

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

TRỊNH THỊ THU HẰNG

NGHIÊN CỨU THU NHẬN, XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH
CỦA TYROSINASE TỪ CHỦNG *ASPERGILLUS*
ORYZAE TP01 VÀ THĂM DÒ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG

Chuyên ngành : Công nghệ sinh học thực phẩm
Mã số: 62 54 02 05

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT

Hà Nội – 2010

Công trình được hoàn thành tại: **Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.**

Người hướng dẫn khoa học: **GS. TS. ĐẶNG THỊ THU**
PGS.TS. NGUYỄN THỊ XUÂN SÂM

Phản biện 1: PGS. TS. Phan Tuấn Nghĩa – ĐHKHTN - ĐHQGHN

Phản biện 2: GS. TS. Nguyễn Thành Đạt – ĐH Sư phạm I Hà Nội

Phản biện 3: PGS. TS. Nguyễn Thị Hoài Trâm – Viện CN thực phẩm

Luận án đã được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp trường họp tại trường Đại học Bách Khoa vào hồi 09 giờ, ngày 15 tháng 09 năm 2010

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc Gia Việt Nam
- Thư viện Đại học Bách Khoa Hà Nội

NHỮNG CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI LUẬN ÁN

1) Trịnh Thị Thu Hằng, Đặng Thị Thu, Nguyễn Thị Xuân Sâm, Đỗ Thị Thu Hà, Trần Thị Thuý Nga (2008), “Tuyển chọn và nghiên cứu điều kiện lên men sinh tổng hợp tyrosinase từ chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae* TP01”, *Tạp chí khoa học và công nghệ*, 3(46), tr. 23-29.

2) Trịnh Thị Thu Hằng, Đặng Thị Thu, Nguyễn Thị Xuân Sâm, (2008), “Tách, tinh chế và xác định đặc tính của tyrosinase từ chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae* TP01”, *Tuyển tập hội nghị Hóa sinh và sinh học phân tử phục vụ nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm toàn quốc lần thứ IV*, tr. 287-289.

3) Trịnh Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Xuân Sâm, Nguyễn Thị Hoa, Đinh Duy Kháng, Bạch Thị Như Quỳnh, Đặng Thị Thu (2009), “Tách dòng và xác định trình tự gen mã hóa tyrosinase từ *Aspergillus oryzae* TP01”, *Tạp chí Di truyền học và ứng dụng*, 1, tr. 36-42.

4) Thu Hang, T.T., Hoa, N.T., Xuan Sam, N.T., Khang, D.D., Nhu Quynh, B.T., and Thu, D.T. (2009) “Cloning and expression of the gene coding for tyrosinase from *Aspergillus oryzae* TP01”, *EMBL Nucleotide Sequence Database, Accession Number FN298398*.

5) Trịnh Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Xuân Sâm, Đỗ Thị Thu Huyền, Đặng Thị Thu (2010), “Nghiên cứu tạo điện cực tyrosinase từ *Aspergillus oryzae* TP01 và ứng dụng”, *Tạp chí Khoa học và công nghệ*, 2 (48), tr. 37-45.

MỞ ĐẦU

Tyrosinase (EC 1.14.18.1) là một polyphenol oxydaza có chứa nguyên tử đồng (Cu) trong phân tử. Enzym này có hai chức năng, xúc tác phản ứng hydroxyl hóa các monophenol như tyrosin, *p*-cresol và axit *p*-coumaric thành *o*-diphenol (thể hiện hoạt tính cresolase hoặc monophenolase) và oxi hóa *o*-diphenol thành dopaquinon (thể hiện hoạt tính catecholase hoặc diphenolase).

Tyrosinase được nghiên cứu từ nhiều năm qua và đã được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như: trong y học, công nghiệp thực phẩm, xử lý môi trường ô nhiễm hợp chất phenol và đặc biệt trong tạo điện cực sinh học. Điện cực tyrosinase cũng được sử dụng chủ yếu để phát hiện các hợp chất phenol trong thực phẩm và trong nước thải. Ưu điểm lớn nhất của điện cực tyrosinase là dễ sử dụng, có khả năng phát hiện nhanh, giá thành rẻ, xác định chính xác sự có mặt của các hợp chất phenol, thiết bị gọn nhẹ khắc phục được nhược điểm của một số phương pháp khác khi mang đi xa và xác định tại các vùng không có điều kiện thiết bị. Tyrosinase còn là enzym chịu trách nhiệm xúc tác tổng hợp các sắc tố hình thành màu da, màu tóc, màu mắt... ở người và động vật

Trong tự nhiên tyrosinase được phân bố rộng rãi ở động vật, thực vật và vi sinh vật, đặc biệt trong một số loài nấm ăn và nấm mốc. Trong đó, enzym từ nấm mốc là loại enzym có khả năng xúc tác chuyển hóa tốt cả mono và diphenol.

Xuất phát từ những tác dụng của tyrosinase chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài:

“Nghiên cứu thu nhận, xác định đặc tính của tyrosinase từ chủng *Aspergillus oryzae* TP01 và thăm dò khả năng ứng dụng”

Mục tiêu nghiên cứu

- Nghiên cứu thu nhận, xác định đặc tính tyrosinase từ nấm mốc *Aspergillus oryzae* TP01.
- Tạo điện cực tyrosinase và thăm dò khả năng ứng dụng điện cực này phân tích nhanh hàm lượng các hợp chất phenol.

Nội dung nghiên cứu

1. Nghiên cứu thu nhận tyrosinase

- Phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật có hoạt tính tyrosinase cao.
- Nghiên cứu các điều kiện sinh tổng hợp tyrosinase cao
- Nghiên cứu tách và tinh sạch enzym.

2. Nghiên cứu đặc tính của tyrosinase từ chủng vi sinh vật đã tuyển chọn

- Xác định tính chất của enzym

- Tách dòng, phân tích trình tự gen mã hoá tyrosinase.

3. Nghiên cứu ứng dụng tyrosinase trong tạo điện cực sinh học

- Nghiên cứu các điều kiện thích hợp cố định tyrosinase trên điện cực.
- Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng phát hiện của điện cực.
- Ứng dụng điện cực tyrosinase phát hiện một số hợp chất phenol.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài:

- Đã nghiên cứu trọn vẹn điều kiện nuôi cấy, sinh tổng hợp, tách tinh sạch, khảo sát đặc tính và định hướng ứng dụng của tyrosinase. Công trình này, đã làm phong phú thêm thông tin trong lĩnh vực công nghệ enzym.

- Có khả năng ứng dụng tyrosinase chế tạo điện cực enzym để áp dụng phát hiện nhanh các hợp chất phenol.

Những đóng góp mới của luận án

1 - Là công trình nghiên cứu một cách có hệ thống về tyrosinase từ *A. oryzae* TP01 làm nền tảng khai thác khả năng ứng dụng.

2 - Đã thành công trong việc tách dòng và giải trình tự gen mã hóa tyrosinase của chủng *Aspergillus oryzae* TP01 làm cơ sở cho các nghiên cứu tạo tyrosinase tái tổ hợp đang được tiến hành.

3 - Đã tìm được điều kiện thích hợp để cố định tyrosinase từ *A. oryzae* TP01 trên điện cực điện hóa phân tích nhanh các hợp chất phenol.

Cấu trúc luận án

Luận án gồm 117 trang được chia làm các phần: Mở đầu 2 trang, tổng quan 31 trang, vật liệu và phương pháp 17 trang, kết quả và thảo luận 54 trang, kết luận 2 trang, kiến nghị 1 trang, tài liệu tham khảo 10 trang. Luận án có 17 bảng, 40 hình và 2 sơ đồ.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1. 1. TYROZINAZA

Tyrosinase (EC 1.14.18.1) là một polyphenol oxydaza xúc tác phản ứng hydroxyl hóa các monophenol thành *o*-diphenol và oxi hóa *o*-diphenol thành dopaquinon.

1.2. ĐIỆN CỰC SINH HỌC

Hiệp hội quốc tế về hoá học ứng dụng - IUPAC năm 1999 đã định nghĩa: điện cực sinh học là một thiết bị tích hợp độc lập, nhỏ gọn, có khả năng cung cấp những thông tin phân tích định lượng hoặc bán định lượng, sử dụng một tác nhân sinh học duy trì sự tiếp xúc không gian trực tiếp với một phần tử chuyển đổi.

Như vậy có thể hiểu điện cực sinh học là một thiết bị phân tích chuyên đổi các đáp ứng sinh học thành các tín hiệu điện, từ các tín hiệu đó người ta có thể đo được các chất cần phân tích.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU

- **Chủng vi sinh vật:** Từ 38 chủng vi sinh vật bao gồm 32 chủng trong bộ sưu tập giống của phòng Hóa sinh và sinh học phân tử Viện Công nghệ Sinh học - Công nghệ Thực phẩm trường Đại học Bách Khoa Hà Nội và 06 chủng phân lập. Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α (Invitrogen) sử dụng trong biến nạp gen.

- **Hóa chất:** SDS, acrylamid/bis-acrylamid (Merck - Đức), X-gal (USB – Italy), NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, NaNO₃, MgSO₄, KCl, FeSO₄, CaCO₃, HCl, NaOH, chloroform tinh khiết,... cùng một số hóa chất thông dụng dùng trong nuôi cấy vi sinh vật.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp vi sinh

- Tuyển chọn vi sinh vật bằng phương pháp đo bán kính vòng phân giải
- Phương pháp nuôi cấy nấm mốc

2.2.2. Phương pháp hóa sinh

- Xác định hoạt độ tyrosinase bằng phương pháp xác định độ giảm mật độ quang.
- Định lượng protein tổng số bằng phương pháp xác định mật độ quang
- Xác định ảnh hưởng của các điều kiện môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp tyrosinase
- Xác định K_m và V_{max} bằng phương trình Michaelis-Menten
- Thu chế phẩm tyrosinase bằng kết tủa axeton và sắc ký trao đổi ion
- Điện di protein trên gel polyacrylamid (SDS – PAGE) theo Laemmi 1970
- Xác định nhiệt độ tối ưu, pH tối ưu, bền nhiệt, bền pH, ảnh hưởng của các ion kim loại và chất đặc hiệu trung tâm hoạt động

2.2.3. Phương pháp sinh học phân tử

- Thiết kế môi bằng phần mềm PCGENE
- Tách chiết ARN tổng số bằng phương pháp trizol
- Định lượng ADN/ARN bằng cách xác định mật độ quang
- Phiên mã ngược tạo cDNA

- Khuếch đại gen bằng kỹ thuật PCR (Polymerase chain reaction)
- Điện di ADN trên gel agarose
- Biến nạp ADN plasmid
- Tách chiết ADN plasmid từ vi khuẩn *E. coli*
- Xác định trình tự nucleotid theo phương pháp của Sanger và cộng sự.

2.2.4. Cấu tạo vi điện cực và phương pháp cố định enzym trên điện cực

- Cấu tạo vi điện cực: Theo nguyên lý điện cực điện hóa đo độ dẫn của dung dịch.
- Phương pháp cố định enzym trên điện cực bằng phương pháp liên kết đồng hóa trị tạo liên kết chéo.

2.2.5. Xác định hàm lượng các hợp chất phenol

- Xây dựng đồ thị đường chuẩn
- Xác định hàm lượng các hợp chất phenol bằng điện cực tyrosinase

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. TUYỂN CHỌN CHỦNG VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP TYROSINASE

Từ các chủng vi sinh vật ở phần nguyên vật liệu đã khảo sát khả năng sinh tổng hợp tyrosinase bằng phương pháp đo bán kính vòng phân giải và xác định hoạt độ tyrosinase chọn được chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae* TP01 là chủng có hoạt độ tyrosinase nội bào cao nhất để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN SINH TỔNG HỢP TYROSINASE TỪ CHỦNG *A. ORYZAE* TP01

Chủng *A. oryzae* TP01 được nuôi trên môi trường gồm (g/l): catechol (cơ chất cảm ứng) 0,05, glucoza 20, trisodium xitrat 2, NH_4NO_3 1,5, cao nấm men 2,5, thời gian nuôi 48 giờ, pH môi trường 6, nhiệt độ 35°C. Tiến hành thay đổi một yếu tố, cố định các yếu tố còn lại để xác định ảnh hưởng của các yếu tố đến khả năng sinh tổng hợp tyrosinase. Kết quả từ bảng 3.2 đến 3.4 và hình 3.2 đến 3.10 xác định hoạt độ tổng của sinh khối tế bào thu được từ 100 ml môi trường nuôi cấy.

3.2.1. Ảnh hưởng của cơ chất cảm ứng

Thí nghiệm được tiến hành trên môi trường đã lựa chọn với cơ chất cảm ứng catechol và tyrosin, nồng độ thay đổi từ 0 – 0,1 (g/l).

Qua bảng 3.2 nhận thấy với cơ chất catechol 0,05 g/l kích thích khả năng sinh tổng hợp protein. Từ đây chọn catechol 0,05 g/l làm cơ chất cảm ứng để nghiên cứu các điều kiện tiếp theo.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của cơ chất cảm ứng đến khả năng sinh tổng hợp tyrosinase

Nồng độ catechol (g/l)	Hoạt độ tổng (U)	Nồng độ tyrosin (g/l)	Hoạt độ tổng (U)
0,00	210	0,00	210
0,01	240	0,01	216
0,02	282	0,02	226
0,03	322	0,03	235
0,04	356	0,04	248
0,05	390	0,05	280
0,06	340	0,06	295
0,07	284	0,07	256
0,08	250	0,08	212
0,09	218	0,09	178
0,10	172	0,10	154

3.2.2. Ảnh hưởng của nguồn cacbon

A. oryzae TP01 được nuôi lắ trên môi trường sinh tổng hợp tyrosinase với nguồn cacbon thay đổi kết quả thể hiện trên bảng 3.3.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến khả năng sinh tổng hợp tyrosinase

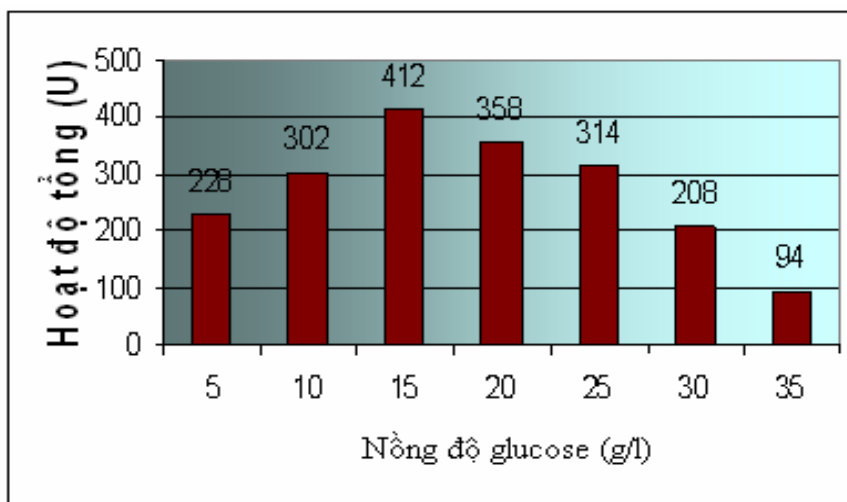
Số TT	Nguồn Cacbon	Nồng độ (g/l)	Hoạt độ tổng (U)
1	Glucose	20	356
2	Saccarose	20	210
3	Maltose	20	300
4	Lactose	20	294
5	Trisodium citrat	20	235
6	Glucose & Trisodium xitrat	20 + 2,5	402
7	Saccarose & Trisodium xitrat	20 + 2,5	234
8	Maltose & Trisodium xitrat	20 + 2,5	278
9	Lactose & Trisodium xitrat	20 + 2,5	300

Kết quả được trình bày ở bảng 3.3 cho thấy khi kết hợp các nguồn cacbon với nhau thì hỗn hợp glucose & trisodium xitrat có hoạt độ tyrosinase cao nhất, đạt tới 402 U. Như vậy nguồn cacbon nuôi cấy *A. oryzae* TP01 sinh tổng hợp tyrosinase rất dễ kiếm, rẻ tiền thuận tiện cho nuôi trên quy mô công nghiệp.

3.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ cacbon

Ảnh hưởng của nồng độ glucose

Nuôi chủng *A. oryzae* TP01 trong môi trường với nguồn cacbon gồm glucose + trisodium xitrat, các thành phần khác không đổi. Nồng độ glucose thay đổi: 5-10-15-20-25-30-35 g/l.

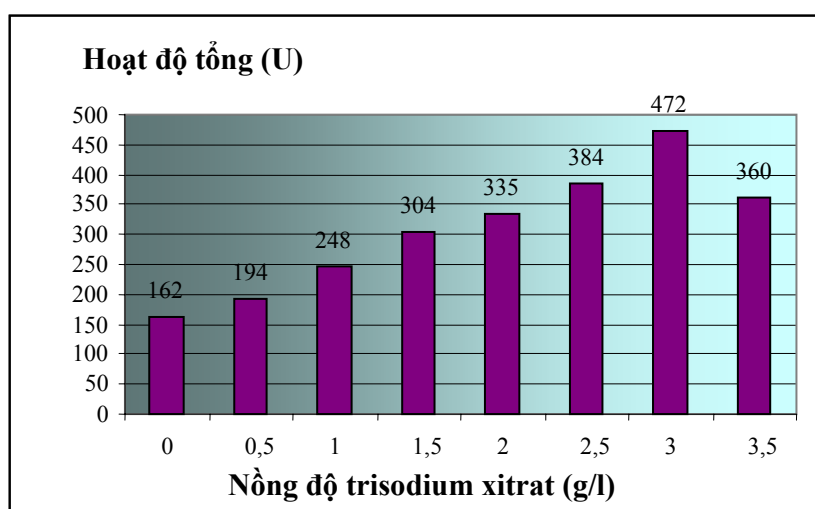


Hình 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ glucose đến khả năng sinh tổng hợp tyrosinase

Kết quả thu được trên hình 3.2 cho thấy tại nồng độ glucose 15 g/l quá trình sinh tổng hợp diễn ra mạnh nhất (412 U). Lựa chọn nồng độ glucose này để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo

Ảnh hưởng của nồng độ trisodium xitrat

Tiến hành nuôi *A. oryzae* TP01 trên môi trường dinh dưỡng với hàm lượng glucoza 15 g/l, các thành phần khác không thay đổi. Nồng độ trisodium xitrat thay đổi: 0-0,5-1,0-1,5-2,0-2,5-3,0-3,5 g/l.



Hình 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ trisodium xitrat đến khả năng sinh tổng hợp tyrosinase

Từ hình 3.3 nhận thấy tại nồng độ 3 g/l quá trình sinh tổng hợp tyrosinase diễn ra mạnh nhất (472 U). Như vậy, lựa chọn nồng độ cacbon thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp tyrosinase từ *A. oryzae* TP01 là glucoza 15 g/l; trisodium xitrat 3 g/l.

3.2.4. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

A. oryzae TP01 được nuôi trên môi trường dinh dưỡng có hàm lượng cacbon đã khảo sát, với nguồn nitơ thay đổi, các điều kiện khác không đổi.

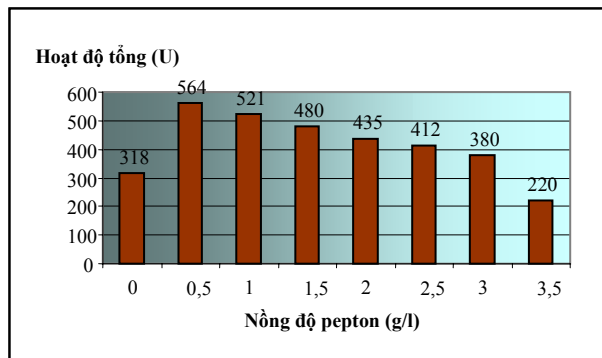
Từ kết quả bảng 3.4 cho thấy hỗn hợp pepton và NH_4NO_3 cho hoạt độ tyrosinase cao nhất (538 U). Vì vậy nguồn nitơ là pepton kết hợp với NH_4NO_3 được lựa chọn.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh tổng hợp tyrosinase

Số TT	Nguồn Nitơ	Nồng độ (g/l)	Hoạt độ tổng (U) ^(*)
1	NH_4NO_3	3	346
2	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3	78
3	NH_4Cl	3	90
4	Cao nấm men	3	442
5	Pepton	3	400
6	Trypton	3	381
7	Cao thịt	3	468
8	Cao nấm men + NH_4NO_3 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1+1+1	481
9	Pepton + NH_4NO_3 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1+1+1	480
10	Trypton + NH_4NO_3 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1+1+1	292
11	Cao thịt + NH_4NO_3 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1+1+1	492
12	Cao nấm men + NH_4NO_3	1,5 + 1,5	496
13	Pepton + NH_4NO_3	1,5 + 1,5	538
14	Trypton + NH_4NO_3	1,5 + 1,5	336
15	Cao thịt + NH_4NO_3	1,5 + 1,5	428

3.2.5 Ảnh hưởng của nồng độ các hợp chất nitơ

Ảnh hưởng của nồng độ pepton

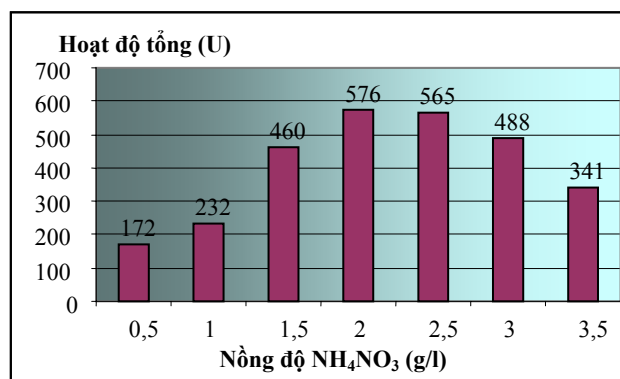


Hình 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ pepton tới khả năng sinh tổng hợp tyrosinase

Qua hình 3.4 nhận thấy nồng độ pepton là 0,5 g/l thì hoạt độ tyrosinase cao nhất đạt 564 U. Vậy nồng độ pepton này để nuôi cấy sinh tổng hợp tyrosinase.

Ảnh hưởng nồng độ NH_4NO_3

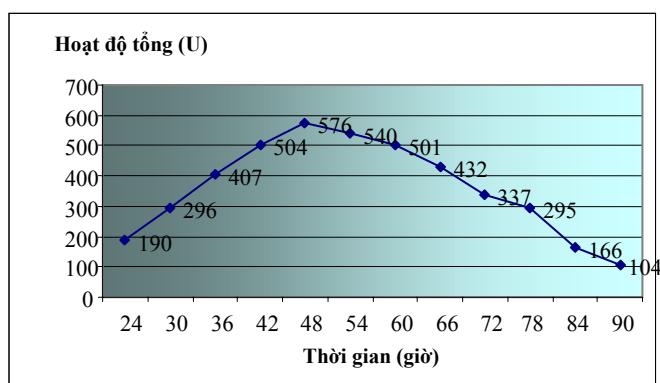
Nuôi *A. oryzae* TP01 trên môi trường với nồng độ NH_4NO_3 thay đổi từ 0,5-1-1,5-2-2,5-3-3,5 g/l. Kết quả trên hình 3.5 cho thấy tại nồng độ NH_4NO_3 2g/l hoạt độ enzyme cao nhất (576U). Từ đây chúng tôi lựa chọn nguồn nitơ thích hợp với nồng độ NH_4NO_3 là 2 g/l; nồng độ pepton 0,5 g/l để nuôi *A. oryzae* TP01.



Hình 3.5. Ảnh hưởng của nồng độ NH_4NO_3 tới khả năng sinh tổng hợp tyrosinase

3.2.6. Ảnh hưởng của thời gian nuôi

Tiến hành nuôi *Aspergillus oryzae* TP01 trên môi trường dinh dưỡng thích hợp đã khảo sát với các mốc thời gian khác nhau từ 24 đến 90 giờ.

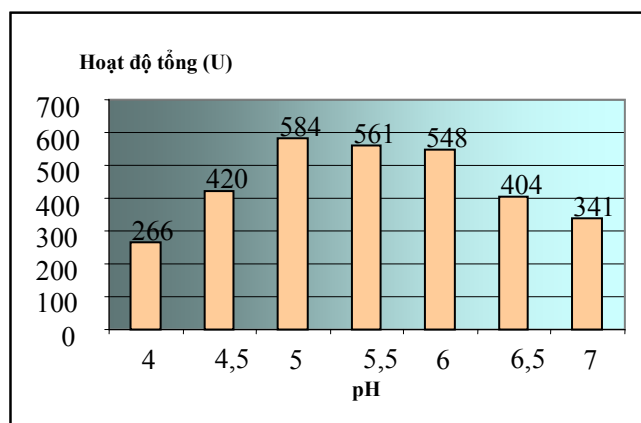


Hình 3.6. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình sinh tổng hợp tyrosinase

Quan sát hình 3.6 nhận thấy hoạt độ tyrosinase tăng lên theo thời gian và đạt cực đại tại 48 giờ (576 U). Vì vậy lựa chọn thời điểm này để thu chế phẩm enzym.

3.2.7. Ảnh hưởng của pH môi trường

Chủng nấm mốc *A. oryzae* TP01 được nuôi trên môi trường dinh dưỡng với đầy đủ các thành phần đã được khảo sát, điều kiện nuôi cố định, pH thay đổi từ: 4,0 – 7,0.

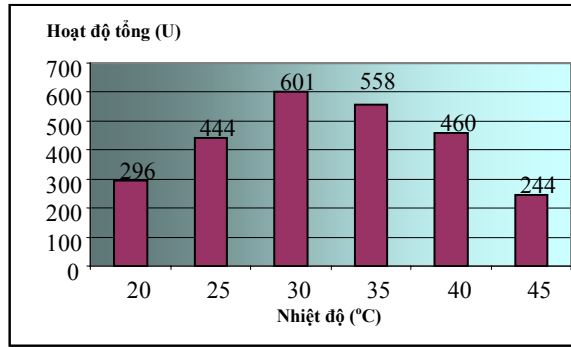


Hình 3.7. Ảnh hưởng của pH đến quá trình sinh tổng hợp tyrosinase

Từ kết quả trên hình 3.7 nhận thấy trong dải pH = 5 ÷ 6 tyrosinase được tổng hợp với hoạt độ khá cao (548 ÷ 584 U). Như vậy lựa chọn pH ban đầu để nuôi cấy sinh tổng hợp enzym là pH = 5.

3.2.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi

Thí nghiệm tiếp tục được tiến hành trên môi trường đã được khảo sát, các điều kiện nuôi cố định với nhiệt độ thay đổi từ 20°C đến 45°C. Từ hình 3.8 cho thấy *A. oryzae* TP01 có khả năng sinh tổng hợp tyrosinase cao trong dải nhiệt độ từ 30 ÷ 35°C (558 ÷ 601 U). Vì vậy lựa chọn nhiệt độ nuôi cấy thích hợp là 30°C.



Hình 3.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình sinh tổng hợp tyrosinase

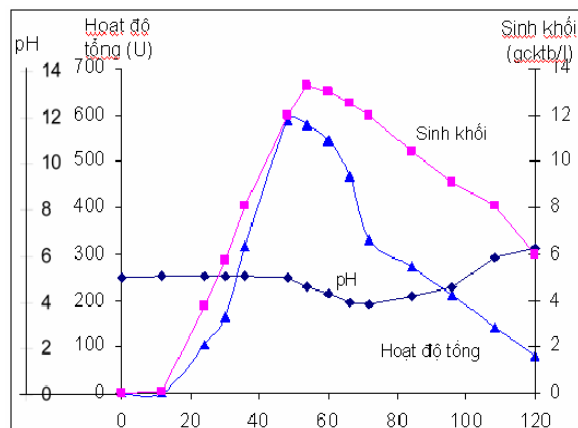
3.2.9. Tối ưu hoá quá trình sinh tổng hợp tyrosinase bằng phần mềm DX7 (www.Statease.com)

Từ các kết quả khảo sát ở trên, chọn 4 yếu tố ảnh hưởng nhiều nhất đến khả năng sinh tổng hợp tyrosinase để tối ưu hoá. Các mức thí nghiệm: Nồng độ trisodium xitrat (A) $3 \pm 0,5$ (g/l), nồng độ NH_4NO_3 (B) $2 \pm 0,5$ (g/l), nhiệt độ (C) 30 ± 5 ($^\circ\text{C}$) và thời gian nuôi cấy (D) 48 ± 6 (giờ).

Sử dụng phần mềm DX7 xử lý số liệu cho ra vùng tối ưu của tất cả các yếu tố ảnh hưởng được 55 phương án. Cuối cùng lựa chọn được môi trường tối ưu có thành phần như sau (g/l): glucose 15, trisodium xitrat 3, NH_4NO_3 2,3, KH_2PO_4 5, MgSO_4 0,2, pepton 0,5, catechol 0,05, pH 5, nhiệt độ 31°C , tốc độ lắc 200 v/p, enzym được thu nhận sau 49 giờ nuôi.

3.2.10. Động thái của quá trình lên men sinh tổng hợp tyrosinase từ chủng *A. oryzae* TP01

Chủng nấm mốc *A. oryzae* TP01 được nuôi trong môi trường dinh dưỡng với các thành phần dinh dưỡng tối ưu như sau (g/l): glucose 15; trisodium citrat 3, pepton 0,5; NH_4NO_3 2,5; KH_2PO_4 5; MgSO_4 0,2; KCl 0,5g; catechol 0,05, H_2O 1000ml; pH 5; khử trùng ở 121°C , 15', nuôi ở 30°C , lắc 200 v/p. Tiến hành nuôi trong 120 giờ, cứ 12 giờ một lần thu 100ml môi trường nuôi đo pH, xác định sinh khối và hoạt độ enzym.



Hình 3.10. Động thái quá trình sinh tổng hợp tyrosinase từ *A. oryzae* TP01

Kết quả được trình bày ở hình 3.10 cho thấy sinh khối tế bào tại 54 giờ đạt cao nhất (13,70 gcktb/l). Hoạt độ tyrosinase tăng mạnh từ 24 đến 48 giờ (pha tăng trưởng) và đạt cao nhất ở 49 giờ (600 U), phù hợp với kết quả tối ưu hoá bằng phần mềm DX7. Hoạt độ tyrosinase duy trì tương đối ổn định từ giờ 48 đến giờ 54 và bắt đầu giảm dần sau 60 giờ lên men. Như vậy, thời điểm thu enzym thích hợp nhất là 49 giờ.

3.3. NGHIÊN CỨU THU NHẬN VÀ TINH SẠCH TYROSINASE TỪ *A. ORYZAE* TP01

3.3.1. Khảo sát các tác nhân kết tủa tyrosinase

Tiến hành kết tủa tyrosinase bằng axeton và ethanol với tỷ lệ khác nhau (v/v) ở điều kiện 0°C.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol và axeton tới hiệu suất thu nhận tyrosinase

Dung môi –enzym (v/v)	Kết tủa bằng ethanol		Kết tủa bằng axeton	
	Hoạt độ tổng (U)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hoạt độ tổng (U)	Hiệu suất thu hồi (%)
0 - 1	137.700,00	100	137.700,00	100
0,5 - 1	21.081,87	15,31	41.489,01	30,13
1 - 1	33.915,51	24,63	70.432,20	51,15
1,5 - 1	42.700,77	31,01	59.569,02	43,26
2 - 1	55.975,05	40,65	44.807,58	32,54
2,5 - 1	39.630,06	28,78	28.256,04	20,52
3 - 1	27.140,67	19,71	16.813,17	12,21
3,5 - 1	12.241,53	8,89	7.408,26	5,38

(Hoạt độ tổng trên 500ml dịch enzym thô)

Kết quả ở bảng 3.6 nhận thấy acetone : enzym với tỉ lệ 1 : 1 (v/v) có hiệu suất thu hồi đạt 51,15 % trong khi kết tủa bằng ethanol hiệu suất thu hồi cao nhất tại thể tích ethanol : enzym là 2 : 1 (v/v) chỉ đạt 40,65 %. Do vậy, chọn tỷ lệ dung môi axeton : enzym là 1:1 (v/v), lượng dung môi hữu cơ không quá nhiều ít làm biến tính enzym, có hiệu suất thu hồi cao nhất và tiết kiệm dung môi kết tủa.

Ngoài dung môi axeton và ethanol chúng tôi tiến hành kết tủa phân đoạn tyrosinaza bằng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Phương pháp tiến hành đã được miêu tả trên phần vật liệu và phương pháp thu được kết quả ở bảng 3.7.

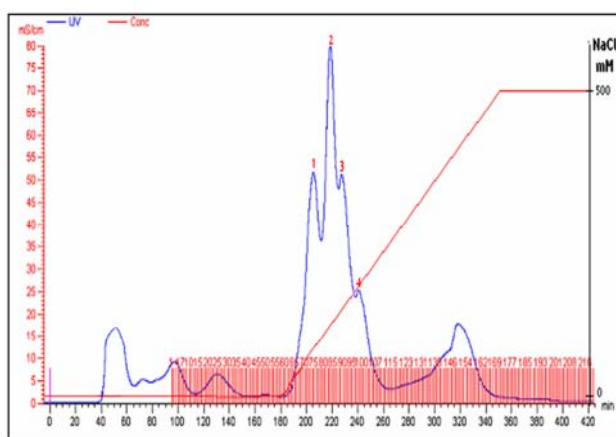
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ đến hiệu suất thu nhận tyrosinase

Nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)	Hoạt độ tổng (U)	Hiệu suất thu hồi (%)
0	137.700,00	100
30	7.146,63	5,19
40	12.103,83	8,79
50	19.649,79	14,27
60	34.066,98	24,74
70	5.810,94	4,22

Sau khi tiến hành kết tủa phân đoạn ở các nồng độ muối bão hoà nhận thấy tại nồng độ muối bão hoà 60 % thì thu được tyrosinase có hoạt độ cao nhất. Từ kết quả thu được so sánh giữa 3 phương pháp kết tủa lựa chọn kết tủa bằng dung môi aceton (tỉ lệ 1 : 1 v/v) thu được tyrosinase có hiệu suất thu hồi 51,15 % là tối ưu nhất

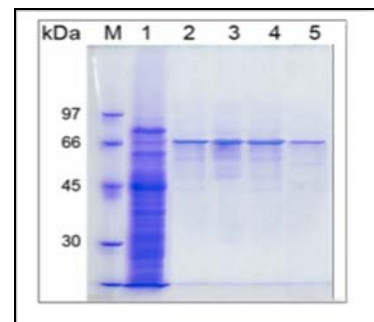
3.3.2. Tinh sạch tyrosinase bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion Mono Q HR 5/5 trên hệ thống FPLC

Dịch enzym sau kết tủa bằng dung môi aceton được hòa tan trong dung dịch đệm Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 (đệm A) sau đó tiến hành chạy sắc ký qua cột trao đổi ion (Mono Q HR 5/5) trên hệ thống FPLC. Sau khi cân bằng bằng đệm A, protein enzym được đẩy ra qua gradient 0 – 500 mM NaCl (đệm B) với tốc độ dòng chảy 0,4 ml/phút, mỗi phân đoạn thu 2ml. Kết quả được thể hiện trên sắc ký đồ hình 3.11.



Hình 3.11. Tinh chế tyrosinase qua cột MonoQ HR 5/5 trên hệ thống FPLC

Qua hình 3.11, trên sắc ký đồ xuất hiện 4 đỉnh (1,2,3,4) tiến hành xác định hoạt độ tyrosinase lần lượt tại các đỉnh là 205 U/mgPr, 397 U/mgPr, 189 U/mgPr và 156 U/mgPr.



Hình 3.13. Kết quả điện di sản phẩm tyrosinase sau tinh sạch

M: Protein chuẩn; 1: Dịch enzym kỹ thuật; 2,3,4,5: Dịch enzym tại 4 đỉnh sau sắc ký trao đổi ion

Dịch enzym thu được đem chạy điện di trên SDS-PAGE để kiểm tra độ tinh sạch và xác định khối lượng phân tử của các enzym được thể hiện trên hình 3.13.

Kết quả phân tích cho thấy cả 4 đỉnh thu được chỉ xuất hiện một băng tương ứng với có khối lượng khoảng 67 kDa và đều có hoạt tính enzym và tương đối tinh sạch. Tiến hành xác định khối lượng phân tử của sản phẩm protein theo phương pháp tính theo đối số hàm log cơ số 10 dựa trên trọng lượng phân tử của protein chuẩn và Rf giữa protein chuẩn và protein sản phẩm, kết quả khối lượng phân tử của protein tyrosinase là 66,9 kDa.

Kết quả phân tích về mức độ làm sạch và hiệu suất thu hồi cho thấy chế phẩm tyrosinaza từ *A. oryzae* TP01 sau khi sắc ký trao đổi ion qua cột Mono Q có hoạt độ riêng 204,75 U/mgPr với độ tinh sạch 18,96 lần so với tyrosinase trong dịch thô và hiệu suất thu hồi đạt 31,63 % (bảng 3.8).

Bảng 3.8. Tóm tắt quá trình tinh sạch tyrosinase

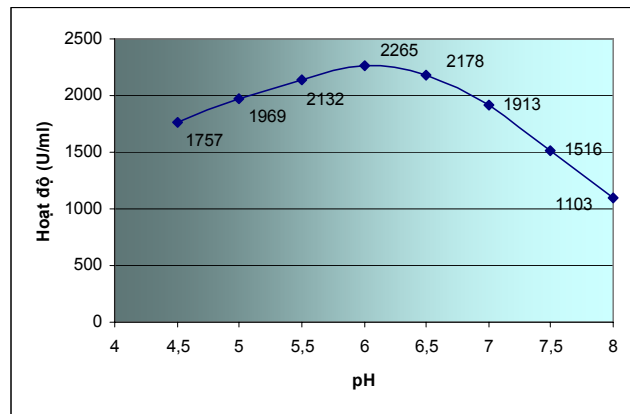
TT	Tyrosinase	Protein tổng (mg)	Tổng thể tích (ml)	Hoạt độ		Mức độ tinh sạch (lần)	Hiệu suất thu hồi (%)
				Tổng (U)	Riêng (U/mgPr)		
1	Dịch enzym thô	12.750	500	137.700	10,8	1	100
2	Sau rửa aceton	2.758,8	100	70.432,2	25,53	2,36	51,15
3	Sau khi qua cột Mono Q HR 5/5	10,635	1	2.177,5	204,75	18,96	31,63

3.4. XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA TYROSINASE TỪ *A. ORYZAE* TP01

3.4.1. Ảnh hưởng của pH tới hoạt độ tyrosinase từ *A. oryzae* TP01

pH tối ưu của tyrosinase từ A. oryzae TP01

Để xác định pH tối ưu của tyrosinase chúng tôi tiến hành thí nghiệm xác định hoạt độ của tyrosinase trong dải pH 4,5 – 8,0, nhiệt độ 25°C với các điều kiện khác không thay đổi.

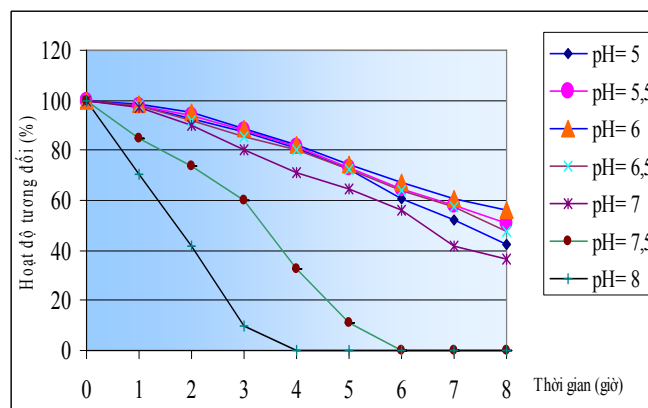


Hình 3.14. Ảnh hưởng của pH tới hoạt độ tyrosinase

Kết quả được thể hiện ở hình 3.14 cho thấy trong dải pH 5 – 7 hoạt độ khá ổn định và cao nhất tại pH 6,0.

Ảnh hưởng của pH tới độ bền của tyrosinase từ *A. oryzae* TP01

Dịch enzyme được giữ ở các pH khác nhau tại nhiệt độ phòng, lần lượt sau 1 giờ lấy ra xác định hoạt tính ở điều kiện nhiệt độ 25°C bằng phương pháp đo quang.



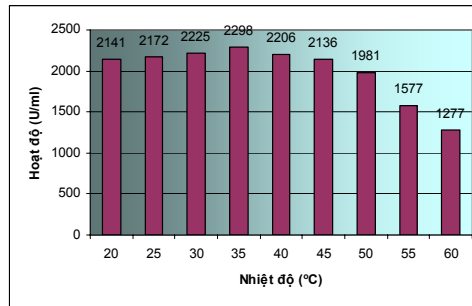
Hình 3.15. Ảnh hưởng của pH đến độ bền của tyrosinase từ *A. oryzae* TP01

Kết quả thu được trên hình 3.15 cho thấy enzyme bền trong dải pH từ 5-7. Trong dải pH này, sau 6 giờ, enzyme vẫn còn giữ được trên 55 % hoạt độ, trong khi đó pH 7,5 sau 5 giờ hoạt độ enzyme chỉ còn 10 %, khi pH 8 chỉ sau 4 giờ hoạt độ đã mất hoàn toàn.

3.4.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt độ tyrosinase từ *A. oryzae* TP01

Nhiệt độ tối ưu của tyrosinase từ *A. oryzae* TP01

Tiến hành xác định hoạt tính enzyme bằng phản ứng với cơ chất catechol tại các nhiệt độ khác nhau từ 20 - 60°C, phản ứng xảy ra trong điều kiện pH tối ưu bằng 6.

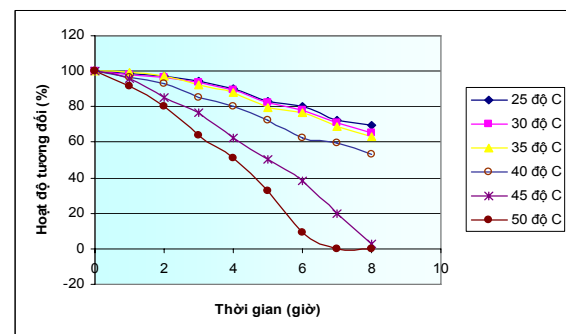


Hình 3.16. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt độ tyrosinase

Kết quả thể hiện ở hình 3.16 cho thấy hoạt độ enzym tăng dần từ 20 – 35°C và đạt giá trị cao nhất ở 35°C.

Ảnh hưởng của nhiệt độ tới độ bền tyrosinase từ *A. oryzae* TP01

Dịch enzym được giữ ổn nhiệt tại các nhiệt độ 25°C - 50°C pH 6 trong khoảng thời gian là 8 giờ, sau 60 phút lại lấy mẫu xác định hoạt độ bằng phương pháp đo quang. Kết quả trên hình 3.17 cho thấy hoạt độ của *tyrosinase* từ *A.oryzae* TP01 khá ổn định trong khoảng nhiệt độ từ 20°C - 40°C và đạt cực đại ở 35°C.



Hình 3.17. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới độ bền của tyrosinase

3.4.3. Ảnh hưởng của ion kim loại tới hoạt tính tyrosinase từ *A. oryzae* TP01

Hoạt độ tyrosinase được xác định bằng cách cho phản ứng với cơ chất catechol trong môi trường dung dịch đệm phosphat có bổ sung một số ion kim loại bao gồm: K⁺, Mg²⁺, Na⁺, Mn²⁺, Ba²⁺, Fe²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ được pha trong đệm với nồng độ 1m M, riêng ion Cu²⁺ với các nồng độ 0,01 mM, 0,1 mM và 1mM ủ với dịch enzym ở điều kiện nhiệt độ phòng (30°C), thời gian 30 phút sau đó đem xác định hoạt độ enzym.

Qua bảng 3.9 nhận thấy mỗi loại ion kim loại có ảnh hưởng khác nhau rõ rệt tới hoạt độ của tyrosinase. Trong khoảng nồng độ 1mM hoạt độ của enzym hầu như không bị ảnh hưởng bởi các ion Na⁺, Mn²⁺, Ba²⁺, Cu²⁺ (nồng độ 0,01 mM), được hoạt hoá bởi ion K⁺, Mg²⁺, bị kìm hãm bởi các ion Fe²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ và đặc biệt khi nồng độ Cu²⁺ 0,1 mM có khả năng hoạt hoá rất lớn (41%) nhưng khi tăng nồng độ lên 1mM thì lại kìm hãm hoạt độ tyrosinase rất mạnh (50%). Điều này có thể lý giải do trong trung tâm hoạt động của tyrosinase từ *A. oryzae* TP01 có chứa ion kim loại đồng nên khi nồng độ của ion Cu²⁺ thấp thì có khả năng hoạt hoá tyrosinase.

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của ion kim loại đến hoạt độ của tyrosinase

Ion kim loại (1mM)	Hoạt độ tương đối (%)
Đối chứng	100
K ⁺	138
Mg ²⁺	118
Na ⁺	104
Mn ²⁺	107
Ba ²⁺	103
Fe ²⁺	91
Ca ²⁺	85
Zn ²⁺	83
Cu ²⁺ (0,01mM)	104
Cu ²⁺ (0,1mM)	141
Cu ²⁺ (1mM)	50

3.4.4. Xác định một số thông số động học tyrosinase từ *A. oryzae* TP01 (K_m , V_{max})

Lập hệ phương trình Michaelis - Menten tính toán cho thấy với cơ chất L-Dopa có K_m đạt giá trị nhỏ nhất (0,06 mM) và vận tốc lớn nhất ($V_{max} = 4,77 \mu\text{mol/phút}$) so với tyrosin ($K_m = 0,35 \text{ mM}$, $V_{max} = 2,94 \mu\text{mol/phút}$) và catechol ($K_m = 0,15 \text{ mM}$, $V_{max} = 3,90 \mu\text{mol/phút}$). Điều này chứng tỏ L-Dopa có ái lực lớn với tyrosinase hay nói cách khác L-Dopa là cơ chất đặc hiệu nhất của tyrosinase.

3.4.5. Xác định chất kìm hãm đặc hiệu trung tâm hoạt động của tyrosinase từ *A. oryzae* TP01

Dùng các chất kìm hãm EDTA, DFP, β -mercaptoethanol với nồng độ 10^{-2} M ủ với enzym trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó tiến hành phản ứng với cơ chất catechol để xác định hoạt tính của enzym. Ta có kết quả trên bảng 3.12.

Bảng 3.12. Khảo sát các tác nhân kìm hãm đặc hiệu trung tâm hoạt động của tyrosinase

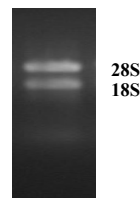
Tác nhân kìm hãm	Nồng độ (10^{-2} M)	Hoạt độ tương đối (%)
Đối chứng		100
EDTA	1	20
β -Mercaptoethanol	1	120
DFP	1	44

Qua bảng 3.12 nhận thấy DFP và EDTA là các chất kìm hãm trung tâm hoạt động của enzym đặc biệt EDTA là chất kìm hãm hoạt tính enzym mạnh nhất. Điều này cũng hợp lý bởi trung tâm hoạt động của tyrosinase có chứa ion Cu^{2+} mà EDTA có khả năng tạo phức với ion Cu^{2+} trong trung tâm hoạt động của enzym làm enzym ngừng hoạt động. Tuy nhiên DFP cũng kìm hãm tyrosinase vì vậy có thể trong trung tâm hoạt động của tyrosinase từ *A. oryzae* TP01 có nhóm -OH.

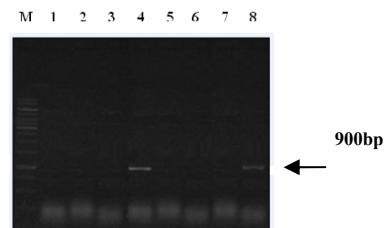
3.5. TÁCH DÒNG VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN *TYR-VN* MÃ HOÁ TYROSINASE TỪ *A. ORYZAE* TP01

Sử dụng các phương pháp sinh học phân tử cơ bản đã tách dòng và xác định trình tự được gen mã hóa tyrosinase từ *A. oryzae* TP01 với những kết quả dưới đây làm cơ sở cho các nghiên cứu tạo tyrosinase tái tổ hợp đang được tiến hành.

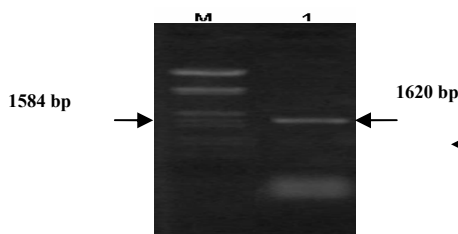
Dựa vào phần mềm PCGENE thiết kế được các đoạn mồi đặc hiệu để nhân đoạn cDNA. Trước hết tách chiết ARN tổng số thu được kết quả trên hình 3.16. Từ đây sử dụng mồi đặc hiệu để tổng hợp và khuếch đại gen mã hóa tyrosinase bằng phản ứng Nested PCR (Khi thiết kế mồi chia gen làm 2 đoạn bằng nhau và bằng 900 bp (hình 3.17). Các sản phẩm PCR được gắn vào vector pCR 2.1 và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α . Kiểm tra các plasmid tái tổ hợp rồi cắt kiểm tra ADN plasmid mang gen Tyr bằng enzym *EcoRI* (hình 3.18). Cuối cùng gép nối 2 đoạn ADN để thu gen mã hóa tyrosinase hoàn chỉnh (hình 3.19).



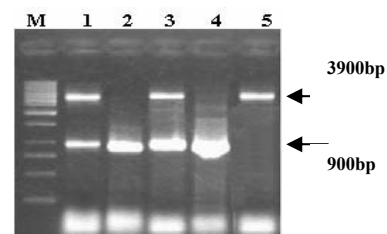
Hình 3.16. ARN tổng số từ *A. oryzae* TP01



Hình 3.17. Kết quả điện di sản phẩm PCR
M: Marker, 1,3,5,7: đối chứng âm, 2,4: sản phẩm PCR vòng 1 và 2 của gen *TYR5*, 6,8: sản phẩm PCR vòng 1 và 2 của gen *TYR3*



Hình 3.19: gen *TYR* hoàn chỉnh
M: Marker, 1: gen *TYR* hoàn chỉnh

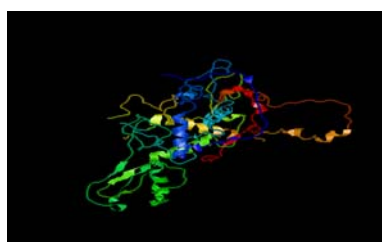


Hình 3.18. Cắt kiểm tra ADN plasmid mang gen *TYR* bằng *EcoRI*
Đường chạy M: marker, 1,3: Sản phẩm plasmid mang gen *TYR5* và *TYR3*, 2,4: Sản phẩm cắt *TYR5* và *TYR3*, 5: Vector pCR2.1

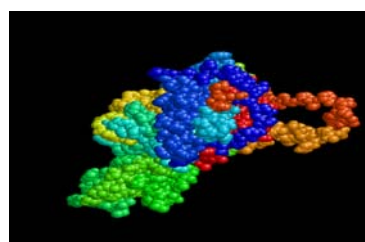
Sau khi hoàn thiện đoạn gen *Tyr-vn*, sử dụng phần mềm Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để so sánh trình nucleotid của gen tách dòng được với gen trên ngân hàng gen. Kết quả so sánh protein dịch mã từ gen *tyr-vn* tương đồng 99% so với protein dịch mã từ gen mã hoá tyrosinase của chủng nấm mốc *A.oryzae* RIB40.

Từ trình tự axit amin sử dụng phần mềm ProtParam trên trang web Expasy Home Page để phân tích. Kết quả thu được tyrosinase có khối lượng phân tử xấp xỉ 66,6 KDa, khối lượng này gần bằng kết quả phân tích khối lượng phân tử của các isozym bằng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE (hình 3.13). Cũng từ trình tự axit amin suy ra điểm đẳng điện của tyrosinase từ *A. oryzae* TP01 là 6,59.

Cấu trúc không gian của của tyrosinase được xác định nhờ phần mềm 3D-JIGSAW. Kết quả được trình bày trên hình 3.24



Cấu trúc dạng dải băng



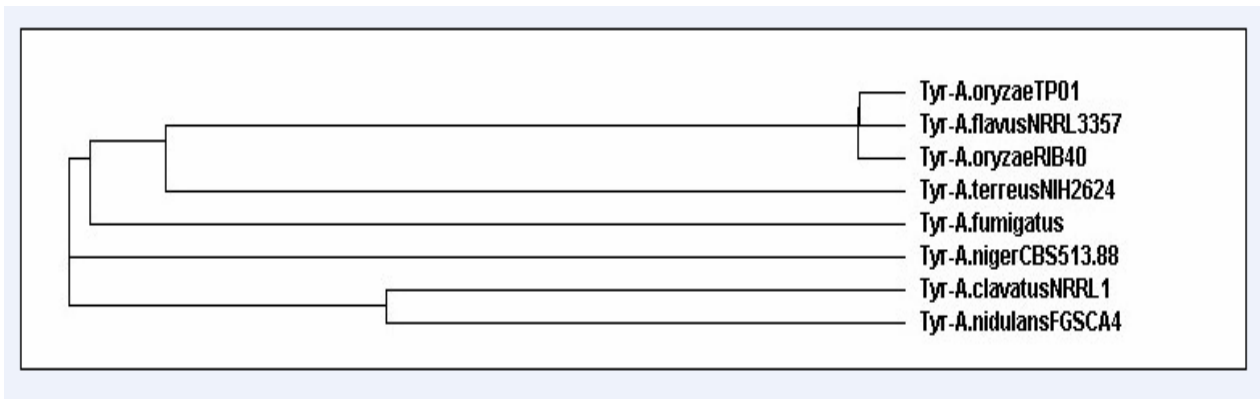
Cấu trúc dạng bề mặt phân tử

Hình 3.24. Cấu trúc không gian của tyrosinase từ *A. oryzae* TP01

Qua việc phân tích trình tự axit amin nhận thấy tyrosinase có cấu tạo và tính chất tương tự như kết quả nghiên cứu trong phần 3.4. Từ đây có thể kết luận đã thành công trong việc tách, tinh chế, xác định tính chất của tyrosinase cũng như tách dòng thành công gen mã hoá enzyme này từ nấm mốc *A. oryzae* TP01.

Dựa vào trình tự nucleotid và axit amin của gen *tyr-vn* so sánh với một số gen mã hóa tyrosinase của một số chủng nấm mốc thuộc chi *Aspergillus* đã được đăng ký trình tự trên ngân hàng gen.

Sử dụng phần mềm phân tích phát sinh chủng loại và tiến hóa phân tử ClustalW2 để phân tích số liệu, xây dựng cây phát sinh chủng loại nhằm xác định khoảng cách di truyền giữa các gen trong cùng một loài và giữa các loài khác nhau.



Hình 3.25. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen mã hóa cho tyrosinase từ chi *Aspergillus*

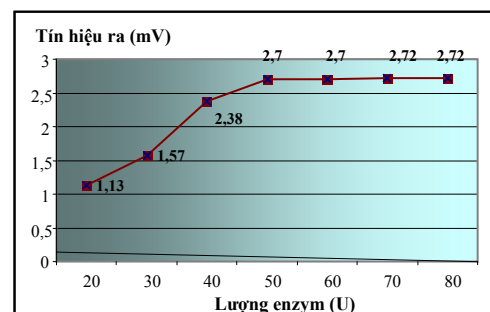
Kết quả phân tích về tương quan phát sinh chủng loại trên hình 3.25 cho thấy gen *Tyr_vn* của chủng *A. oryzae* TP01 thuộc nhóm gen mã hóa tyrosinase từ các chủng *A. oryzae* RIB40 và *A. flavus* NRRL3357.

3.6. Nghiên cứu ứng dụng tyrosinase trong tạo điện cực sinh học

3.6.1. Nghiên cứu các điều kiện cố định tyrosinase trên điện cực điện hoá

Ảnh hưởng của nồng độ enzym cố định tới tín hiệu ra

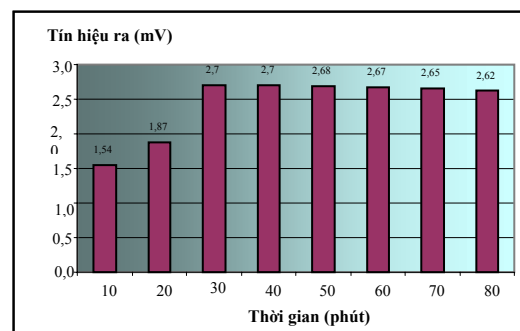
Thí nghiệm được tiến hành với thời gian cố định enzym 30 phút, nồng độ enzym cố định trên điện cực thay đổi trong dải từ 20 - 80 U, tiến hành xác định tín hiệu ra thu được trên cơ chất catechol $3 \cdot 10^{-4}$ mM. Kết quả sau 5 phút phản ứng thể hiện trên hình 3.26 cho thấy khi nồng độ enzym cố định trên điện cực từ 50 U trở lên thì tín hiệu ra cao và ổn định.



Hình 3.26. Ảnh hưởng của lượng enzym cố định tới tín hiệu ra

Ảnh hưởng của thời gian cố định enzym tới tín hiệu ra

Tiến hành phủ lên bề mặt điện cực hỗn hợp tyrosinase (50U) và BSA (so sánh) sau đó cho điện cực vào bình chứa hơi glutaraldehyt bão hòa. Cứ 10 phút lấy điện cực ra để khô và đo tín hiệu ra (mV) với cơ chất catechol $3 \cdot 10^{-4}$ M. Thí nghiệm được tiến hành như vậy đến phút thứ 80. Kết quả ở hình 3.27 cho thấy sau 30 - 40 phút tín hiệu ra đạt cao và ổn định nhất. Do vậy tại 30 phút là thời gian cố định enzym thích hợp nhất.



Hình 3.27. Ảnh hưởng của thời gian cố định tyrosinase tới tín hiệu ra

Khảo sát khả năng tái sử dụng của điện cực

Điện cực tyrosinase được tiến hành đo nhiều lần với cơ chất catechol 3.10^{-4} mM, pH 6,5 để xác định khả năng tái sử dụng của điện cực.

Bảng 3.15. Khảo sát khả năng tái sử dụng của điện cực tyrosinase

Số lần	Tín hiệu ra (mV)	Khả năng phát hiện (%)
1	2,83	100,00
2	2,81	99,29
3	2,77	97,88
4	2,70	95,41
5	2,61	92,23
6	2,51	88,69
7	2,39	84,45
8	2,27	80,21
9	2,12	74,92
10	1,95	68,91
11	1,76	62,20
12	1,56	55,12
13	1,33	46,99
14	1,10	38,87

Từ kết quả trên cho thấy điện cực có thể tái sử dụng được 12 lần tín hiệu ra vẫn tương đối ổn định tuy nhiên giá trị tín hiệu ra đã giảm 44,88 %.

**** Khảo sát khả năng bảo quản điện cực***

Điện cực tyrosinase được tiến hành bảo quản ở 4 phương án:

- Ngâm trong đệm phosphat 50mM, pH 6,5 để ở 4°C và nhiệt độ thường.
- Bọc trong giấy thiếc để ở 4°C và nhiệt độ thường.

Cứ sau 10 ngày lấy 1 điện cực ra phát hiện hợp chất phenol chuẩn là catechol 3.10^{-4} M, pH 6,5.

Bảng 3.16. Khả năng bảo quản của điện cực tyrosinase

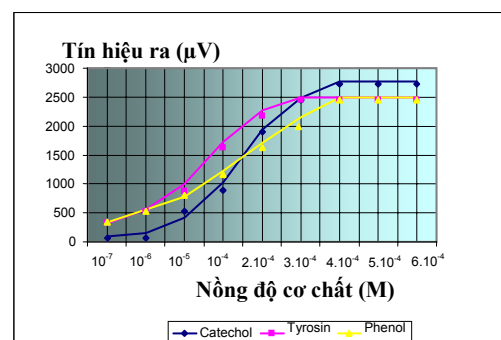
Phương pháp bảo quản	Tín hiệu ra (mV)						Khả năng phát hiện (%)
	0 ngày	10 ngày	20 ngày	30 ngày	40 ngày	50 ngày	
Ngâm trong đệm phosphat 50mM, pH 6,5, nhiệt độ thường	2,83	0,23	0	0	0	0	0
Ngâm trong đệm phosphat 50mM, pH 6,5, 4 ⁰ C	2,83	2,74	2,68	1,49	1,05	0,52	18,37
Bọc giấy thiếc, nhiệt độ thường	2,83	0,72	0	0	0	0	0
Bọc giấy thiếc, 4⁰C	2,83	2,77	2,71	2,63	2,49	2,25	79,51

Kết quả trên bảng 3.16 cho thấy sau 50 ngày bảo quản phương pháp bọc điện cực trong giấy thiếc, 4⁰C khả năng phát hiện vẫn còn 79,51%.

3.6.2. Khảo sát khả năng phát hiện và những yếu tố ảnh hưởng tới điện cực

Khả năng phát hiện các hợp chất phenol

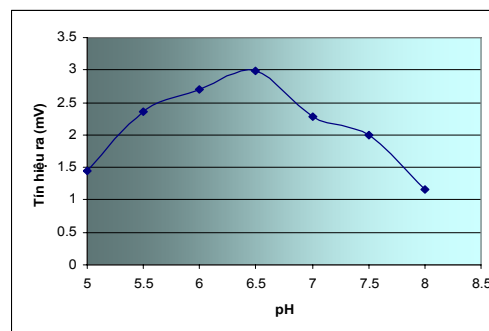
Để khảo sát khả năng phát hiện các hợp chất phenol của điện cực tyrosinase, tiến hành thí nghiệm với các cơ chất catechol, tyrosin và phenol nồng độ từ 10^{-7} M đến $6 \cdot 10^{-4}$ M, nhiệt độ, pH giữ ở điều kiện tối ưu đã khảo sát. Quan sát trên hình 3.28 nhận thấy điện cực có khả năng phát hiện các hợp chất phenol tốt nhất tại các nồng độ từ 10^{-6} M đến $3 \cdot 10^{-4}$ M, tại nồng độ tyrosin và phenol 10^{-7} M vẫn thu được tín hiệu xấp xỉ 300 μ V và ổn định qua các lần thí nghiệm, riêng catechol chỉ thu được tín hiệu ra tại nồng độ 10^{-6} M. Đây là kết quả rất khích lệ vì việc phát hiện các hợp chất phenol nồng độ thấp tương đối phức tạp.



Hình 3.28. Khả năng phát hiện các hợp chất phenol của điện cực tyrosinase

Ảnh hưởng của pH

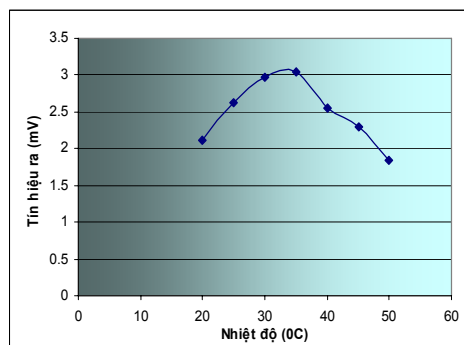
Tiếp tục khảo sát ảnh hưởng pH của dịch đem phân tích tới khả năng phát hiện của điện cực với nồng độ catechol $3 \cdot 10^{-4}$ M, dải pH thay đổi từ 5 - 8. Kết quả trên hình 3.29 cho thấy pH từ 5 - 7 kết quả đo tương đối ổn định trong đó tại pH 6,5 cho kết quả cao và ổn định nhất sau 3 lần lặp lại.



Hình 3.29. Ảnh hưởng của pH tới tín hiệu ra của điện cực tyrosinase

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng phát hiện của điện cực với cơ chất catechol 3.10^{-4} M, pH 6,5, nhiệt độ thay đổi từ 20 - 50⁰C. Từ hình 3.30 cho thấy với nhiệt độ từ 20 - 40⁰C tín hiệu ra thu được ổn định, tại 35⁰C tín hiệu đạt cao và ổn định nhất. Khi nhiệt độ thấp hơn 20⁰C và cao hơn 50⁰C không thể đo được tín hiệu ra. Vậy nhiệt độ tối ưu là 35⁰C trùng với nhiệt độ tối ưu của tyrosinase tự do.



Hình 3.30. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới tín hiệu ra của điện cực tyrosinase

Ảnh hưởng của các ion kim loại

Dựa vào kết quả khảo sát ảnh hưởng của các kim loại đến hoạt độ của tyrosinase tự do, lựa chọn các ion Cu^{2+} (nồng độ 1 mM, 0,1 mM và 0,01 mM), K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} và Zn^{2+} để khảo sát ảnh hưởng của chúng tới khả năng phát hiện của điện cực.

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của các ion kim loại tới tín hiệu ra của điện cực tyrosinase

Ion Kim loại	Tín hiệu ra (mV)	Hoạt độ (%)
Đối chứng	2,67	100
Cu^{2+} (1 mM)	1,69	63,30
Cu^{2+} (0,1 mM)	3,54	132,58
Cu^{2+} (0,01 mM)	2,68	100,37
K^+ (1 mM)	3,15	117,98
Mg^{2+} (1 mM)	2,83	105,99
Ca^{2+} (1 mM)	2,65	99,25
Zn^{2+} (1 mM)	2,63	98,50

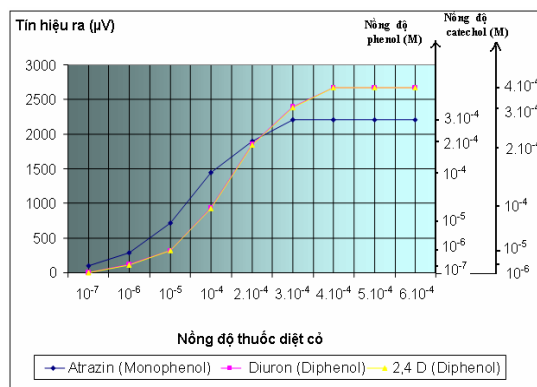
Kết quả trên bảng 3.17 cho thấy các ion Cu^{2+} nồng độ 1 mM kìm hãm mạnh mẽ khả năng phát hiện của điện cực (mất 36,70 %) trong khi ion Cu^{2+} (0,1 mM) và ion K^+ (1 mM) lại làm tăng khả năng phát hiện của điện cực, các ion khác có nồng độ 1 mM như Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} và Cu^{2+} (0,01 mM) gần như không ảnh hưởng gì tới khả năng phát hiện của điện cực

3.6.3. Ứng dụng điện cực tyrosinase thăm dò khả năng phát hiện các hợp chất phenol

Sau khi xác định ảnh hưởng của pH, nhiệt độ và các ion kim loại, tiến hành xây dựng đồ thị đường chuẩn của phenol và catechol làm cơ sở để định lượng các hợp chất phenol có trong thuốc diệt cỏ và nước thải.

Khả năng phát hiện một số loại thuốc diệt cỏ

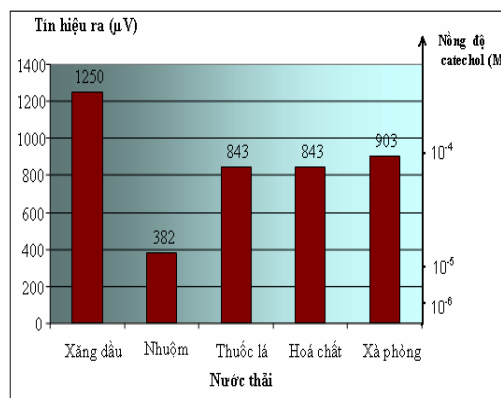
Tiến hành thí nghiệm với 3 loại thuốc diệt cỏ atrazin (mono phenol), diuron và axit 2,4-diclophenoxiacetic (diphenol) với các nồng độ từ 10^{-7} - 6.10^{-4} M để khảo sát khả năng phát hiện của điện cực tyrosinase. Kết quả thí nghiệm cho thấy với atrazin cảm biến có khả năng phát hiện tại nồng độ 10^{-7} M trong khi diuron và axit 2,4-diclophenoxiacetic (2,4D) thì cảm biến chỉ phát hiện được tới nồng độ 10^{-6} M.



Hình 3.31. Khả năng phát hiện một số loại thuốc diệt cỏ của điện cực tyrosinase

* Khả năng phát hiện các hợp chất phenol trong nước thải

Tiến hành thí nghiệm với nước thải của các nhà máy xăng dầu, nhuộm, hoá chất, xà phòng và thuốc lá. Các mẫu nước thải được pha loãng 20 lần. Tiến hành đo tín hiệu ra của từng loại nước thải, lấy cơ chất catechol làm đối chứng để xác định khoảng nồng độ các hợp chất phenol trong nước thải. Kết quả tại hình 3.32 cho thấy điện cực sinh học có khả năng phát hiện các loại nước thải ở nồng độ 10^{-6} M. Trong năm loại nước thải trên nước thải nhà máy xăng dầu chứa nhiều các hợp chất phenol nhất (khoảng 3.10^{-3} M), sau đó đến nước thải nhà máy xà phòng (khoảng 2.10^{-3} M) rồi đến nước thải nhà máy thuốc lá và hoá chất (khoảng $1,7.10^{-3}$ M), cuối cùng là nước thải nhà máy nhuộm khoảng $2,2.10^{-4}$ M.



Hình 3.32. Khả năng phát hiện hợp chất phenol trong nước thải của điện cực tyrosinase

KẾT LUẬN

- 1- Từ 38 chủng vi sinh trong bộ sưu tập giống của Viện CNSH-CNTTP ĐHBKHN và tự phân lập đã tuyển chọn được chủng *A. oryzae* TP01 có hoạt tính cao nhất. Từ đó khảo sát và tìm ra môi trường dinh dưỡng và điều kiện lên men tối ưu cho chủng *A. oryzae* TP01 sinh tổng hợp tyrosinase (g/l): Glucose: 15; Pepton: 0,5; NH_4NO_3 : 2,3; KH_2PO_4 : 5; MgSO_4 : 0,2; trisodium xitrat: 3; catechol: 0,05; pH 5,0, nhiệt độ: 31°C , số vòng lắc: 200 v/p, thời gian lên men: 49 giờ hoạt tính enzym thu được 600 U (trên lượng sinh khối tế bào thu được từ 100 ml môi trường nuôi cấy).

- 2- Bằng phương pháp kết tủa axeton 50% (v/v) sắc ký trao đổi ion Mono Q HR 5/5 trên hệ thống FPLC thu được tyrosinase có độ tinh sạch gấp 18,96 lần so với dịch thô ban đầu, hoạt độ riêng đạt 204,75 U/mgPr, hiệu suất đạt 31,63%.
- 3- Đã xác định được một số đặc tính của tyrosinase từ nấm mốc *A. oryzae* TP01: nhiệt độ tối ưu 35°C, pH tối ưu 5, bền trong vùng nhiệt độ từ 20 - 40°C và bền trong dải pH từ 5 - 7. Các ion kim loại kích thích hoạt tính enzym là K^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} (0,1 mM); các ion kim loại ức chế enzym là Fe^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} và Cu^{2+} (1 mM). Chất kìm hãm đặc hiệu trung tâm hoạt động của enzym được xác định là EDTA, xác định được các thông số động học của tyrosinase lần lượt với các cơ chất tyrosin, catechol và L-DOPA là $K_m = 0,352$ mM, $V_{max} = 2,94$ μ mol/phút; $K_m = 0.15$ mM, $V_{max} = 3,9$ μ mol/ phút và $K_m = 0,06$ mM; $V_{max} = 4,77$ μ mol/ phút (tương ứng).
- 4- Đã thành công trong việc tách dòng và giải trình tự gen mã hóa tyrosinase từ chủng *A. oryzae* TP01. Đoạn gen này gồm 1620 nucleotit, có độ tương đồng 99% về trình tự nucleotit và axit amin so với gen mã hoá tyrosinase của chủng *A. oryzae* RIB40 đã công bố trên ngân hàng gen từ đó suy ra cấu trúc và một số đặc tính của enzym.
- 5- Đã tìm được điều kiện thích hợp để cố định tyrosinase trên điện cực điện hóa đảm bảo tín hiệu đo cao và ổn định: tyrosinase 50 U, thời gian 30 phút, BSA 1,3 mg, đặt trong hơi glutaraldehyt bão hoà, khả năng tái sử dụng 12 lần. Điện cực tyrosinase bảo quản trong túi thiếc ở 4°C sau 50 ngày khả năng phát hiện vẫn còn 79,51%.
- 6- Đã xác định được điều kiện để phát hiện hàm lượng phenol của điện cực tyrosinase: nhiệt độ 30°C, pH 6,5; nồng độ cơ chất $10^{-7} - 4.10^{-4}$ M. Điện cực có khả năng phát hiện các hợp chất mono phenol từ nồng độ 10^{-7} M, hợp chất diphenol từ nồng độ 10^{-6} M.
- 7- Bước đầu ứng dụng điện cực tyrosinase phân tích nhanh 3 loại thuốc diệt cỏ atrazin, diuron, 2,4 D và các hợp chất phenol trong nước thải các nhà máy xăng dầu, hoá chất, thuốc lá, nhuộm, xà phòng.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục các nghiên cứu tạo chủng tái tổ hợp từ đó sản xuất tyrosinase từ *A. oryzae* TP01 tái tổ hợp.
- Nghiên cứu hoàn thiện ứng dụng điện cực tyrosinase để có thể định lượng chính xác các hợp chất phenol có lẫn các tạp chất trong nước thải.
- Ứng dụng điện cực tyrosinase định lượng các hợp chất phenol trong nông sản, thực phẩm.