

MỘT SỐ TÍNH CHẤT HÓA LÝ CỦA LIPASE NGOẠI BÀO CHỦNG *GEOTRICHUM* SP. DTQ-26.3

Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Quyền Đình Thi

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Trong công bố trước, chủng nấm DTQ-26.3 sinh tổng hợp lipase cao nhất trong số 193 chủng vi sinh vật phân lập từ các mẫu đất và nước ở Việt Nam đã được xác định trình tự 26S rRNA và tối ưu các điều kiện sinh tổng hợp lipase. Trình tự phân đoạn 26S rRNA của chủng DTQ-26.3 cho thấy chủng này thuộc chi *Geotrichum*, và được đăng ký GenBank DQ640273 (*Geotrichum* sp. DTQ-26.3). Để có thể áp dụng lipase trong công nghiệp, một số tính chất hóa lý của lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 đã được xác định. Lipase ngoại bào chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 có hoạt tính cao nhất ở nhiệt độ 40°C, pH thích hợp cho enzyme hoạt động là 8 - 8,5. Enzyme bền ở nhiệt độ 30°C và ở pH 8,0. Lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 ưa thủy phân dầu olive nhất trong số các loại dầu thương mại được khảo sát. Nói chung, các ion kim loại đều ức chế lipase, hoạt tính mất đi một nửa đến một phần tư, đặc biệt hoạt tính lipase mất gần hết với 10 mM Pb^{2+} . Riêng ion kim loại Ca^{2+} với nồng độ 1 mM đã kích thích lipase, làm tăng 6% hoạt tính lipase. Dung môi hữu cơ khảo sát đều làm giảm hoạt tính lipase. Tween 20 có tác dụng hoạt hóa lipase, làm tăng 11% hoạt tính. Chất tẩy rửa SDS với nồng độ 1% kìm hãm lipase hoàn toàn.

Từ khóa: *Geotrichum* sp. DTQ-26.3, lipase, sinh tổng hợp, tính chất hóa lý

MỞ ĐẦU

Lipase (triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) là enzyme xúc tác thủy phân triglyceride thành diglyceride, monoglyceride hoặc glycerol và các acid béo tiếp diện phân pha dầu nước. Lipase phân bố rộng rãi trong tự nhiên, tuy nhiên chỉ lipase vi sinh vật có giá trị thương mại cao. Trong thị phần enzyme thế giới, lipase chiếm 5% và chỉ xếp sau protease và carbohydrase (Ghosh *et al.*, 1996).

Lipase từ các chủng *Geotrichum candidum* được biết đến là đặc hiệu cho phản ứng thủy phân của các acid béo không no với liên kết đôi cis ở vị trí thứ 9 (oleic, linoleic, linolenic acid) so với acid béo no tương ứng (stearic acid) (Jensen, 1974). Người ta có thể sử dụng chủng *G. candidum* sinh tổng hợp lipase cùng với những chủng nấm khác để làm sạch dầu nhiễm ở nước thải các nhà máy chế biến dầu olive (D'Annibale *et al.*, 2006). Chủng *Geotrichum* có thể được sàng lọc để tích tụ eicosapentaenoic acid (EPA) và docosahexaenoic acid (DHA) từ dầu cá vào lipid tế bào. Những chủng này rất thích hợp để tạo sinh khối giàu EPA và DHA sử dụng làm thức ăn gia súc (Guo *et al.*, 1999). Các dạng lipase có thể được sử dụng để tách đồng phân các hợp chất quan trọng như các đồng phân của ethyl 2-methyldecanoate

(Holmquist, Berglund, 1999), phân tách hỗn hợp các chất đồng phân linoleic acid (Haas *et al.*, 1999). Gen mã hóa lipase ở chủng *Geotrichum* có thể được chuyển vào nấm men sử dụng trong các quy trình sản xuất bánh mỳ, làm bánh mỳ phồng to hơn và ruột bánh đồng đều hơn (Monfort *et al.*, 1999).

Nhiều dạng lipase từ *Geotrichum* đã được tinh sạch để nghiên cứu tính chất hóa lý, tinh thể hóa, cấu trúc, chức năng đặc hiệu và nghiên cứu ứng dụng (Kazanina *et al.*, 1981; Lestrovaia *et al.*, 1983; Jacobsen *et al.*, 1989; Veeraragavan *et al.*, 1990; Baillargeon, McCarthy, 1991; Hedrich *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 2004).

Lipase từ *Geotrichum* là một trong những lipase sớm nhất được tinh thể hóa. Năm 1979, Hata và đồng tác giả đã thành công trong việc tinh thể hóa lipase chủng *G. candidum* đầu tiên trong các chủng *Geotrichum*. Đến năm 1991, Schrag và đồng tác giả đã tinh thể hóa được không gian ba chiều của một lipase từ chủng *G. candidum* với độ phân giải 2,2 Å (Schrag *et al.*, 1991). Trung tâm hoạt động của enzyme này chứa bộ ba amino acid Ser-His-Glu triad phổ biến đối với loại enzyme serine protease.

Cho tới nay, rất nhiều gen mã hóa lipase chủng *Geotrichum* hoặc gen mã hóa tương đồng thuộc

chủng *Candida*, *Galactomyces* đã được nhân dòng, phân tích trình tự, và biểu hiện cao dị chủ (Shimada *et al.*, 1989; Shimada *et al.*, 1990; Schrag *et al.*, 1991; Longhi *et al.*, 1992; Lotti *et al.*, 1993; Nagao *et al.*, 1993; Vernet *et al.*, 1993; Bertolini *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 1995; Fernandez *et al.*, 2006). Shimada và đồng tác giả (1989) đã nhân dòng, phân tích trình tự gen mã hóa lipase đầu tiên của chủng *Geotrichum* từ thư viện cDNA. cDNA nhân dòng mã hóa một protein gồm 554 amino acid và một trình tự tín hiệu kỵ nước gồm 19 amino acid. *Geotrichum* lipase chứa trình tự đặc trưng -Gly-X-Ser-X-Gly-, là một phần của vùng nhận biết giao diện lipid.

Tiếp theo, năm 1990, lipase II từ chủng *Geotrichum* cũng được nhân dòng (Shimada *et al.*, 1990). Lipase II cDNA nhân dòng mã hóa một protein cũng gồm 544 amino acid và một trình tự tín hiệu gồm 13 amino acid. Chiều dài chuỗi peptide của lipase I và II như nhau, độ tương đồng chung là 84%. Hơn nữa, bốn gốc Cys bảo thủ hoàn toàn, có thể tham gia hình thành cầu disulfide. Độ tương đồng cho thấy rằng các lipase này và *Candida cylindracea* lipase là những enzyme tương đồng và chúng cùng là thành viên của họ cholinesterase.

Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã phân lập được chủng nấm DTQ-26.3 có khả năng sinh tổng hợp lipase ngoại bào (Nguyễn Sỹ Lê Thanh *et al.*, 2006). Sau khi phân tích trình tự của phân đoạn gen 26S rRNA, chủng DTQ-26.3 được xếp vào chi *Geotrichum* với mã số GenBank DQ640273. Chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 sinh tổng hợp lipase tối thích sau 48 h nuôi cấy trong môi trường LB có bổ sung 0,5% dầu olive, ở 30°C, pH 5,0 (Nguyễn Sỹ Lê Thanh *et al.*, 2006). Nguồn nitrogen tốt nhất trong các nguồn được khảo sát là peptone. 0,5% (v/v) dầu olive kích thích sinh tổng hợp lipase cao nhất so với một số dầu được khảo sát. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá một số tính chất hóa lý cơ bản của lipase này để có thể ứng dụng vào công nghiệp cũng như đang tiến hành nhân dòng gen mã hóa lipase để nâng cao năng suất sinh tổng hợp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật và nuôi cấy

Chủng nấm *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 được phân lập và định tên ở Việt Nam trong một nghiên cứu trước đây (Nguyễn Sỹ Lê Thanh *et al.*, 2006). Chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 được nuôi cấy trong môi trường LB có bổ sung 0,5% (v/v) dầu

olive, ở 30°C, pH 5,0 và sau 48 h dịch nổi nuôi cấy được sử dụng để xác định một số tính chất hóa lý của lipase ngoại bào.

Hóa chất

Tryptone được mua từ Difco (Mỹ); cao nấm men từ Biorad (Mỹ); peptone và Tween 20 từ BioBasic Inc. (Mỹ); gum arabic từ Fluka Biochemika (Thụy Sĩ); SDS từ Sigma (Mỹ); Triton X-100 từ Merck (Đức). Các loại muối ion kim loại và dung môi hữu cơ đều tinh khiết từ Trung Quốc. Các loại dầu ăn tinh luyện được cung cấp từ các siêu thị địa phương.

Xác định hoạt tính lipase

Hoạt tính lipase được xác định bằng phương pháp chuẩn độ pH-stat tự động (Quyen *et al.*, 2005) với 5% (v/v) dầu olive làm cơ chất và 1% (w/v) gum arabic, ở 40°C, pH 8,0 trong 10 phút. Một đơn vị hoạt tính của enzyme là lượng enzyme để giải phóng 1 μ mol acid béo trong một phút ở điều kiện thí nghiệm.

Xác định cơ chất đặc hiệu

Để đánh giá tính đặc hiệu cơ chất của lipase, phản ứng được tiến hành với 5% (v/v) cơ chất khác nhau (dầu Meizan, olive, Neptune, dầu mè và dầu đậu nành) và 1% (w/v) gum arabic, 40°C, pH 8,0 trong 10 phút theo pH-stat.

Xác định nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt

Để xác định nhiệt độ tối thích, phản ứng được thực hiện theo pH-stat với 5% (v/v) dầu olive và 1% (w/v) gum arabic ở các nhiệt độ khác nhau từ 30 - 60°C, pH 8,0. Để xác định độ bền nhiệt của lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3, dịch enzyme được ủ từ 0 đến 24 h ở các nhiệt độ khác nhau 30 - 50°C, sau đó hoạt tính enzyme còn lại được xác định bằng pH-stat.

Xác định pH tối ưu và độ bền pH

Phản ứng được thực hiện theo pH-stat với 5% (v/v) dầu olive và 1% (w/v) gum arabic ở 40°C, với pH khác nhau từ 4,0 đến 10 (acetate: 4,0 - 5,0; phosphate: 6,0 - 8,0; Tris-HCl: 8,0 - 9,0; glycine: 10,0) để tìm pH tối ưu. Để tìm được đệm thích hợp cho việc bảo quản lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3, dịch enzyme được ủ ở 40°C trong đệm nồng độ 100 mM với pH khác nhau (acetate: 4,0; phosphate: 7,0 - 8,0). Hoạt tính còn lại được xác định

sau 1,5 đến 24 h ở 40°C.

Xác định ảnh hưởng ion kim loại

Để đánh giá mức độ ảnh hưởng của ion kim loại lên hoạt tính lipase, dịch enzyme được ủ cùng với muối của các ion kim loại (Ca^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+}) và EDTA ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 1 h ở các nồng độ 1 mM và 10 mM và sau đó hoạt tính còn lại được xác định theo phương pháp pH-stat như trên.

Xác định ảnh hưởng của dung môi hữu cơ

Để đánh giá ảnh hưởng của dung môi hữu cơ lên hoạt tính lipase, dịch enzyme được ủ với 10 - 30% dung môi hữu cơ (methanol, ethanol, 2-propanol và acetone) ở nhiệt độ 30°C, sau 3 h hoạt tính còn lại được xác định theo pH-stat như trên.

Xác định ảnh hưởng của chất tẩy rửa

Dịch enzyme được ủ với 1% (v/v) chất tẩy rửa Tween 80, Triton X-100 hay SDS ở nhiệt độ 30°C, sau 1 h, hoạt tính còn lại được xác định để đánh giá ảnh hưởng của chúng lên hoạt tính lipase.

KẾT QUẢ

Cơ chất đặc hiệu

Lipase là enzyme có tính đặc hiệu nhóm tương đối. Do các loại dầu khác nhau về thành phần và hàm lượng acid béo, số liên kết no và không no cho nên đối với mỗi loại dầu khác nhau thì khả năng phân giải của cùng một lipase cũng khác nhau.

Lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 có hoạt

tính đặc hiệu cao nhất đối với dầu olive (37,9 U/ml), sau đó đến dầu Meizan (31,2 U/ml), dầu Neptune (26,9 U/ml), dầu đậu nành (23,8 U/ml), và cuối cùng là dầu mè (8,8 U/ml) (Hình 1).

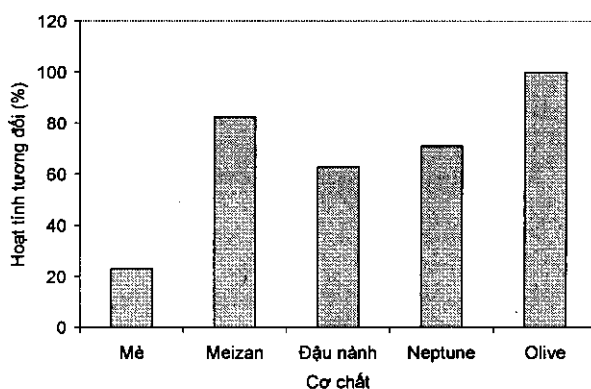
Nhiệt độ tối ưu

Ở nhiệt độ 30°C, hoạt tính lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 đạt 27,3 U/ml (72%). Hoạt tính tăng dần lên và đạt tối đa ở nhiệt độ 40°C (37,9 U/ml) (Hình 2). Khi nhiệt độ phản ứng tiếp tục tăng lên 45°C, hoạt tính đột ngột giảm xuống còn 43% và ổn định tới 50°C (36%) và giảm mạnh xuống 9% ở 55°C. Hoạt tính tối thích của lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 là 40°C.

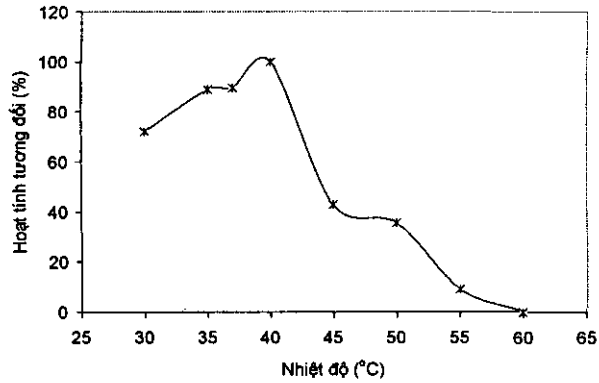
Độ bền nhiệt

Dưới tác động của nhiệt độ, enzyme đều bị biến tính ít nhiều và ảnh hưởng tới hoạt tính. Nhiệt độ có thể làm cho một số liên kết hydrogen trong mạng lưới liên kết hydrogen tham gia vào việc giữ vững cấu trúc của enzyme bị đứt gãy. Mức độ ảnh hưởng tùy thuộc vào nhiệt độ và thời gian ủ enzyme. Lipase chủng *Geotrichum* DTQ-26.3 được ủ trong đệm pH 8,0 ở các nhiệt độ khác nhau 30, 40 và 50°C (Hình 3).

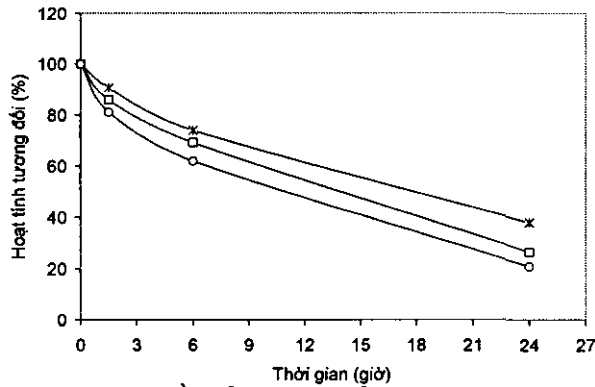
Đồ thị hoạt tính của enzyme ở các nhiệt độ 30, 40 và 50°C theo thời gian rất tương tự nhau (Hình 3), đều giảm tuyến tính theo thời gian, nhưng nhiệt độ ủ càng cao, hoạt tính càng giảm càng nhiều. Sau 1,5 h ủ ở 30 - 50°C, hoạt tính enzyme giảm nhẹ 9 - 19%, sau 6 h ủ, hoạt tính giảm 26 - 38% và sau 24 h ủ, hoạt tính còn lại chỉ bằng 20 - 38% so với hoạt tính ban đầu (Hình 3). Đây là một enzyme kém bền nhiệt, không thể bảo quản bình thường ở nhiệt độ phòng.



Hình 1. Hoạt tính đặc hiệu cơ chất của lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng lên hoạt tính lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.

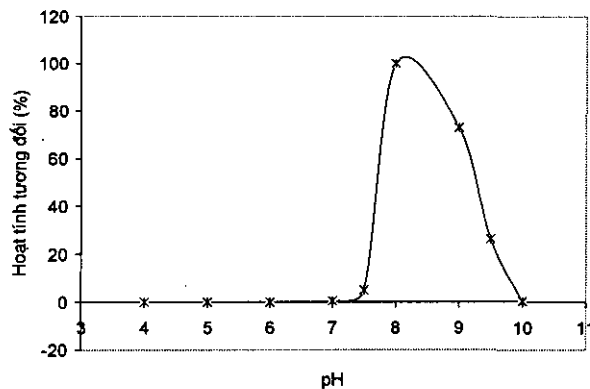


Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên độ bền của lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3. *: 30°C; □: 40°C; ○: 50°C.

pH tối ưu

pH môi trường phản ứng ảnh hưởng rất lớn đến hoạt tính enzyme vì nó ảnh hưởng đến mức độ ion hóa cơ chất, enzyme và ảnh hưởng đến độ bền của cấu trúc protein. Để xác định pH phản ứng tối ưu, thực hiện phản ứng enzyme với các pH khác nhau từ pH 4,0 đến 10,0.

Ở độ pH acid (4,0 - 6,5) enzyme bị biến tính hoàn toàn, hầu như không còn hoạt tính (Hình 4). Hoạt tính lipase tăng đột ngột sau pH 7,5 và đạt tối ưu ngay ở pH 8,0 (37,9 U/ml). Sau đó hoạt tính lipase giảm mạnh xuống còn một phần tư ở pH 9,5 và mất hết hoạt tính ở pH 10,0. Như vậy pH tối ưu cho lipase là pH 8,0 - 8,5. Đây là loại lipase ưa kiềm (Hình 4).

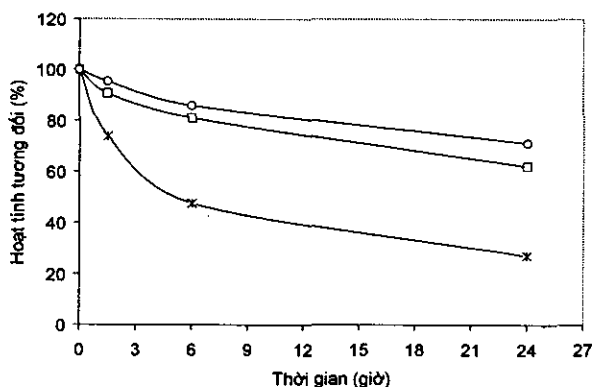


Hình 4. Ảnh hưởng của pH phản ứng lên hoạt tính lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.

Độ bền pH

Do pH môi trường ảnh hưởng đến độ bền của enzyme nên việc lựa chọn môi trường đệm pH thích hợp để bảo quản enzyme là rất quan trọng. Có những loại lipase bền trong môi trường acid (2,0 - 6,0); có

loại bền trong môi trường trung tính và có loại lại bền trong môi trường kiềm. Ở đây chúng tôi khảo sát độ bền hoạt tính của lipase trong các đệm khác nhau với pH 4,0; 7,0 và 8,0. Sau một thời gian nhất định ủ cùng với đệm ở 40°C, hoạt tính còn lại của dịch enzyme được xác định (Hình 5).



Hình 5. Ảnh hưởng của pH lên độ bền của lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3. *: pH 4,0; □: pH 7,0; ○: pH 8,0.

Đồ thị hoạt tính lipase còn lại theo thời gian ở hai độ pH 7,0 và 8,0 nói chung rất giống nhau (Hình 5). Ở pH 8,0 lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 tương đối bền, sau 24 h ủ hoạt tính còn lại là 71% trong khi ở pH 4 hoạt tính lipase còn 74% sau 1,5 h ủ và giảm mạnh còn 27% sau 24 h ủ (Hình 5). Như vậy, lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 bền ở pH hơi kiềm 8,0.

Ảnh hưởng của ion kim loại

Ion kim loại thường ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme. Đối với lipase thì ion kim loại không tham gia hình thành cấu trúc, nó tác dụng chủ yếu giữ vững cấu hình không gian, tăng tốc độ phản ứng thông qua tạo phức với cơ chất hoặc tham gia cầu nối kết hợp cơ chất với enzyme. Để nghiên cứu ảnh hưởng của ion kim loại tới hoạt tính lipase, dịch enzyme được bổ sung 1 mM và 10 mM ion kim loại. Sau 1,5 h ủ ở nhiệt độ 30°C, hoạt tính còn lại được xác định và kết quả được trình bày trên bảng 1.

Ion Ca^{2+} với nồng độ 1 mM làm tăng hoạt tính enzyme lên 6%, nhưng với nồng độ 10 mM làm giảm hoạt tính xuống còn 77%. Ion Pb^{2+} với nồng độ thấp 1 mM làm giảm 11% hoạt tính enzyme và với nồng độ 10 mM thì hầu như mất hết hoạt tính, có thể tại nồng độ quá cao làm thay đổi cấu hình không gian của enzyme hay ngăn chặn tiếp xúc giữa cơ chất với enzyme.

Các ion Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} hay Cu^{2+} đều có tác dụng ức chế lipase, nồng độ càng cao hoạt tính enzyme càng giảm. Hoạt tính enzyme giảm mất một phần tư đến một nửa (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của ion kim loại lên hoạt tính của lipase.

Ion kim loại	Hoạt tính lipase còn lại (%) ở nồng độ kim loại	
	1 mM	10 mM
Ca^{2+}	106	77
Pb^{2+}	89	3
Mg^{2+}	89	60
Na^+	78	60
Zn^{2+}	69	53
Cu^{2+}	49	48
EDTA	106	124

Chất tạo gong kim EDTA có tác dụng hoạt hóa enzyme, làm tăng hoạt tính của enzyme lên 6 - 24% tương ứng với nồng độ 1 mM và 10 mM. Điều này cho thấy lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 không cần các ion kim loại kép trong phản ứng xúc tác của nó.

Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ

Các dung môi hữu cơ khác nhau tác động một phần làm giảm hoạt tính enzyme. Để đánh giá ảnh hưởng của dung môi hữu cơ lên hoạt tính lipase, dịch enzyme được bổ sung 30% (v/v) dung môi hữu cơ. Sau 3 h ở nhiệt độ 30°C, hoạt tính còn lại được xác định (Hình 6).

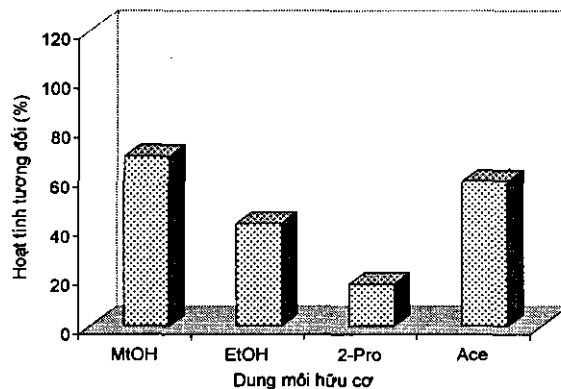
Bổ sung 30% (v/v) methanol hoặc acetone vào dịch enzyme (Hình 6), hoạt tính mất đi khoảng một phần ba (Hình 6), còn đối với ethanol, hoạt tính mất đi khoảng hai phần ba. Riêng bổ sung 30% (v/v)

isopropanol, hoạt tính chỉ còn 17%.

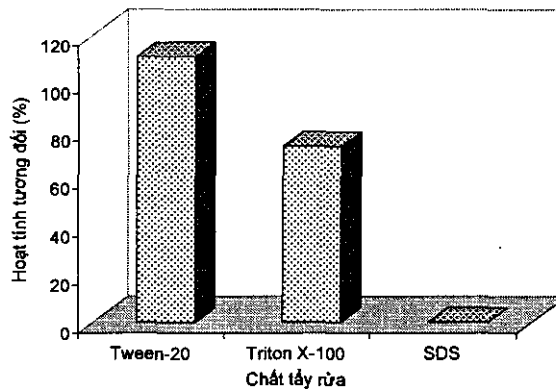
Ảnh hưởng của chất tẩy rửa

Để đánh giá ảnh hưởng của chất tẩy rửa tới hoạt tính lipase, dịch enzyme được ủ với chất tẩy rửa (SDS, Triton X-100, Tween 20). Sau 1,5 h ở 30°C, hoạt tính còn lại được xác định (Hình 7).

Bổ sung 1% (w/v) SDS làm mất hoàn toàn hoạt tính enzyme (Hình 7). Bổ sung 1% (w/v) Triton X-100 ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính lipase, làm giảm 27% còn Tween 20 lại làm tăng hoạt tính lipase lên 11% (Hình 7).



Hình 6. Ảnh hưởng của các dung môi hữu cơ methanol (MeOH), ethanol (EtOH), 2-propanol (2-Pro) và acetone (Ace) lên hoạt tính lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.



Hình 7. Ảnh hưởng của chất tẩy rửa lên hoạt tính lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.

THẢO LUẬN

Lipase chủng *G. marinum* có tính đặc hiệu cơ chất đối với các triglyceride chứa mỗi liên kết đôi cis trong mạch bên của acid béo, và tốc độ phản ứng

tăng lên với số liên kết đôi tăng lên trong mạch bên (Huang *et al.*, 2004). Lipase ưa các liên kết ester ở các vị trí sn-1 và sn-3 hơn là liên kết ester ở vị trí sn-2. Lipase chủng *Geotrichum candidum* NRRL Y-553 có tính đặc hiệu thủy phân 4-methylumbelliferyl

esters của oleic acid hơn là palmitic acid theo tỷ lệ 20:1 (Baillargeon, McCarthy, 1991). Trong nghiên cứu của chúng tôi, lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 cũng có tính đặc hiệu cao nhất đối với dầu olive hơn các loại dầu còn lại. Lipase ngoại bào A và C được sinh tổng hợp từ chủng *Geotrichum* sp. FO401B lần lượt có vị trí đặc hiệu ở sn-1,3 và sn-2 của triglyceride (Ota *et al.*, 2000). Lipase C thủy phân mỡ tự nhiên trừ dầu cá sardine ở vị trí sn-2, nhưng cũng có một ít hoạt tính đồng phân lập thể đối với triolein.

Các enzyme lipase chủng *Geotrichum* nói chung có nhiệt độ phản ứng tối ưu tương đối thấp, chỉ trong khoảng trên dưới 40°C (Huang *et al.*, 2004). Gopinath *et al.* (2003) thông báo lipase chủng *G. candidum* có nhiệt độ tối ưu ở 40°C. Trong khi đó, lipase B tái tổ hợp từ chủng *G. candidum* biểu hiện trong *P. pastoris* có nhiệt độ tối ưu vào khoảng 43°C (Catoni *et al.*, 1997). Enzyme này có độ bền nhiệt ở dải nhiệt độ thấp hơn 35°C. Ngược lại, lipase từ chủng *Geotrichum* R59 rất bền nhiệt và cho thấy hoạt tính rất cao sau 1 h ở 60°C (Ginalska *et al.*, 2004). Lipase từ *G. asteroides* cũng khá bền, nó không mất hoạt tính ở 4°C sau một năm bảo quản. Nhiệt độ tối thích của chế phẩm enzyme là 37°C (Ksandopulo, Ruban, 1979). Lipase chủng DTQ-26.3 có nhiệt độ tối thích là 40°C, nhưng kém bền nhiệt, chỉ bền ở nhiệt độ không quá 30°C.

pH tối thích của các phản ứng xúc tác bởi các dạng lipase từ các chủng *Geotrichum* khác nhau được tìm thấy trong dãy pH 6,0 - 7,0 và giữa 8,0 và 8,5, một ví dụ là chủng ATCC 34614 (Sugihara *et al.*, 1990). Veeraragavan *et al.* (1990) đã tinh sạch được hai lipase từ chủng *Geotrichum candidum* Lipase I và II có các giá trị pH tối ưu lần lượt là 6,0 và 6,8 thuộc dải trung tính - acid nhẹ. Các dạng lipase chủng *G. candidum* có độ bền pH trong dãy 6,0 và 8,0 (Veeraragavan *et al.*, 1990). Ở dải pH acid (pH < 5,0) và kiềm (pH > 9,0), các dạng lipase bị biến tính hoàn toàn. Hedrich và đồng tác giả (1991) đã sinh tổng hợp một lượng lớn lipase chủng *G. candidum*, xác định tính chất và tính thể hóa. Lipase này có giá trị pH tối thích là 8,0 và 8,5 đối với enzyme đã khử gốc glycosyl. Gopinath và đồng tác giả (2003) cũng tinh sạch được lipase chủng *G. candidum* và xác định được pH tối thích 7,0 và bền ở dãy pH 6,5 - 8,5 ở 30°C trong 24 h. Lipase B tái tổ hợp chủng *G. candidum* trong *P. pastoris* có pH tối thích 8,5 - 9,0 và độ bền pH ở dải pH 7,5 - 8,5 (Catoni *et al.*, 1997). Lipase từ *G. asteroides* hoạt

động tối thích ở pH 8,0; nó giữ nguyên hoạt tính khi bảo quản 3 h ở trong một môi trường phản ứng với pH từ 3 đến 10 (Ksandopulo, Ruban, 1979). Lipase chủng DTQ26.3 cũng có pH tối ưu (pH 8,0) tương tự như lipase từ các chủng *G. candidum* khác và cũng có độ bền pH thuộc dải 7,0 - 8,0.

Các ion đơn trị có ảnh hưởng thấp đến hoạt tính của các lipase từ chủng *G. candidum* (Veeraragavan *et al.*, 1990), trong khi đó EDTA chỉ với nồng độ trên 10 mM đã ức chế đáng kể cả hai dạng enzyme. Mặt khác, các ion lưỡng trị ở nồng độ trên 50 mM mới thể hiện khả năng ức chế hoạt tính lipase. Sodium dodecyl sulfate ở nồng độ thấp hơn 10 mM ức chế hoàn toàn hoạt tính lipase (Veeraragavan *et al.*, 1990).

Các cation Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , và Mg^{2+} ở 6 mM kích thích hoạt tính lipase, nhưng Na^+ , K^+ ở 500 mM và Fe^{2+} , Mn^{2+} ở 6 mM lại làm giảm hoạt tính lipase từ chủng *G. marinum* (Huang *et al.*, 2004). Chất hoạt động bề mặt anionic, taurocholic acid, và chất hoạt động bề mặt zwitterionic, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, làm tăng hoạt tính với 0,1 mM. Các chất hoạt động bề mặt anionic khác như SDS, sodium dioctyl sulfosuccinate, các chất hoạt động bề mặt cationic methylbenzethonium bromide, cetyltriethyl ammonium bromide, và chất hoạt động bề mặt nonionic Tween 20, Triton X100 ức chế hoạt tính lipase ở các mức độ khác nhau (Huang *et al.*, 2004). Gopinath *et al.* (2003) thấy rằng hoạt tính enzyme từ chủng *G. candidum* bị ức chế mạnh bởi AgNO_3 , NiCl_2 , HgCl_2 , và EDTA. Tuy nhiên, sự có mặt của các ion Ca^{2+} và Ba^{2+} lại làm tăng hoạt tính enzyme.

KẾT LUẬN

Lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 với cơ chất là dầu olive hoạt động tốt ở nhiệt độ 40°C và pH 8, bền ở 30°C và pH 7 - 8.

Các dung môi hữu cơ khảo sát đều làm giảm hoạt tính lipase chủng *Geotrichum* sp. DTQ-26.3.

Các ion kim loại nói chung đều làm giảm hoạt tính lipase, trừ Ca^{2+} .

Bổ sung 1 mM và 10 mM chất tạo gong kim EDTA lần lượt làm tăng hoạt tính của enzyme lên 6 và 24%.

SDS làm mất hoàn toàn hoạt tính enzyme, Tween 20 lại làm tăng hoạt tính lipase.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài VNB04/B05, nhiệm vụ hợp tác quốc tế về khoa học và công nghệ theo nghị định thư năm 2006 - 2008 của Bộ Khoa học và Công nghệ. Nhóm tác giả cảm ơn Quỹ Khoa học Quốc tế IFS đã tài trợ dự án thiết bị F/3411-2 năm 2005.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baillargeon MW, McCarthy SG (1991) *Geotrichum candidum* NRRL Y-553 lipase: purification, characterization and fatty acid specificity. *Lipids* 26(10): 831-836.
- Bertolini MC, Laramée L, Thomas DY, Cygler M, Schrag JD, Vernet T (1994) Polymorphism in the lipase genes of *Geotrichum candidum* strains. *Eur J Biochem* 219(1-2): 119-125.
- Catoni E, Schmidt-Dannert C, Brocca S, Schmid RD (1997) Overexpression of lipase A and B of *Geotrichum candidum* in *Pichia pastoris*: High-level production and some properties of functional expressed lipase B. *Biotechnol Techniq* 11(9): 689-695.
- D'Annibale A, Sermanni GG, Federici F, Petruccioli M (2006) Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresour Technol* 97(15): 1828-1833.
- Fernandez L, Perez-Victoria I, Zafra A, Benitez PL, Morales JC, Velasco J, Adrio JL (2006) High-level expression and characterization of *Galactomyces geotrichum* (BT107) lipase I in *Pichia pastoris*. *Prot Expr Purif* 49(2): 256-264.
- Ghosh PK, Saxena TK, Gupta R, Yadav RP, Davidson S (1996) Microbial lipases: production and applications. *Sci Prog* 79: 119-157.
- Ginalska G, Bancierz R, Kornilowicz-Kowalska T (2004) A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum*-like strain, R59. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31(4): 177-182.
- Gopinath SCB, Hilda A, Lakshmi priya T, Annadurai G, Anbu P (2003) Purification of lipase from *Geotrichum candidum*: conditions optimized for enzyme production using Box-Behnken design. *World J Microbiol Biotechnol* 19: 681-689.
- Guo X, Tomonaga T, Yanagihara Y, Ota Y (1999) Screening for yeasts incorporating the exogenous eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from crude fish oil. *J Biosci Bioeng* 87(2): 184-188.
- Haas MJ, Kramer JK, McNeill G, Scott K, Foglia TA, Sehat N, Fritsche J, Mossoba MM, Yurawecz MP (1999) Lipase-catalyzed fractionation of conjugated linoleic acid isomers. *Lipids* 34(9): 979-987.
- Hata Y, Matsuura Y, Tanaka N, Kakudo M, Sugihara A, Iwai M, Tsujisaka Y (1979) Low resolution crystal structure of lipase from *Geotrichum candidum* (ATCC34614). *J Biochem (Tokyo)* 86(6): 1821-1827.
- Hedrich HC, Spener F, Menge U, Hecht HJ, Schmid RD (1991) Large-scale purification, enzymic characterization, and crystallization of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Enzyme Microb Technol* 13(10): 840-847.
- Holmquist M, Berglund P (1999) Creation of a synthetically useful lipase with higher than wild-type enantioselectivity and maintained catalytic activity. *Org Lett* 1(5): 763-765.
- Huang Y, Locy R, Weete JD (2004) Purification and characterization of an extracellular lipase from *Geotrichum marinum*. *Lipids* 39(3): 251-257.
- Jacobsen T, Olsen J, Allermann K, Poulsen OM, Hau J (1989) Production, partial purification, and immunochemical characterization of multiple forms of lipase from *Geotrichum candidum*. *Enzyme Microb Technol* 11(2): 90-95.
- Jensen RG (1974) Characteristics of the lipase from the mold, *Geotrichum candidum*: a review. *Lipids* 9(3): 149-157.
- Kazanina GA, Petrova Lia, Selezneva AA, Ruban EL, Volkova IM (1981) Isolation and characterization of lipase from *Geotrichum asteroides* FKM F-144. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 17(4): 516-622.
- Ksandopulo G, Ruban EL (1979) Some properties of lipase from *Geotrichum asteroides*. *Biol Bull Acad Sci USSR* 6(2): 261-264.
- Lestrovaia NN, Lebedeva ZhD, Volkova IM, Aren AK, Bukbarde VU (1983) Purification of lipase of microbial origin by silochrome chromatography. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 19(1): 130-135.
- Longhi S, Fusetti F, Grandori R, Lotti M, Vanoni M, Alberghina L (1992) Cloning and nucleotide sequences of two lipase genes from *Candida cylindracea*. *Biochim Biophys Acta* 1131(2): 227-232.

- Lotti M, Grandori R, Fusetti F, Longhi S, Brocca S, Tramontano A, Alberghina L (1993) Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences. *Gene* 124(1): 45-55.
- Monfort A, Blasco A, Sanz P, Prieto JA (1999) Expression of LIP1 and LIP2 genes from *Geotrichum* species in Baker's yeast strains and their application to the bread-making process. *J Agric Food Chem* 47(2): 803-808.
- Nagao T, Shimada Y, Sugihara A, Tominaga Y (1993) Cloning and sequencing of two chromosomal lipase genes from *Geotrichum candidum*. *J Biochem (Tokyo)* 113(6): 776-780.
- Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Quyền Đình Thi, Trương Thị Bích Huệ (2006) Tối ưu một số điều kiện nuôi cấy chủng nấm *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 sinh tổng hợp lipase. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 4(4): 455-462.
- Ota Y, Sawamoto T, Hasuo M (2000) Tributyrin specifically induces a lipase with a preference for the sn-2 position of triglyceride in *Geotrichum* sp. FO401B. *Biosci Biotechnol Biochem* 64(11): 2497-2249.
- Phillips A, Pretorius GH, van Rensburg HG (1995) Molecular characterization of a *Galactomyces geotrichum* lipase, another member of the cholinesterase/lipase family. *Biochim Biophys Acta* 1252(2): 305-311.
- Quyen DT, Le TTG, Nguyen TT, Oh TK, Lee JK (2005) High-level heterologous expression and properties of a novel lipase from *Ralstonia* sp. M1. *Prot Expr Purif* 39: 97-106.
- Schrag JD, Li YG, Wu S, Cygler M (1991) Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* 351(6329): 761-764.
- Shimada Y, Sugihara A, Iizumi T, Tominaga Y (1990) cDNA cloning and characterization of *Geotrichum candidum* lipase II. *J Biochem (Tokyo)* 107(5): 703-707.
- Shimada Y, Sugihara A, Tominaga Y, Iizumi T, Tsunasawa S (1989) cDNA molecular cloning of *Geotrichum candidum* lipase. *J Biochem (Tokyo)* 106(3): 383-388.
- Sugihara A, Shimada Y, Tominaga Y (1990) Separation and characterization of two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase. *J Biochem (Tokyo)* 107(3): 426-430.
- Veeraragavan K, Colpitts T, Gibbs BF (1990) Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochim Biophys Acta* 1044(1): 26-33.
- Vernet T, Ziomek E, Recktenwald A, Schrag JD, de Montigny C, Tessier DC, Thomas DY, Cygler M (1993) Cloning and expression of *Geotrichum candidum* lipase II gene in yeast. Probing of the enzyme active site by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 268(35): 26212-26219.

SOME PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF AN EXTRACELLULAR LIPASE FROM *GEOTRICHUM* SP. DTQ-26.3

Nguyen Sy Le Thanh, Quyen Dinh Thi*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

In a previous study, partial sequence of 26S rRNA of the yeast strain DTQ-26.3 showing the highest lipase production among 193 microbial strains isolated from soil and wastewater samples in Vietnam was determined and some culture conditions were optimized. The partial sequence of 26S rRNA indicated that the strain belonged to the genus *Geotrichum*, and deposited in GenBank with an accession number DQ640273 (*Geotrichum* sp. DTQ-26.3). To be applicable in the industry, some most important physicochemical properties of the extracellular lipase from the strain *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 were determined. The extracellular lipase from *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 had activity maximum at 40°C, and pH 8.0. The enzyme was stable at pH 8.0 but not thermostable. The lipase from *Geotrichum* sp. DTQ-26.3 preferably hydrolyzed olive among tested commercial oils. In general, metal ions inhibited the

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7568260; Fax: 84-4-8363144; E-mail: quyen@ibt.ac.vn

lipase. Its activity lost from one fourth to one half, especially lipase activity lost completely with addition of 10 mM Pb^{2+} . Metal ion Ca^{2+} at the concentration of 1 mM stimulated lipase slightly, increased the lipase activity by 6%. Tested organic solvents decreased the lipase activity. Tween 20 had an effect to activate the lipase, increased the lipase activity by 11%. The addition of 1% of the detergent SDS inhibited lipase completely.

Keywords: *Geotrichum sp. DTQ-26.3, lipase, physicochemical properties, production*