

NGHIÊN CỨU SINH TỔNG HỢP ENZYM LIPAZA TỪ CHỦNG NẤM MEN MD11

NGUYỄN THỊ ANH ĐÀO, DƯƠNG VĂN HỢP,
NGUYỄN LÂN DŨNG
Trung tâm Công nghệ Sinh học ĐHQGHN
BÙI THỊ THU HUYỀN
Viện Chăn nuôi - Bộ NN và PTNT

1. Mở đầu

Lipaza (*Triacylglycerol Lipaza*) là enzym thuỷ phân triglyceride thành diglyceride, monoglyceride hoặc glycerol và các axit béo nhờ hoạt động của nó trên bề mặt phân pha dầu nước [10].

Lipaza có ý nghĩa về mặt sinh lý học và về tiềm năng công nghiệp: xúc tác cho quá trình thuỷ phân, tổng hợp este, cải biến chất béo, tổng hợp các hợp chất hữu cơ đặc biệt, tăng cường hương vị trong quá trình chế biến thực phẩm... ở sinh vật nhân chuẩn Eukaryota, lipaza liên quan đến các bước khác nhau của quá trình trao đổi chất lipid (tiêu hoá chất béo, hấp phụ, hồi phục và trao đổi lipoprotein).

Trong bối cảnh Việt Nam đang hiện đại hoá và công nghiệp hoá đất nước, ngành công nghệ thực phẩm, chất tẩy giặt, hoá chất... cần rất nhiều enzym, đặc biệt là lipaza, song các chế phẩm lipaza đang sử dụng chủ yếu là nhập khẩu. Do đó, nghiên cứu về lipaza ở Việt Nam đang nhằm mục tiêu tăng lợi nhuận kinh tế, sử dụng an toàn và làm giảm ô nhiễm môi trường, hướng đến nền công nghiệp sạch và bền vững. Với mong muốn góp phần vào hướng nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành *nghiên cứu sinh tổng hợp enzym lipaza từ chủng nấm men MD1*.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Vi sinh vật được phân lập từ đất, nước ở các vùng có nhiều dầu, mỡ trên địa bàn Hà Nội

2.2. Môi trường thạch Tributyrin (g/l): Pepton -5; Cao nấm men - 3; Thạch -17; Tributyrin -10ml [6]

2.3. Phương pháp định lượng lipaza

Hoạt tính lipaza được xác định theo phương pháp pH-stat. Dùng cơ chất là dầu oliu. Một đơn vị hoạt tính được tính là hàm lượng enzyme giải phóng ra 1 μmol axit béo mỗi phút.

[Lượng NaOH khi cho enzym vào – Lượng NaOH khi chưa có enzym (μl)]x10

Thời gian đo (phút) x thể tích enzym (μl)

2.4. Xác định protein tổng số theo phương pháp Bradford [s]

2.5. Trình tự

3. Kết quả nghiên cứu

Lipaza được ứng dụng trong ngành sản xuất bột giặt và trong y tế là chất ức chế enzym của người để làm giảm sự hấp thụ axit béo, chống bệnh béo phì. Bệnh béo phì chính là nguyên nhân gây ra bệnh đái đường, nồng độ chất béo cao trong máu, huyết áp cao, và rối loạn hoạt động của tim, phổi... Chính vì vậy các nhà khoa học đang tập trung nghiên cứu Lipaza ngoại bào được tách chiết từ vi sinh vật vì chúng có ý nghĩa thực tế rất quan trọng. Từ những mẫu đất, nước chúng tôi đã phân lập được các chủng vi sinh vật có các đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hoạt tính lipaza khác nhau. Trong đó, chúng tôi tuyển chọn MĐ11 có hoạt tính lipaza mạnh nhất, đường kính vòng phân giải 16mm.

3.1. Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá của chủng MD11

Khuẩn lạc hình tròn, màu trắng đục, dẹt, tâm hơi lõm, tế bào hình cầu, sinh sản bằng nảy chồi một bên.

Dựa vào các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá và đồng dựa vào khoá phân loại nấm men của A. Barnett chúng tôi nhận thấy chủng MD11 thuộc chi *Candida*. Ở đây ngoài việc phân loại chủng MD11 bằng phương pháp truyền thống dựa trên các đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh lý, sinh hoá chúng tôi còn tiến hành phân loại theo

phương pháp sinh học phân tử. Khi phân loại bằng phương pháp truyền thống chủng MD11 này thuộc chi *Candida*.

Khả năng đồng hoá các nguồn hydratcacbon

Fructoza++	Malnitol+
Melezitoza++	Lactoza -
Melibioza++	Trehalo+
Sucroza++	Arabinoza +
Galactoza++	Rhamnoza-
Sorbitol++	Sorboza -
Maltoza ++	Myo-Inositol-
Glucoza ++	Galactitol -
Xyloza +	D- riboza -

Chú ý:

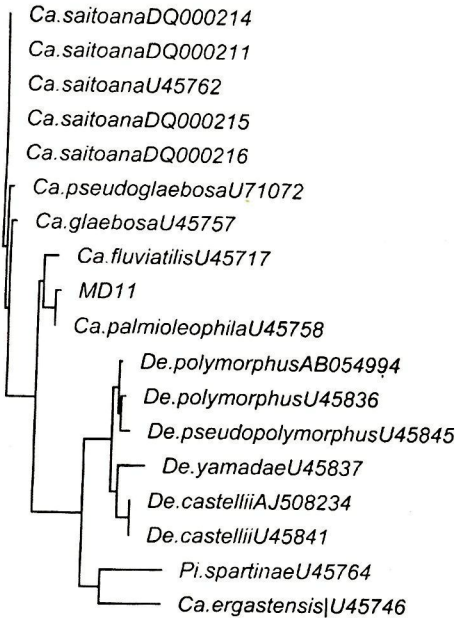
(++): Đồng hoá mạnh

(+): Đồng hoá yếu

(-): Không có khả năng đồng hoá

Để xác định rõ chủng MD11 thuộc loài nào của chi *Candida* dựa vào phương pháp phân loại sinh học phân tử, chúng tôi tiến hành phân tích giải trình tự rADN 18S của chủng MD11. Tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho nấm men.

PHYLP_1

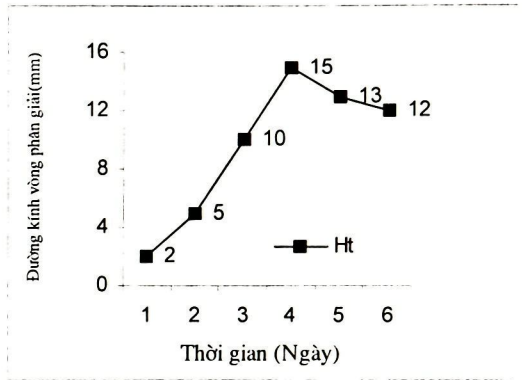


Hình 1. Cây phả hệ rADN 18S của chủng nấm men MD11 với các chủng nấm men có quan hệ gần.

Kết quả phân tích phân đoạn trình tự cho thấy đoạn nucleotit được tổng hợp có độ dài 567bp, khi so sánh với trình tự gen mã hoá cho 18S đã được đăng ký trong ngân hàng dữ liệu gen Nhật Bản có độ tương đồng rất cao là 99% với trình tự của chủng thuộc loài *Candida palmioleophila* có ký hiệu U45717. (Hình 1).

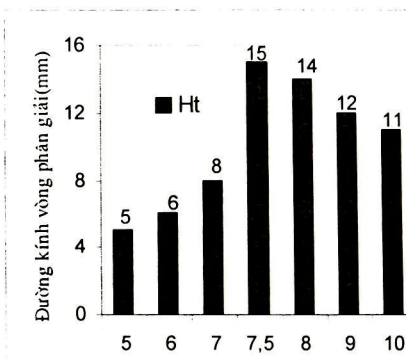
Đây là loài nấm men được sử dụng rộng rãi trên thế giới để sản xuất lipaza.

Để đánh giá mức độ biểu hiện lipaza ngoại bào của chủng MD11, chúng tôi tiến hành nuôi cấy và thu dịch ở các giờ khác nhau để xác định hoạt độ enzym lipaza. Chúng tôi nhận thấy lượng lipaza đạt cao nhất sau 96 giờ (Hình 2), đường kính vòng phân giải đạt 15mm.

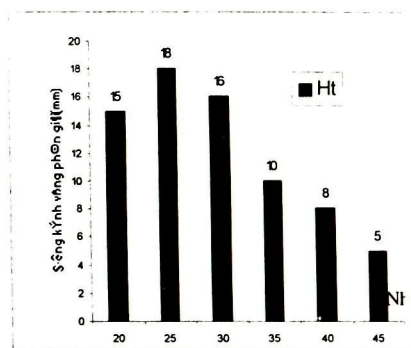


Hình 2. Hoạt độ tương ứng của lipaza ở thời gian khác nhau.

Cơ chất khi có mặt trong môi trường nuôi cấy có khả năng cảm ứng và kích thích sự tổng hợp và tiết lipaza ra ngoài môi trường để thủy phân cơ chất. Với nhận định đó chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy nấm men với nồng độ cơ chất là dầu Oliu có tỉ lệ khác nhau: 0, 0,1, 0,2, 0,5 0,7, 1,0 và 1,2%. Sau đó thu dịch nuôi cấy ở 96 giờ để xác định hoạt độ lipaza. Kết quả nghiên cứu cho thấy ở nồng độ cơ chất 1,2% dầu Oliu chủng MD11 có khả năng sinh tổng hợp lipaza là cao nhất. Nhiệt độ, pH là 2 yếu tố quan trọng trong việc sinh tổng hợp lipaza của chủng MD11.



Hình 3. Ảnh hưởng của pH dịch nuôi cấy đến khả năng sinh lipaza của MD11.



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh lipaza của MD11.

Chúng tôi nhận thấy hàm lượng lipaza được sinh ra đạt cao nhất từ 8-12mm ở dải 5-9,0 sau đó lượng lipaza sinh ra giảm dần ở pH 10. Đặc biệt lượng enzym sinh ra cao nhất ở pH 7,5.

Lượng lipaza được sinh ra cao nhất ở nhiệt độ nuôi là 25°C (Hình 4). Đặc biệt chủng MD11 không có khả năng sinh lipaza ở dải nhiệt độ từ 35-45°C. Điều này cũng rất thuận lợi cho việc sản xuất lipaza trong công nghiệp sản xuất bột giặt.

Dưới tác động của nhiệt độ, hoạt tính của lipaza ít nhiều đều bị ảnh hưởng. Mức độ ảnh hưởng tùy thuộc vào từng loại lipaza và khoảng thời gian enzym tiếp xúc với nhiệt độ. Trong quá trình xử lý nhiệt, có thể trước tiên một số liên kết hidro trong mạng lưới liên kết hidro tham gia vào việc giữ vững cấu trúc của lipaza bị đứt gãy dẫn đến cấu trúc của enzym bị biến đổi, làm cho cơ chất không liên kết được với enzym và không bị chuyển hoá dưới tác động của nhiệt độ, hoạt tính của lipaza ít nhiều đều bị ảnh hưởng.

4. Kết luận

Chủng nấm men MD11 được phân lập từ lò giết mổ lợn. Khuẩn lạc màu trắng đục, hơi lồi; các tế bào nấm men có hình cầu, sinh sản bằng nảy chồi một phía. Chủng nấm men này có khả năng sản sinh nhiều enzym lipaza. Bằng phương pháp sinh học phân tử để phân tích trình tự gen chúng tôi đã phân loại được chủng nấm men MD11 này là loài *Candida palmioleophila*. Chủng này sản sinh lipaza cao nhất khi nuôi trong 96 giờ, nguồn lipid thích hợp là dầu oliu 1%, nhiệt độ nuôi cấy là 25°C và pH thích hợp là 7,5.

Lipaza ngoại bào của chủng nấm men MD11 có hoạt tính cao nhất ở nhiệt độ 65°C, pH thích hợp cho hoạt động là 7.5-8.5, độ bền cao nhất ở 30°C. Và hoạt tính giảm rõ rệt sau 1-2 giờ ở các nhiệt độ cao (50-80°C).

Tài liệu tham khảo

1. Quyền Đình Thi, Nguyễn Diệu Thuý, Vũ Văn Diễm, Nguyễn Văn Cường (1999), “Biểu hiện lipaza từ chủng nấm men *P.pastoris*”, *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội*, tr. 1129-1135.

2. Dong-Woo Lee, You-Seok Koh, Ki-Jun Kim, Byung-Chan Kim, hak-Jong Choi, doo Sik Kim, Maggy T. Suhartono, Yu-Ryang Pyun (1999), "isolation and characterization of thermophilic lipaza from *Bacillus thermoleovorans* ID-1", FEMS Microbiology Letters, 179, pp. 393-400.
3. Joseph d. Schrag, Yunge Li, shan Wu and Moslaw Cygler (1991), "Multiple crystal forms of lipaza from *geotrichum candidum*", J.Mol.Biol, 220, pp.541-543.
4. Onno Misset, Gijs Gerritse, Karl- Erich Jaeger, Ulrich winkler, Charles Colson, Karin Schack, emmanuel Lesusse, Véronneque Dartois, mieke Blaauw, stephane ransac and bauke W. Dijkstra (1994), "The structure- function relationship of the lipaza from *pseudomonas aeruginosa* and *Bicillus subtilis*", protein engineering, 4, pp. 523-529.
5. Orapin Bhumibhamon, Achara Kopraserstak and Suptawwee Funthong (2002), "Biotreatment of High fat and oil wastewater by lipaza- producing microorganisms", Kasetsart J. (Nat.Si)36(3): 261-267.
6. Rohit Sharma, Yusuf Christi, Uttam chand Banerjee (2001), "Production, purification, characterization and applications of lipazas", biotechnology Advances 19 (2001) 627-662.

Summary

Study on lipaza production of yeast mD11

Nguyen Thi Anh Dao, Duong Van Hop, Nguyen Lan Dung

Centre of Biotechnology - Vietnam National University, Hanoi

Bui Thi Thu Huyen

National Institute of Animal Husbandry (NIAH)

*The strain of yeast MD11 was isolated from the slaughter- house is white, butyrous colonies, vegetative reproduction by budding. This yeast strain produced much lipaza enzyme. The analysis of ADN sequence shows that this strain MD11 was identified as *Candida palmiophila*. The optimal activity temperature is 65°C. The maximal activity was observed at pH 7,5 for hydrolysis of olive oil and was stable up to 30°C.*