

TUYỂN CHỌN VÀ NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN LÊN MEN SINH TỔNG HỢP TYROSINASE TỪ CHỦNG NẤM MỐC *ASPERGILLUS ORYZAE* TP1

TRINH THỊ THU HÀNG, ĐẶNG THỊ THU, NGUYỄN THỊ XUÂN SÂM,
ĐỖ THỊ THU HÀ, TRẦN THỊ THUYẾT NGÀ

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tyrosinase (EC 1.14.18.1) là enzym oxi hoá khử thuộc nhóm polyphenol oxidase (PPO) còn được gọi là monophenol oxidase, cresolase, oxygen oxidoreductase. Nó có khả năng xúc tác cho phản ứng hydroxyl hóa các monophenol thành diphenol và oxy hóa diphenol thành dopaquinone [4].

Tyrosinase được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực. Trong y học, người ta sử dụng tyrosinase để sản xuất L-DOPA là một chất có khả năng điều trị bệnh Parkinson. Ngoài ra enzym này còn có khả năng tổng hợp nên sắc tố hình thành màu tóc, màu da... Trong công nghiệp thực phẩm enzym này được sử dụng làm tăng hương vị sản phẩm trong sản xuất cà phê, trà, cacao... Trong nông nghiệp và xử lý môi trường, enzym này được dùng để phát hiện nhanh và xử lý các hợp chất monophenol tồn dư trong rau quả, trong đất và trong nước [1-3].

Tyrosinase có thể thu từ nhiều nguồn khác nhau: thực vật, động vật và vi sinh vật. Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu thu chế phẩm Tyrosinase từ thực vật chủ yếu là từ nấm ăn. Tuy nhiên, Tyrosinase từ vi sinh vật là một nguồn thu vô cùng phong phú, thời gian ngắn có thể thu được một lượng lớn chế phẩm enzym [3]. Bài báo này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu thu nhận Tyrosinase từ chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Chủng vi sinh vật

38 chủng vi sinh vật bao gồm 32 chủng trong bộ sưu tập giống của ĐH Bách Khoa Hà Nội và 06 chủng phân lập từ cây gỗ mục.

2.1.2. Hoá chất

- Các hóa chất cần thiết như: L-DOPA, Catechol, Sacharose, glucose, cao nấm men, pepton, acid ascorbic... của hãng Sigma (Mỹ), Merck (Đức) và nhiều hóa chất khác của Trung Quốc.

- Môi trường giữ giống PDA (g/l): glucose 20, agar 20, dịch chiết khoai tây 1000 ml, pH 7.

- Môi trường hoạt hóa (g/l): trisodium citrat 2,5, NaNO₃ 3, MgSO₄.7H₂O 0,5, KCl 0,5, FeSO₄.7H₂O 0,01, K₂HPO₄ 1, pH 7.

- Môi trường lên men (g/l) (Môi trường Vogel) [3]: glucose 20, trisodium citrat 2,5, cao nấm men 1, NH₄NO₃ 2, KH₂PO₄ 5, (NH₄)₂SO₄ 1, MgSO₄.7H₂O 0,2, pH 5

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Tuyển chọn sơ bộ các chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp tyrosinase bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc phản ứng enzym với cơ chất đặc hiệu tạo ra sản phẩm không bắt màu với thuốc nhuộm lugol.

- Nuôi cấy nấm mốc trên môi trường sinh tổng hợp tyrosinase theo phương pháp lên men chìm. Tyrosinase trong nấm mốc *A. oryzae* là enzym nội bào nên được thu nhận bằng phương pháp nghiền kết hợp với siêu âm trong đệm phosphat.

- Xác định hoạt độ tyrosinase bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 265 nm [5]. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc L-DOPA + O₂ + Axit ascorbic dưới tác dụng của tyrosinase tạo thành o-Benzoquinone + H₂O + Dehydro axit ascorbic.

$$\text{Hoạt độ enzym: } U/ml = \frac{\Delta A_{265}(TN) - \Delta A_{265}(KC)}{(0,001).(0,1)}$$

trong đó: 0,001: Hệ số chuyển đổi của mật độ quang tại A_{265nm} trên một đơn vị hoạt độ của Tyrosinase trong thể tích phản ứng là 3,0 ml ở nhiệt độ 25°C, pH 6,5; 0,1 : Thể tích enzym phản ứng.

Một đơn vị hoạt độ Tyrosinase được đo bằng sự hấp thụ mật độ quang tại bước sóng 265 nm của lượng o-Benzoquinone được giải phóng trong 3 ml dung dịch phản ứng chứa L-DOPA và L-ascorbic axit ở pH 6,5 và 25°C .

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn chủng sinh tổng hợp tyrosinase

Bảng 1. Hoạt độ Tyrosinase của các chủng vi sinh vật

Số TT	Chủng vi sinh vật	Hoạt độ tổng (U) (trên 50 ml dịch enzym thô)	Bán kính vòng phân giải (R-r) (cm)
1	<i>Bacillus subtilis</i>	5635	0,55
2	<i>Bacillus nato</i>	5100	0,50
3	<i>Azotobacter</i>	2915	0,30
4	<i>Phenol bùn</i>	5835	0,57
5	<i>Rhizobium</i>	2885	0,30
6	<i>Aspergillus oryzae BK</i>	5900	0,60
7	<i>Aspergillus oryzae TN</i>	5865	0,57
8	<i>Aspergillus oryzae TPI</i>	6635	0,70
9	<i>Neurospora sitophila</i>	6015	0,60
10	Chủng phân lập số 1	4535	0,42
11	Chủng phân lập số 2	3515	0,33
12	Chủng phân lập số 3	5215	0,57
13	Chủng phân lập số 4	3365	0,34
14	Chủng phân lập số 5	2285	0,25
15	Chủng phân lập số 6	2815	0,30

Từ 38 chủng vi sinh vật trong bộ sưu tập giống của phòng thí nghiệm Hóa sinh và sinh học phân tử Viện CNSH – CNTP ĐH Bách khoa HN và 6 chủng nấm mốc phân lập được chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng sinh tổng hợp Tyrosinase bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả cho thấy có 15 chủng có hoạt tính tyrosinase trong đó chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae* TP1 có bán kính vòng phân giải lớn nhất 0,7 cm (bảng 1).

Để lựa chọn chính xác hơn chủng có hoạt tính Tyrosinase cao, chúng tôi xác định hoạt độ tyrosinase của 15 chủng có hoạt tính bằng phương pháp đo quang. Kết quả thể hiện ở bảng 1.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy chủng hơn các chủng còn lại. Điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả thử hoạt tính thông qua bán kính vòng phân giải. Vì vậy chúng tôi lựa chọn chủng *Aspergillus oryzae* TP1 làm đối tượng nghiên cứu. *Aspergillus oryzae* TP1 cho hoạt tính của Tyrosinase cao.

3.2. Nghiên cứu điều kiện nuôi *Aspergillus oryzae* TP1 sinh tổng hợp tyrosinase cao

3.2.1. Ảnh hưởng của nguồn cacbon

Thí nghiệm được tiến hành trên môi trường Vogel với nguồn cacbon thay đổi, sau 48 giờ chúng tôi thu sinh khối và xác định hoạt độ enzym thô. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

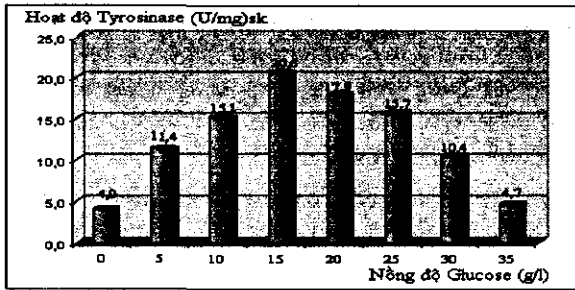
Bảng 2. Ảnh hưởng của nguồn cacbon

Số TT	Nguồn Cacbon	Nồng độ (g/l)	Hoạt độ (U/mgsk)
1	Glucose	20	14,8
2	Saccarose	20	10,5
3	Maltose	20	15,0
4	Lactose	20	14,7
5	Trisodium citrate	20	8,8
6	Glucose & Trisodium citrate	10 + 10	17,9
7	Saccarose & Trisodium citrate	10 + 10	11,7
8	Maltose & Trisodium citrate	10 + 10	13,9
9	Lactose & Trisodium citrate	10 + 10	15,0

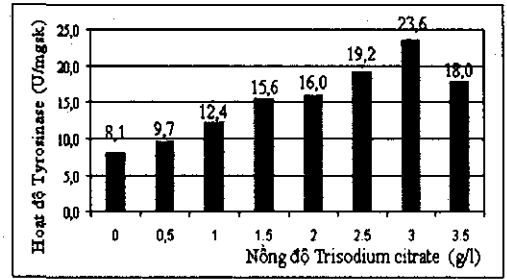
Chủng *A. oryzae* TP1 có khả năng sinh tổng hợp tyrosinase trên tất cả các nguồn cacbon dùng thí nghiệm. Tuy nhiên chúng tôi nhận thấy khi sử dụng kết hợp 2 nguồn cacbon là glucose và trisodium citrat thì tyrosinase tổng hợp được là cao nhất, đạt tới 17,9 U/mgsk. Điều này phù hợp với nguồn cacbon của môi trường gốc [3].

3.2.2 Ảnh hưởng của nồng độ glucose và trisodium citrat

Tiến hành nuôi lắc *Aspergillus oryzae* TP1 trong môi trường Vogel với nguồn cacbon vừa khảo sát, nồng độ glucose và trisodium citrat lần lượt thay đổi. Kết quả thu được biểu diễn ở đồ thị 1 và đồ thị 2



Đồ thị 1. Ảnh hưởng của nồng độ glucose



Đồ thị 2. Ảnh hưởng của nồng độ Trisodium citrate

Kết quả hình 1 và 2 cho thấy hoạt độ enzym tăng dần khi tăng nồng độ nguồn cacbon. Khi tăng nồng độ glucose tới 15 g/l và trisodium citrat 3 g/l thì hoạt độ tyrosinase đạt cao nhất (20,6 và 23,6 U/mgsk). Khi tiếp tục tăng nồng độ glucose và trisodium citrat thì hoạt độ giảm dần. Có thể khi nồng độ cao sẽ ức chế quá trình sinh trưởng của nấm mốc nên làm giảm khả năng sinh tổng hợp tyrosinase hoặc ức chế enzym.

3.2.3 Ảnh hưởng nguồn nitơ

Khả năng sinh tổng hợp tyrosinase của *A.oryzae* TP1 được khảo sát với các nguồn nitơ khác nhau. Kết quả thu được thể hiện trên bảng 3.

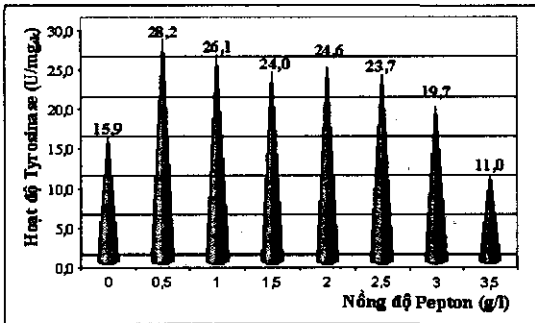
Bảng 3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Số TT	Nguồn Nitơ	Nồng độ (g/l)	Hoạt độ (U/mgsk)
1	NH ₄ NO ₃	3	17,3
2	(NH ₄) ₂ SO ₄	3	3,9
3	NH ₄ Cl	3	4,5
4	Cao nấm men	3	22,1
5	Pepton	3	23,9
6	Trypton	3	19,1
7	Cao thịt	3	23,4
8	Cao nấm men + NH ₄ NO ₃ + (NH ₄) ₂ SO ₄	1+1+1	24,1
9	Pepton + NH ₄ NO ₃ + (NH ₄) ₂ SO ₄	1+1+1	24,0
10	Trypton + NH ₄ NO ₃ + (NH ₄) ₂ SO ₄	1+1+1	14,6
11	Cao thịt + NH ₄ NO ₃ + (NH ₄) ₂ SO ₄	1+1+1	24,6
12	Cao nấm men + NH ₄ NO ₃	1,5 + 1,5	24,8
13	Pepton + NH ₄ NO ₃	1,5 + 1,5	26,9
14	Trypton + NH ₄ NO ₃	1,5 + 1,5	16,8
15	Cao thịt + NH ₄ NO ₃	1,5 + 1,5	21,4

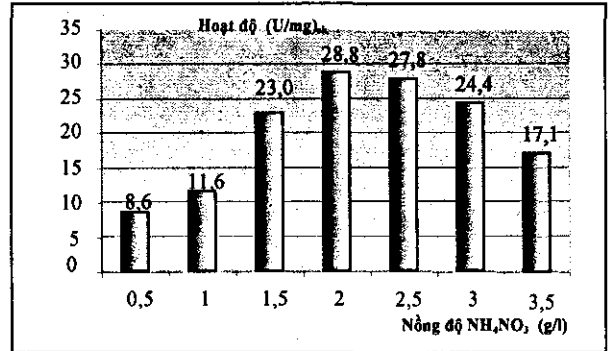
Kết quả ở bảng 3 cho thấy hoạt độ thu được trên môi trường có chứa nguồn nitơ vô cơ nhìn chung thấp hơn rất nhiều so với nuôi trên môi trường chứa nguồn nitơ hữu cơ ngoại trừ nguồn NH_4NO_3 . Điều này xảy ra có thể do NH_4NO_3 có khả năng tạo pH môi trường thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp tyrosinase. Khi kết hợp hai nguồn nitơ này lại hoạt độ enzym được cải thiện rõ ràng. Kết quả đã xác định sự kết hợp giữa pepton và NH_4NO_3 với tỉ lệ 1,5 : 1,5 g/l cho hoạt độ enzym cao nhất.

3.2.4. Ảnh hưởng của nồng độ pepton và NH_4NO_3

Tiến hành nuôi *A.oryzae* TP1 trên môi trường sinh đã khảo sát nguồn cacbon và nitơ với nồng độ pepton và nồng độ NH_4NO_3 thay đổi. Kết quả thu được biểu hiện trên đồ thị 3 và đồ thị 4.



Đồ thị 3. Ảnh hưởng của nồng độ pepton



Đồ thị 4. Ảnh hưởng của nồng độ NH_4NO_3

Kết quả cho thấy với nồng độ pepton 0,5 g/l, nồng độ NH_4NO_3 2g/l thì hoạt tính enzym cao nhất. Điều này có thể giải thích rằng chủng *A.oryzae* TP1 chỉ có nhu cầu một lượng nitơ hữu cơ nhỏ cho quá trình sinh tổng hợp tyrosinase. Khi tăng nồng độ nitơ lên thì hoạt tính enzym lại giảm. Có thể do nồng độ NH_4NO_3 cao sẽ làm pH môi trường giảm mạnh ảnh hưởng tới khả năng sinh tổng hợp tyrosinase cũng như ức chế sự phát triển của *A.oryzae*. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Haq và cộng sự (2000).

3.2.5. Ảnh hưởng của pH đầu

Sau khi đã cố định nguồn cacbon và nitơ, chúng tôi tiếp tục nuôi chủng *A.oryzae* TP1 trên môi trường có pH ban đầu thay đổi. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 4.

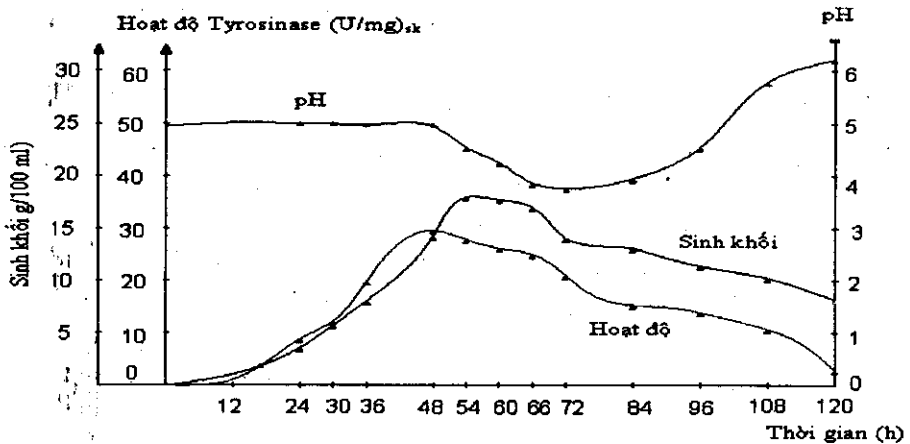
Bảng 4. Ảnh hưởng của pH đầu

pH	Hoạt độ Tyrosinase (U/mgsk)
4,0	13,3
4,5	21,0
5,0	29,2
5,5	28,1
6,0	27,4
6,5	20,2
7,0	17,2

Từ kết quả bảng 4 chúng tôi nhận thấy: trong dải pH = 5÷6 Tyrosinase được tổng hợp với hoạt tính khá cao (27,4 U/mg_{sk} ÷ 29,2 U/mg_{sk}). Khi pH trong vùng quá axit hay trung tính (pH = 4 hoặc 7) thì hoạt tính Tyrosinase thấp hơn. Kết quả này phù hợp với điều kiện lựa chọn ban đầu của Vogel [3]. Như vậy chúng tôi lựa chọn pH đầu để nuôi cấy sinh tổng hợp enzym là pH = 5 ÷6.

3.2.6 Động thái quá trình sinh tổng hợp Tyrosinase của *A. oryzae* TP1

Chúng tôi tiến hành nuôi *Aspergillus oryzae* trên môi trường dinh dưỡng thích hợp đã chọn. Cứ sau 12 giờ chúng tôi tiến hành lấy mẫu xác định hoạt độ tyrosinase, theo dõi sự thay đổi pH và sinh khối. Kết quả được biểu diễn ở đồ thị 5.



Đồ thị 5. Động thái quá trình sinh tổng hợp Tyrosinase từ *Aspergillus oryzae*

Từ đồ thị 5 chúng tôi nhận thấy: Từ 12 ÷ 36 giờ sinh khối bắt đầu tăng, đây là giai đoạn tiềm phát của vi sinh vật. Sinh khối tăng mạnh sau 48 giờ và đạt cực đại ở 54 giờ. Quá trình này duy trì đến 66 giờ thì sinh khối nấm mốc bắt đầu giảm nhiều. Pha cân bằng của sự phát triển sinh khối là từ 54-66 giờ. Sau 66 giờ vi sinh vật bắt đầu suy vong có thể đó là do môi trường cạn kiệt nguồn dinh dưỡng.

Từ 12 đến 48 giờ pH không thay đổi nhiều. Sau 48 giờ pH môi trường giảm mạnh và đạt cực tiểu ở 72 giờ (pH 3,82). Sau thời điểm này pH môi trường bắt đầu tăng (pH 4,14 ÷ 6,29) có thể là vi sinh vật sử dụng gốc NO₃⁻ còn lại trong môi trường gốc NH₄⁺ để duy trì sinh pH môi trường ở vùng axit yếu.

Tổng hợp enzym sau 24 giờ quá trình diễn ra mạnh mẽ và đến 48 giờ hoạt độ Tyrosinase là đạt cực đại (29,4 U/mg_{sk}). Hoạt độ enzym được duy trì tương đối ổn định từ 48 giờ đến 60 giờ. Quá trình sinh tổng hợp Tyrosinase tối ưu khi tế bào vi sinh vật ở đầu pha sinh trưởng với pH = 5.

Như vậy kết quả nghiên cứu động thái cho thấy quá trình sinh tổng hợp Tyrosinase mạnh nhất sau 48 giờ nuôi, nằm ở pha sinh trưởng của *Aspergillus oryzae*, trong dải pH 4,31 đến 5,0. Chúng tôi nhận thấy tại 54 giờ hoạt độ tyrosinase giảm nhẹ nhưng sinh khối lại tăng nhiều. Vì vậy chúng tôi lựa chọn thời gian nuôi cấy là 54 giờ để thu enzym đạt hiệu suất lớn nhất.

4. KẾT LUẬN

Từ 38 chủng vi sinh vật trong bộ sưu tập giống của phòng Hoá sinh và sinh học phân tử, trường Đại học Bách Khoa Hà Nội và 6 chủng phân lập từ các mảnh vỏ cây, chúng tôi đã tìm ra được 11 chủng vi khuẩn và 4 chủng nấm mốc có hoạt tính Tyrosinase trong đó *Aspergillus oryzae* TP1 là chủng có hoạt tính cao nhất

Đã xác định được môi trường thích hợp cho lên men sinh tổng hợp Tyrosinase từ chủng *A.oryzae* TP1 là môi trường dinh dưỡng với nguồn cacbon là glucose (15 g/l); trisodium citrate (3g/l); nguồn nitơ là peptone (0,5 g/l) và NH_4NO_3 (2 g/l), pH đầu bằng 5, nuôi lắc 200 vòng /phút ở 30°C trong 54 giờ hoạt độ tyrosinase đạt 29,2 U/mgsk.

Những kết quả ban đầu này sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho các nghiên cứu tiếp theo về tách, tinh sạch và khả năng ứng dụng của enzym.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Haq I., Ali, S and Qadeer M. A. - Optimization of cultural conditions for the production of L-DOPA from L-Tyrosine by *Aspergillus oryzae*, Pakistan Journal of Botany 32 (2) (2000) 255-258.
2. Haq I., Iqbal F., and Qadeer M. A. - Production of L-DOPA from L-tyrosine by *Aspergillus oryzae*, Biology 44 (1 & 2) (1998) 31-39.
3. Ikram-ul-Haq., Sikander Ali - Mutation of *Aspergillus oryzae* for improved production of 3, 4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) from L-tyrosine, Braz. J. Microbiol 37 (1) (2006).
4. Raju B. G. S., Rao G. H., Ayyana C. - Bioconversion of L-tyrosine to L-DOPA using *Aspergillus oryzae*, Visakhapatnam, 1993, pp. 106-110.
5. Copy of Sigma's quality control procedure contact our Technical Service Department. Enzymatic Assay of Tyrosinase Polyphenol Oxidase Activity (EC 1.14.18.1).

SUMMARY

SELECTION AND STUDY THE CONDITIONS OF FERMENTATION TO SYNTHESIS TYROSINASE FROM *ASPERGILLUS ORYZAE* TP1.

Tyrosinase (EC 1.14.18.1) is a Polyphenol oxidase. It is a bifunctional enzyme catalyzing the monohydroxylation of monophenols and the oxidation of diphenols. Tyrosinase catalyses monophenols to L-DOPA is a useful drug for Parkinson's disease. In food industry, tyrosinase used as additives natural colorant. It can discover and treat phenol compound in environment.

Accoding to Vogel' culture, we selected synthesis culture with cacbon source is glucose 15 g/l, trisodium citrat 3 g/l, nitrogen source is pepton 0.5 g/l, NH_4NO_3 2 g/l, initial pH 5 and a cultivation time of 54 hous at 200 rpm and 30°C. Further studies are required to definite characterization of tyrosinase from *A. oryzae* TP1.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 16 tháng 4 năm 2007

Trịnh Thị Thu Hằng,

Viện Đại học Mở Hà Nội

Đặng Thị Thu, Nguyễn Thị Xuân Sâm, Đỗ Thị Thu Hà, Trần Thị Thuý Nga,

Đại học Bách khoa Hà Nội.