

NGHIÊN CỨU TẠO ĐIỆN CỰC TYROSINASE TỪ *ASPERGILLUS ORYZAE* TP01 VÀ ỨNG DỤNG

TRỊNH THỊ THU HÀNG, NGUYỄN THỊ XUÂN SÂM, ĐỖ THỊ THU HUYỀN, ĐẶNG THỊ THU

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tyrosinase (EC 1.14.18.1) là enzym thuộc nhóm polyphenoloxydase có chứa ion kim loại đồng (Cu^{2+}) trong trung tâm hoạt động. Enzim này xúc tác phản ứng hydroxyl hóa các monophenol thành *o*-diphenol và oxi hóa *o*-diphenol thành dopaquinone [5].

Tyrosinase được nghiên cứu từ nhiều năm qua và đã được ứng dụng một cách rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như y học, công nghiệp thực phẩm, xử lý và phát hiện ô nhiễm hợp chất phenol trong môi trường... đặc biệt tạo điện cực tyrosinase để phân tích nhanh các hợp chất phenol trong nước thải và trong các nông sản thực phẩm. Ưu điểm lớn nhất của điện cực tyrosinase là thiết bị nhỏ gọn, thời gian phân tích nhanh, giá thành rẻ, kết quả chính xác [1, 6, 7].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và hoá chất

- Tyrosinase từ nấm mốc *Aspergillus oryzae* TP01.
- Hoá chất: L-DOPA, Catechol, L-Tyrosine, Phenol, L-ascobic, β -Mertacaptan ethanol, EDTA, Tris-HCl, Acrylamide, Bromphenol blue, methanol ... hãng Sigma (Mỹ), Merk (Đức) và một số hoá chất thông dụng khác.
- Vi điện cực do Viện Quốc tế đào tạo về khoa học vật liệu (ITIMS) Đại học Bách Khoa Hà Nội cung cấp.

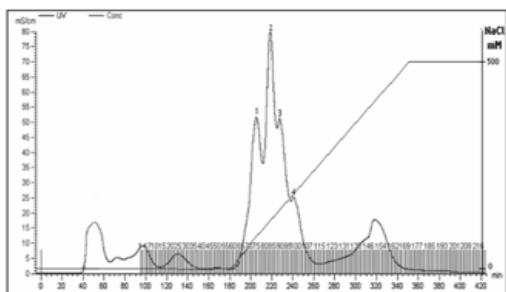
2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Tinh chế tyrosinase bằng phương pháp kết tủa aceton và sắc ký trao đổi ion cột MonoQ HR 5/5 trên hệ thống FPLC [3].
- Kiểm tra độ tinh sạch tyrosinase bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamid SDS – PAGE [3]
- Tạo điện cực tyrosinase bằng điện cực điện hóa.
- Ứng dụng điện cực tyrosinase phát hiện nhanh các hợp chất phenol.

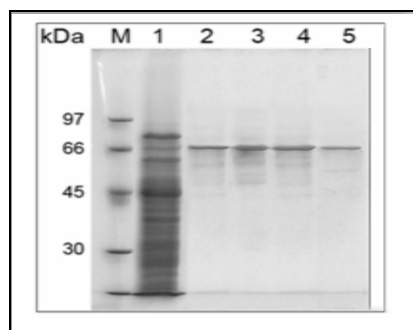
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách, tinh sạch tyrosinase

Dịch enzym sau kết tủa bằng aceton (1:1 v/v) được hòa tan trong đệm Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 (đệm A) sau đó tiến hành chạy sắc kí qua cột trao đổi ion (Mono Q HR 5/5) trên hệ thống FPLC. Sau khi cân bằng bởi đệm A, protein enzym được đẩy ra bằng gradient 0 – 500 mM NaCl (đệm B) với tốc độ dòng chảy 0,4 ml/phút, mỗi phân đoạn thu 2 ml. Kết quả phân tích thu được ở hình 1. Trên sắc kí đồ xuất hiện 4 đỉnh đều cho hoạt độ tyrosinase lần lượt là 205 U/mg, 397 U/mg, 189 U/mg và 156 U/mg. Dịch enzym thu được ở 4 đỉnh cho chạy điện di trên SDS-PAGE. Kết quả hình 2 cho thấy cả 4 đỉnh đều xuất hiện băng tương ứng với khối lượng phân tử 67 kDa và đều có hoạt tính tyrosinase, điều này thể hiện tyrosinase từ *A. oryzae* có 4 isozym phù hợp với công bố của Halaouly (2005) [2].



Hình 1. Tinh chế tyrosinase qua cột trao đổi ion MonoQ HR 5/5 trên hệ thống FPLC



Hình 2. Kết quả điện di các mẫu tyrosinase (M: Marker, 1: tyrosinase sau kết tủa aceton, 2,3,4,5: tyrosinase từ 4 đỉnh sau khi qua cột MonoQ HR 5/5)

Bảng 1. Kết quả quá trình tinh sạch tyrosinase

TT	Các bước tinh sạch	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 tủa aceton	2.758,8	100	70.432,2	25,53	2,36	51,15
3	Sau sắc kí trao đổi ion (cột Mono Q HR 5/5)	212,7	20	43.550,3	204,75	18,96	31,63

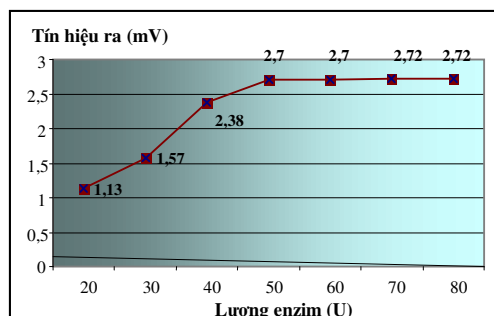
Kết quả bảng 1 phân tích về mức độ làm sạch và hiệu suất thu hồi cho thấy chế phẩm tyrosinase từ *A. oryzae* TP01 sau khi kết tủa bằng aceton và sắc kí trao đổi ion qua cột Mono Q có mức độ tinh sạch 18,96 lần và hiệu suất thu hồi đạt 31,63%.

3.2. Nghiên cứu tạo điện cực điện hoá tyrosinase

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

- Ảnh hưởng lượng enzym cố định tới tín hiệu ra

Tiến hành thí nghiệm cố định hỗn hợp enzym trên điện cực với lượng thay đổi từ 20 - 80 U, điện cực đã gắn enzym được đặt 30 phút trong hơi glutaraldehyt bão hòa sau đó cho phản ứng với cơ chất catechol 3×10^{-4} mM trong 5 phút. Xác định tín hiệu đầu ra bằng cách đo hiệu điện thế giữa hai điện cực. Kết quả nhận được trên hình 5 cho thấy nồng độ enzym cố định là 50U cho tín hiệu ra cao và ổn định nhất.

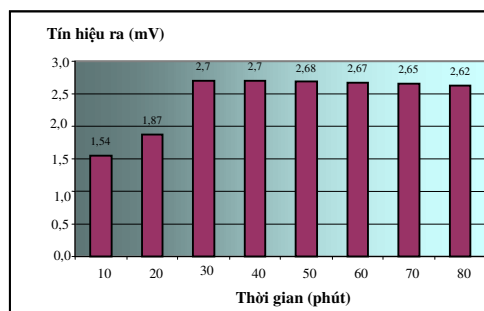


Hình 5. Ảnh hưởng của lượng enzym cố định tới tín hiệu ra

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

Phủ lên bề mặt điện cực hỗn hợp tyrosinase (50U), BSA (1,3 mg) và glycerol, đồng thời điện cực so sánh được phủ BSA (1,3 mg) và glycerol, 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 3×10^{-4} M. Thí nghiệm được tiến hành cho đến phút thứ 80. Kết quả ở hình 6 cho thấy tại 30 phút tín hiệu ra cao và ổn định nhất. Vậy 30 phút là thời gian thích hợp để cố định enzym. Kết quả này tương tự với kết quả của Tuan Mai Anh và cộng sự (2003) [6].

Từ các kết quả trên cho thấy điều kiện để gắn tyrosinase trên điện cực tốt nhất là lượng tyrosinase 50U, BSA 1,3 mg đặt trong hơi glutaraldehyt bão hòa trong 30 phút.



Hình 6. Khảo sát thời gian cố định enzym

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. Kết quả trên bảng 2 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%. Sau đó dùng dung dịch $K_2Cr_2O_7$ tẩy nhẹ màng enzym, ngâm trong acetone 12 giờ, rửa nhẹ bằng nước khử ion, để khô và cố định lại enzym để tiếp tục đo.

Bảng 2. Khảo sát khả năng tái sử dụng của điện cực

Số lần	Tín hiệu ra (mV)	Hiệu suất (%)
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

Nghiên cứu điều kiện bảo quản điện cực

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

- Ngâm vào dung dịch đệm phosphat 50 mM, pH 6,5 để ở 4°C và nhiệt độ phòng.
- Bảo quản trong túi thiếc ở 4°C và nhiệt độ phòng.

Cứ sau 10 ngày lấy 1 điện cực ra phân tích với hợp chất phenol chuẩn là catechol 3×10^{-4} M, pH 6,5.

Bảng 3. Khả năng bảo quản của điện cực

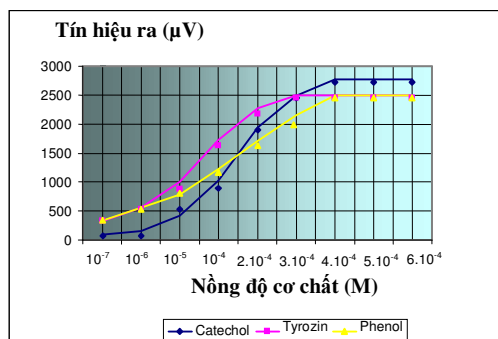
Phương pháp bảo quản	Tín hiệu ra (mV)						Hiệu suất còn lại (%)
	0 ngày	10 ngày	20 ngày	30 ngày	40 ngày	50 ngày	
Ngâm trong đệm phosphat 50mM, pH 6,5, nhiệt độ thường	2,83	0,23	0	0	0	0	0
Ngâm trong đệm phosphat 50mM, pH 6,5, 4°C	2,83	2,74	2,68	1,49	1,05	0,52	18,37
Bọc giấy thiếc, nhiệt độ thường	2,83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

Kết quả trên bảng cho thấy sau 50 ngày bảo quản bằng phương pháp ngâm điện cực trong đệm ở nhiệt độ 4°C tín hiệu ra vẫn còn 18,37%, phương pháp bảo quản điện cực trong túi thiếc, 4°C tín hiệu ra còn 79,51% trong khi để ở nhiệt độ phòng với cả hai phương pháp bảo quản điện cực không giữ được quá 10 ngày. Như vậy bằng phương pháp bảo quản trong túi thiếc giữ ở 4°C kéo dài thời gian bảo quản điện cực do điện cực hoàn toàn cách li với ánh sáng, không có oxi không khí nên enzym không bị oxi hoá, với phương pháp này điện cực không bị ẩm nên bền hơn khi ngâm trong đệm. Như vậy chúng tôi chọn phương pháp bảo quản điện cực trong túi thiếc ở 4°C là thích hợp nhất.

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

- Khả năng phát hiện các hợp chất phenol

Thí nghiệm được tiến hành với các cơ chất catechol, tyrosin và phenol nồng độ từ 10^{-7} M đến 6×10^{-4} M, nhiệt độ 35°C, pH 6. Quan sát trên hình 7 cho thấy điện cực có khả năng phát hiện các hợp chất phenol tốt ở các nồng độ từ 10^{-6} M đến 3×10^{-4} M, tín hiệu ra luôn ổn định, với 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. Vì vậy, điện cực có thể xác định được các loại monophenol tới nồng độ 10^{-7} M, diphenol tới 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.



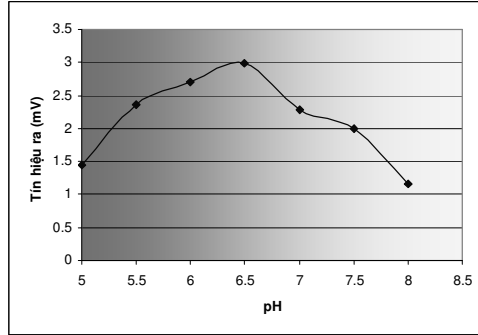
Hình 7. Khả năng phát hiện các hợp chất phenol

- Ảnh hưởng của Ph

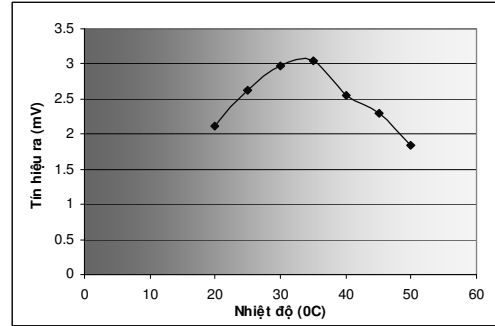
Tiếp tục khảo sát ảnh hưởng pH của dịch cần phân tích tới khả năng phát hiện của điện cực với nồng độ catechol 3×10^{-4} M, dải pH thay đổi từ 5 - 8. Kết quả trên hình 8 cho thấy pH từ 5 - 7 kết quả đo tương đối ổn định trong đó tại pH 6,5 cho kết quả cao và ổn định nhất sau 3 lần lặp lại. Vậy pH tối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

- Ảnh hưởng của nhiệt độ

Giống như pH, khi 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 - 50°C. Từ hình 9 cho thấy với nhiệt độ từ 20 - 40°C tín hiệu ra thu được ổn định, tại 35°C tín hiệu đạt cao và ổn định nhất. Khi nhiệt độ thấp hơn 20°C và cao hơn 50°C không thể đo được tín hiệu ra. Vậy nhiệt độ tối ưu để điện cực hoạt động tốt nhất là 35°C.



Hình 8. Ảnh hưởng của pH



Hình 9. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Ảnh hưởng của các ion kim loại

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. Kết quả trên bảng 4 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. Kết quả này rất khả quan cho việc sử dụng điện cực tyrosinase phát hiện các hợp chất phenol trong nước thải. Vì thông thường trong nước thải có rất nhiều các ion kim loại với nồng độ khác nhau có ảnh hưởng rất lớn tới hoạt tính của enzym tự do.

Bảng 4. Ảnh hưởng của các ion kim loại

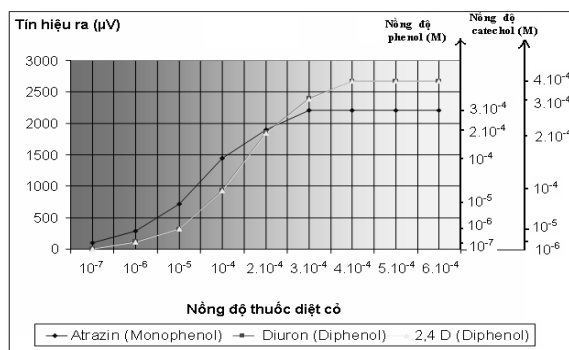
Ion Kim loại	Tin hiệu ra (mV)	Hoạt độ (%)
Đối chứng	2,67	100
Cu^{2+} (1 mM)	1,69	63,30
Cu^{2+} (0,1 mM)	3,54	132,58
Cu^{2+} (0,01 mM)	2,68	100,37
K^+ (1 mM)	3,15	117,98
Mg^{2+} (1 mM)	2,83	105,99
Ca^{2+} (1 mM)	2,65	99,25
Zn^{2+} (1 mM)	2,63	98,50

Tuy nhiên enzym được cố định trên điện cực không chịu tác động nhiều của các ion kim loại dẫn tới loại trừ được một phần lớn sự nhiễu sóng tới kết quả đo hay nói cách khác kết quả đo sẽ có độ chính xác cao hơn.

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

- Khả năng phát hiện một số loại thuốc diệt cỏ

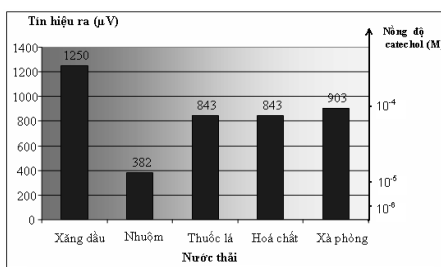
Tiến hành thí nghiệm với 3 loại thuốc diệt cỏ atrazin (mono phenol), diuron và axit 2,4-diclophenoxiacetic (diphenol) với các nồng độ từ 10^{-7} – 6×10^{-4} để khảo sát khả năng phát hiện của điện cực tyrosinase. Kết quả trên hình 10 cho thấy với atrazin điện cực có khả năng phát hiện tại nồng độ 10^{-7} M trong khi diuron và axit 2,4-diclophenoxiacetic (2,4D) thì điện cực chỉ phát hiện được tới nồng độ 10^{-6} M. Khi so sánh kết quả này với khả năng phát hiện catechol và phenol tinh khiết thì hoàn toàn phù hợp.



Hình 10. Khả năng phát hiện một số loại thuốc diệt cỏ

- 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. Qua hình 11 nhận thấy điện cực tyrosinase 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 (3×10^{-3} M), tiếp đến nước thải nhà máy xà phòng (2×10^{-3} M), nhà máy thuốc lá, hoá chất ($1,7 \times 10^{-3}$ M) và nhà máy nhuộm ($2,2 \times 10^{-4}$ M).



Hình 11. Khả năng phát hiện hợp chất phenol trong nước thải

Từ kết quả trên cho thấy điện cực tyrosinase khá nhạy và ổn định có thể phát hiện được các hợp chất phenol trong nước thải với nồng độ 10^{-6} M. Kết quả này tương đương với kết quả của Tuan Mai Anh và cộng sự.

4. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp kết tủa aceton kết hợp sắc kí qua cột 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%.

Xác định được điều kiện thích hợp cố định enzym trên điện cực: lượng tyrosinase 50U, BSA 1,3 mg, đặt trong hơi glutaraldehyt bão hoà 30 phút, khả năng tái sử dụng 12 lần. Điện cực tyrosinase bảo quản trong túi thiếc ở 4°C sau 50 ngày độ nhạy phát hiện còn 79,51%.

Điều kiện thích hợp để phân tích nhanh hàm lượng phenol của điện cực tyrosinase: nhiệt độ 30°C, pH 6,5; nồng độ cơ chất $10^{-7} - 4 \times 10^{-4}$ M (mono phenol: 10^{-7} M – 3×10^{-4} , diphenol: 10^{-6} M – 4×10^{-4}).

Bước đầu ứng dụng điện cực tyrosinase phát hiện 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abhijith K. S, Sujith Kumar P. V, Kumar M. A, and Thakur M. S. - Immobilised tyrosinase-based biosensor for the detection of tea polyphenols, *Anal. Bioanal Chem.* **389** (2007) 2227–2234.
2. Halaouli, Asther S., Sigoillot M, Hamdi J. C., Lomascolo M. - Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications, *J. Appl. Microbiol.* **100** (2) (2006) 219–232.
3. Hoefer Scientific instruments - Protein electrophoresis - Applications guide, United States of America, 1994, pp. 17-52.
4. Jianwen Zhao, Daohong Wu, Jinfang Zhi - A novel tyrosinase biosensor based on biofunctional ZnO nanorod microarrays on the nanocrystalline diamond electrode for detection of phenolic compound, *Bioelectrochemistry* **75** (2009) 44- 49.
5. Kwang-Hoon Kong, Nin-PyoHong, Sang-Sook Choi, Yong-Tare Kim, and Sung-Hye Cho - Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermonicrobium roseum*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31** (2000) 113-118.
6. Tuan Mai Anh, Sergei V. Dzyadevych, Minh Chau Van, Nicole Jaffrezic Renault, Chien Nguyen Duc and Jean-Marc Chovelon - Conductometric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites, *Talanta* **63** (2) (2003) 365-370.
7. Xuejiang Wang, Ling Chen, Siqing Xia, Zhiliang Zhu, Jianfu Zhao, Jean-Marc Chovelon and Nicole Tafferezic Renaul - Tyrosinase biosensor based on interdigitated electrodes for herbicides determination, *Int. J. Electrochem. Sci.* **1** (2006) 55-61.

SUMMARY

STUDY ON MAKING TYROSINASE BIOSENSOR FROM *ASPERGILLUS ORYZAE* TP01 AND ITS APPLICATION

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 is used to medicine, food industry and environmental protection, especially used to create the biosensor.

Tyrosinase has been purified by Mono Q HR 5/5 column in FPLC system with the result of 18.96 folds as the crude enzyme, its specific activity is 204.75 U/mgPr and its yield is 31.63%.

Determining the optimum condition to immobilise the enzyme on biosensor: the amount of tyrosinase is 50U, duration of 30 minutes, BSA of 1.3mg in saturated glutaraldehyde, reutilization of 12 times. After 50 days the biosensor is preserved in the tinned bag at 4°C, the output signal remains 79.51%.

The optimum condition of the biosensor is the temperature of 30°C, pH 6.6, substrate density of $10^{-7} - 4 \times 10^{-4}$ M. Biosensor has been detected monophenol compound from the density of 10^{-7} M– 3×10^{-4} M and diphenol compound from 10^{-6} M – 4×10^{-4} M.

Application of tyrosinase biosensor has been detected atrazine, diuron, 2,4D and phenol compounds in waste water from the petroleum, chemical, tobacco, dyeing and soaping factories.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 25 tháng 12 năm 2009

Trịnh Thị Thu Hằng,

Viện Đại học Mở Hà Nội,

Nguyễn Thị Xuân Sâm, Đỗ Thị Thu Huyền, Đặng Thị Thu,

Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.