implicatum* BK- M_{12} có khả năng sinh tổng hợp enzym β -galactozidaza bền nhiệt và đã xác định được một vài đặc tính của chúng là: $\text{pH}_{\text{opt}} = 4,7-6,0$, $t_{\text{opt}} = 55^\circ\text{C}$; bảo tồn >80% hoạt lực ở điều kiện trên sau 7 giờ và nồng độ galactosa cho phép dưới 3,0g/l.
4. Đã thử nghiệm kiểm tra sử dụng chế phẩm enzym β -galactozidaza để làm giảm hàm lượng đường lactosa trong sữa và thu được kết quả tốt; tuy nhiên vấn đề này cần được nghiên cứu chi tiết hơn.
5. Đã kết hợp sử dụng kinh phí đề tài vào việc đào tạo 02 thạc sĩ và 4 kỹ sư công nghệ sinh học. Đồng thời đã tạo điều kiện hỗ trợ tích cực trong việc thiết lập và triển khai hợp tác quốc tế (có giải trình bổ xung trong phần phụ lục).

V. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Tú Anh

Hoạt tính β -galactosidaza từ vi khuẩn và khả năng ứng dụng trong công nghiệp chế biến sữa

Luận văn thạc sĩ KHKT, Đại học Bách khoa Hà nội, Hà nội 2002

2. H. Nagano, M. Omori, Z. shori, T. Kawaguchi and M. Arai

Purification and characterization of β -galactosidaza from *Enterobacter cloacae* GAO

Biosci. Biotech. Biochem., 1992, 56(4), p.674-675

3. H. Nagano, M. Omori, Z. shori, T. Kawaguchi and M. Arai

Molecular cloning and nucleotide sequence of β -galactosidaza gene from *Enterobacter cloacae* GAO

Biosci. Biotech. Biochem., 1994, 58(10), p.1866-1869

4. J. Loveland, K. Gutshall, J. Kasmir, P. Prema and J.E. Brenchley

Characterization of psychrotrophic microorganisms producing β -galactosidaza activities

Applied environ. Microbiology, Jan. 1994, p.12-18

5. R.C. Dickson, L.R. Dickson and J.S. Markin

Purification and properties of an inducible β -galactosidaza isolated from the yeast *Kluyveromyces lactics*

Journal of bacteriology, Jan. 1979, p.51-61

6. J.E. Prenosil, E. Stuker and J.R. Bourne

Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose:

Part I: State of art

Biotech. And Bioengineering, 1987, Vol. 30, p.1019-1025

7. S. hekmat and D.J. McMahon

Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifridobacterium bifidum* in ice cream for use as probiotic food

Journal of dairy Sci., 1992, 75, p.1415-1422

8. R.G. Crittenden and M.J. Playne

Production, properties and application of food-grade oligosaccharides

Trends in Food Sci. & Techn., Nov. 1996, p.353-361