

TUYỂN CHỌN CHỦNG NẤM MỐC *ASPERGILLUS* sp CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP GLUCOOXYDAZA CAO

Nguyễn Thúy Hoàng, Ngô Tiến Hiền, Nguyễn Minh Thu,
Khuất Thị Thủy, Đàm Lam Thanh, Trần Thị Châu

Viện Công nghiệp thực phẩm

Đến Tòa soạn ngày: 9/10/2010

1. MỞ ĐẦU

Enzim glucooxydaza (GOD) (còn gọi là β -D-glucose:oxygen 1-oxidoreductase, EC 1.1.3.4) là enzym xúc tác cho phản ứng oxy hóa β -D-glucoza thành glucono- δ lactone và hydroperoxit khi có mặt oxy.

Trong tự nhiên glucooxydaza được tìm thấy trong các mô động vật, thận, gan trong canh trường của nấm mốc, nhất là các loài *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *P. glaucum*, *P. amagasakiense*, *P. chrysogenum*, *P. vitale* và một số loài khác [9].

Glucooxydaza là một enzym thương phẩm quan trọng được sử dụng ngày càng rộng rãi trong chế biến thực phẩm, để sản xuất axit gluconic, định lượng glucoza trong quá trình lên men và trong chuẩn đoán y học [7, 8, 9].

Quá trình sinh tổng hợp enzym glucooxydaza chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố trong đó chủng giống đóng vai trò quan trọng quyết định năng suất của quá trình sinh tổng hợp. Trong bài báo này, chủng nấm mốc *A. niger* 9.4 đã được nghiên cứu tuyển chọn.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

- **Chủng vi sinh vật:** 22 chủng *Aspergillus* có nguồn gốc khác nhau được lưu giữ trong Suu tập giống Vi sinh vật công nghiệp thực phẩm của Viện Công nghiệp Thực phẩm có khả năng sinh tổng hợp GOD được sử dụng.

- **Môi trường sơ tuyển:** (Môi trường John Marwell) (g/l): NaNO₃ 3; Glucoza 18; K₂HPO₄ 1; Glycerol 20; MgSO₄.7H₂O 0,5; thạch 20; KCl 0,5; Methyl Red 0,01; FeSO₄.7H₂O 0,01; Nước cất 1lít.

- **Môi trường nhân giống:** Giống được cấy vào bình tam giác 100 ml chứa 20 ml môi trường, lắc 150 v/p/ 24 giờ, ở 30⁰C. Môi trường nhân giống (g/l): Glucoza 100; NaNO₃ 3; Cao nấm men 2; KH₂PO₄ 1; KCl 0,5; MgSO₄.7H₂O 0,5; FeSO₄.7H₂O 0,01; Nước cất 1lít; pH 6,2 (Liu *et all*, 2001) [4]. Thanh trùng 121⁰C trong 20 phút, làm nguội xuống 30⁰C trước khi tiếp 2ml dịch huyền phù bào tử (7x10⁵ bào tử/ ml).

- **Môi trường sinh tổng hợp glucooxydaza** (Liu *et all*, 1999) [3] (môi trường MT1) có thành phần (g/l): Glucoza 100; KH₂PO₄ 0,35; ure 0,55; MgSO₄.7H₂O 0,15; CaCO₃ 3; Nước cất 1lít; pH 6,2. Bình lên men được tiếp 10% (v/v) giống đã nuôi cấy lắc 24 giờ.

2.2. Phương pháp

- **Lên men sinh tổng hợp glucooxydaza:** Thí nghiệm được thực hiện trong bình tam giác 100 ml có chứa 20 ml môi trường lên men MT1. Tiếp 10% (v/v) giống 24 giờ tuổi. Nuôi cấy trên máy lắc 150 v/p trong 48 giờ ở nhiệt độ 30°C.

- **Thu hồi sinh khối:** Sau lên men sinh khối sợi nấm được thu hồi bằng phương pháp lọc chân không. Rửa 3 lần bằng nước muối vô trùng.

- **Thu nhận dịch enzym thô:** Sinh khối sợi nấm thu được sau lọc được phá vỡ bằng siêu âm (thiết bị sonopuls HD 2200, của hãng Bandelin - Đức) tần số 80kHz trong 30 giây nhiệt độ 4°C kết hợp với bi thủy tinh [6]. Sau đó thu hồi dịch enzym bằng cách ly tâm ở chế độ 10,000 v/p ở 4°C trong 10 phút. Dịch trong màu vàng phía trên là enzym thô và được dùng để xác định hoạt tính enzym GOD.

- **Phương pháp phân tích:** Hoạt lực enzym glucooxydaza được xác định theo phương pháp sử dụng bộ KIT xác định hoạt tính GOD của hãng Megazyme (Ireland).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sơ tuyển chủng tổng hợp enzym GOD

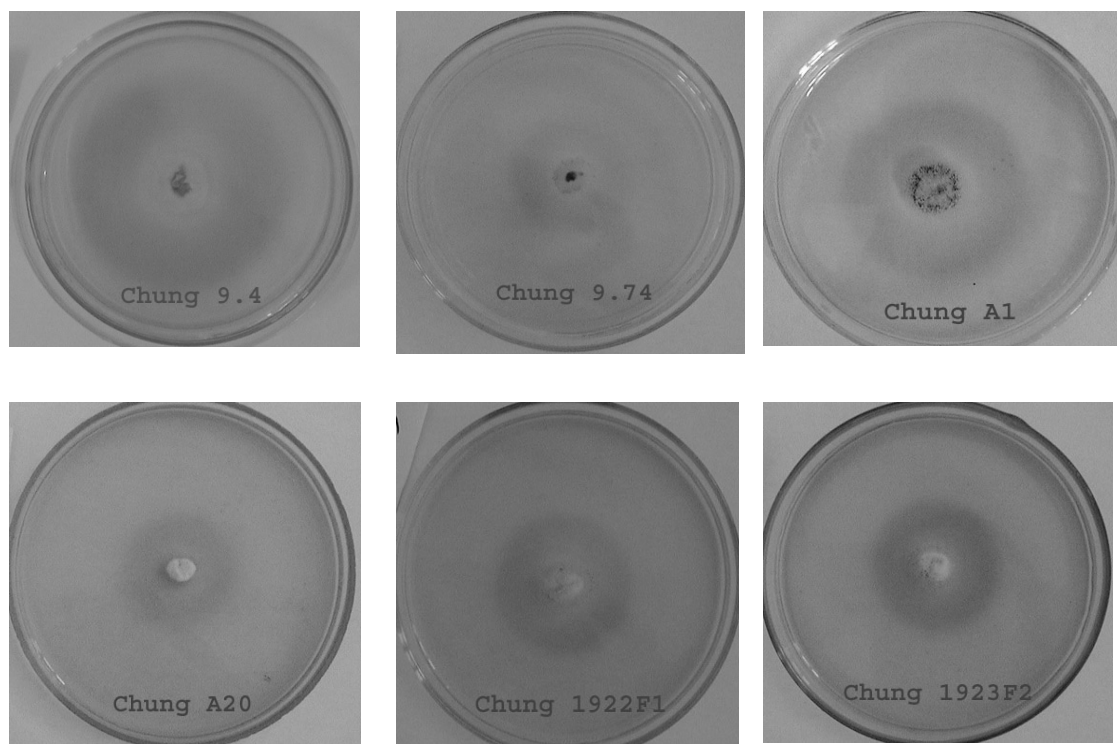
22 chủng *Aspergillus sp* được cấy chắm trên môi trường sơ tuyển (Môi trường John Marwell) có chứa 0,001% methyl đỏ, mỗi chủng cấy 3 đĩa, nuôi 48 giờ ở 30°C. Sau 48 giờ ủ, đo vòng màu hồng xung quanh khuẩn lạc (hình 1). Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Đường kính vòng màu hồng tạo thành sau 48 giờ nuôi cấy ở 30°C

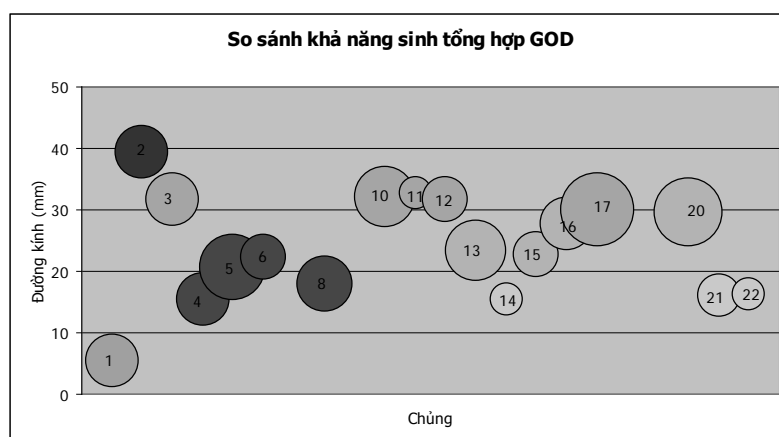
TT	Kí hiệu chủng	Đường kính vòng màu hồng (mm)				TT	Kí hiệu chủng	Đường kính vòng màu hồng (mm)			
		D ₁	D ₂	D ₃	D _{tb}			D ₁	D ₂	D ₃	D _{tb}
1	7	5	7	4	5,3 ± 3,79	12	A1	33	31	31	31,7 ± 2,87
2	9.4	39	41	38	39,3 ± 3,79	13	A2	24	21	25	23,3 ± 5,17
3	9.74	33	32	30	31,7 ± 3,79	14	A3	16	15	15	15,3 ± 1,43
4	9.76	15	14	17	15,3 ± 3,79	15	A4	24	22	22	22,7 ± 2,87
5	9.94	22	18	22	20,7 ± 5,74	16	A5	29	26	28	27,7 ± 3,79
6	334	23	21	23	22,3 ± 2,87	17	A20	33	27	30	30,0 ± 7,45
7	758	0	0	0	0,0 ± 0,00	18	Đ	24	24	24	24,0 ± 0,00
8	45a	17	17	20	18,0 ± 4,30	19	K1	0	0	0	0,0 ± 0,00
9	1920F	0	0	0	0,0 ± 0,00	20	K2	30	27	32	29,7 ± 6,25
10	1922F1	30	34	32	32,0 ± 4,97	21	R2	15	17	16	16,0 ± 2,48

11	1923F2	33	32	33	$32,7 \pm 1,43$	22	R3	16	16	17	$16,3 \pm 1,43$
----	--------	----	----	----	-----------------	----	----	----	----	----	-----------------

Ghi chú: D1; D2; D3 là đường kính vòng màu hồng xung quanh khuẩn lạc của đĩa 1, 2 và 3. D_{tb} là đường kính trung bình của 3 đĩa.



Hình 1. Vòng phản ứng màu với methyl đỏ sau 48 giờ ủ



Hình 2. Vị trí các chủng theo đường kính vòng phản ứng màu với chỉ thị methyl đỏ sau 48 giờ ủ

Kết quả bảng 1 và hình 1; 2 cho thấy: Trong 22 chủng *Aspergillus* sp sơ tuyển, có 3 chủng kí hiệu 758; 1920F và K1 là không có vòng màu hồng xung quanh khuẩn lạc, 6 chủng kí hiệu: 9.4; 9.74; 1922F1; 1923F2; A1; A20 có đường kính vòng màu hồng xung quanh khuẩn lạc lớn nhất (từ 30 - 39 mm). Trong số 6 chủng trên chủng *A. niger* 9.4 có đường kính vòng màu hồng xung quanh khuẩn lạc lớn nhất (39,5 mm) và chủng *Aspergillus* sp A20 là chủng có đường kính vòng màu hồng xung quanh khuẩn lạc nhỏ nhất (30 mm).

Theo John Markwell (1989) trên môi trường màu vàng, những khuẩn ty xung quanh bị axit hóa sẽ làm môi trường chuyển sang hồng khi có mặt methyl đỏ. Dựa vào đường kính vòng phản ứng màu với methyl đỏ, chủng nào có vòng phản ứng màu càng lớn thì có thể sẽ sinh tổng hợp glucooxydaza càng mạnh. Vòng màu hồng là kết quả của việc sinh axit xitric của khuẩn lạc và cũng có thể là kết quả của phản ứng oxy hóa D-glucoza thành axit gluconic nhờ enzym glucooxidaza khi có mặt oxy [4]. Theo Liu (1999) việc tạo ra axit gluconic với nồng độ thấp sẽ thúc đẩy quá trình sinh tổng hợp enzym GOD và với nồng độ axit gluconic là 0,4 mmol/l sẽ cho sản lượng enzym tốt nhất. Ở nồng độ axit gluconic cao hơn sẽ làm giảm pH môi trường nuôi cấy vì thế quá trình sinh tổng hợp enzym bị kìm hãm [7]. Vì vậy, để khẳng định khả năng sinh tổng hợp enzym glucooxidaza, 6 chủng kí hiệu: 9.4; 9.74; 1922F1; 1923F2; A1; A20 được lên men trong môi trường sinh tổng hợp để xác định hoạt lực enzym glucooxydaza.

3.2. Chọn chủng nấm mốc sinh tổng hợp enzym glucooxydaza (GOD) cao nhất

Từ kết quả khảo sát sơ bộ trên 6 chủng có nhiều khả năng sinh GOD cao kí hiệu: 9.4; 9.74; 1922F1; 1923F2; A1; A20 được lên men trong môi trường sinh tổng hợp. Sau khi lên men sinh khối sợi nấm được thu hồi và xác định khối lượng sinh khối ướt. Thu nhận enzym và xác định hoạt tính enzym GOD. Kết quả được sử dụng để đánh giá và lựa chọn chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp enzym glucooxydaza cao nhất. Thí nghiệm được tiến hành 3 đợt, mỗi đợt 2 mẫu lặp được thực hiện cho mỗi chủng thử nghiệm.

Kết quả phân tích các mẫu lặp và các đợt thí nghiệm cho thấy qui trình và các điều kiện thử nghiệm ổn định. Bảng 2 tổng hợp kết quả phân tích lựa chọn chủng nấm có khả năng sinh tổng hợp enzym glucooxydaza cao nhất.

Bảng 2. Hoạt tính sinh enzym GOD của 6 chủng

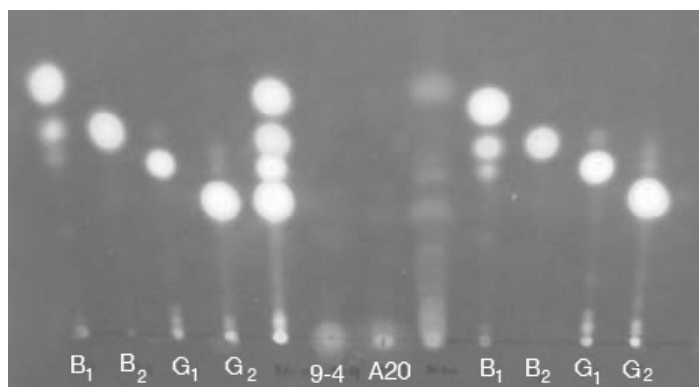
TT	Kí hiệu chủng	Sinh khối (g/20 ml)	GOD nội bào (U/gSK)	GOD ngoại bào (U/ml)
1	9.4	1,39 ± 0,09	32,90 ± 0,20	3,17 ± 4,32
2	9.74	0,88 ± 0,26	0,01 ± 17,85	0
3	A1	1,06 ± 0,12	0,01 ± 0,03	0
4	A20	0,80 ± 0,11	24,27 ± 0,03	3,13 ± 0,00
5	1922F1	1,12 ± 0,16	17,11 ± 13,19	1,78 ± 3,36
6	1922F2	0,88 ± 0,18	5,17 ± 3,97	0,75 ± 4,48

Chủng 9.4 cho sinh khối cao nhất (1,39 g/20 ml), 5 chủng còn lại tỉ lệ sinh khối thu được là gần tương đương nhau. Hoạt tính GOD ở 3 chủng 9.74; A1 và 1922F2 rất thấp. Chủng 9.4 cho hoạt tính GOD cao nhất (32,90 U/gSK), tiếp đến là chủng kí hiệu A20 (hoạt tính GOD đạt 24,27 U/g SK). Cả 6 chủng nghiên cứu đều sinh enzym nội bào, lượng enzym ngoại bào tiết ra môi trường là rất thấp hoặc không có.

Với kết quả thử nghiệm trên, hai chủng kí hiệu 9.4 và A20 được lựa chọn để kiểm tra khả năng sinh độc tố aflatoxin B₁; B₂; G₁; G₂.

3.3. Kiểm tra độ an toàn của chủng 9.4 và A20

Các mycotoxin là những sản phẩm trao đổi thứ cấp của nấm mốc như *Aspergillus*, *Furasium*, *Penicillium*[3]. Hiện có 4 loại aflatoxin đã được xác định là B₁; B₂; G₁; G₂ ngoài việc gây ngộ độc cấp tính (liều gây chết người khoảng 10 mg) chúng còn được xem là nguyên nhân gây xơ gan và ung thư gan mạnh nhất [1];[2]. Vì vậy, để đảm bảo an toàn cho chế phẩm sau này 2 chủng kí hiệu 9.4 và A20 cho hoạt lực glucooxydaza cao được kiểm tra độc tố aflatoxin B₁; B₂; G₁; G₂ bằng cách nuôi cấy trên môi trường MT1. Sau 3 ngày nuôi ở 30°C, 4 loại độc tố aflatoxin có độc tính cao B₁; B₂; G₁; G₂ được kiểm tra bằng phương pháp sắc kí bản mỏng (TLC) dưới ánh sáng huỳnh quang với marker là aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ chuẩn. Kết quả được thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Sắc kí đồ phân tích độc tố Aflatoxin B₁; B₂; G₁; G₂ của hai chủng 9.4 và A20

Kết quả kiểm tra cho thấy cả hai chủng 9.4 và A20 đều không có màu huỳnh quang của các độc tố aflatoxin B₁; B₂; G₁; G₂.

2 chủng *A. niger* 9.4 và A20 không sinh độc tố, hai chủng này là an toàn sử dụng để sinh tổng hợp enzym glucooxydaza. Dựa trên kết quả kiểm tra độc tố aflatoxin và kết quả lên men sinh tổng hợp enzym GOD chủng *A. niger* 9.4 được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

4. KẾT LUẬN

Enzym glucooxydaza được sinh tổng hợp từ các loài *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *P. glaucum*, *P. amagasakiense*, *P. chrysogenum*, *P. vitale* và một số loài khác. Quá trình sinh tổng hợp enzym glucooxydaza chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố trong đó chủng giống đóng vai

trò quan trọng quyết định năng suất của quá trình. Trong bài báo này, chủng nấm mốc *A. niger* 9.4 đã được nghiên cứu tuyển chọn.

Từ 22 chủng *Aspergillus* sp trong sưu tập giống Vi sinh vật Công nghiệp Thực phẩm của Viện CNTP đã chọn được chủng *Aspergillus niger* 9.4 có khả năng sinh tổng hợp enzym GOD cao nhất (32,9U/g sinh khối). Chủng *A. niger* 9.4 cũng đã được kiểm tra độ an toàn của chủng giống bằng phương pháp sắc kí bản mỏng (TLC) dưới ánh sáng huỳnh quang và đã được chứng minh là không sinh độc tố aflatoxin B1, B2, G1 và G2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Xuân Đồng - Nguyên lý phòng chống nấm mốc và mycotoxin, Nxb Khoa học kỹ thuật, Hà Nội, 2004.
2. Nguyễn Thị Hiền, Phan Thị Kim, Trương Thị Hoà, Lê Thị Lan Chi - VSV nhiễm tạp trong lương thực, thực phẩm, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, 2005.
3. Accensi F., Cano J., Figueira L., Abarca M. L., Cabañes F. J. - New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate, FEMS Microbiology Letters **180** (1999) 191-196.
4. John Marwell, Laura G. Frakes, Eugene C. Brott, John Osterman, and Fred W. Wagner - *Aspergillus niger* mutants with increased glucose oxidase production, Appl. Microbiol Biotechnol. **30** (1989) 166-169.
5. Kobayashi H., Van Dedem G., and Moo. Young M. - Oxygen transfer into mycelia pellets, Biotechnol. Bioeng. **15** (1973) 27-45.
6. Kristensen S. R. - Mechanisms of cell damage and enzyme release, Department of Clinical Chemistry, Odense University Hospital **41** (4) (1994) 423-33.
7. Liu J. Z., Yang H. Y., Weng L. P and Ji L. N. - Synthesis of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus niger* in resting cell culture system, Letter in Applied Microbiology **29** (5) (1999) 337-341.
8. Pickering G. J. - The production of reduced alcohol wine using glucose oxidase. PhD. Thesis, Lincoln University, New Zealand, 1997.
9. Pickering G. J. - The use of enzymes to stabilise colour and flavour in wine: Australian Grapegrower & Winemaker **417** (1998) 01-102.
10. Pickering G. J. - The use of glucose oxidase in winemaking, Proceeding of the 1st EIL Oenology and Viticulture Seminar Series, Eastern. Eastern Institute of technology. New Zealand G. J. Pickering (Ed). Campus Press, New Zealand, 2000, pp. 11-21.

SUMMARY

SELECTION THE STRAIN OF *ASPERGILLUS* sp FOR BIOSYNTHESIS OF GLUCOSE OXYDASE ENZYME

The **glucose oxydase** enzyme (GOx) (EC 1.1.3.4) binds to beta-D-glucopyranose (a hemiacetal form of the six-carbon sugar glucose) and aids in breaking the sugar down into its metabolites. GOx is a dimeric protein that catalyzes the oxidation of beta-D-glucose into D-

glucono – 1,5- lactone (which then hydrolyzes to gluconic acid) using molecular oxygen and releasing hydrogen peroxide. GOx can be used in the removal of either glucose or oxygen from foodstuffs in order to improve their storage capability.

Among the 22 strains of *Aspergillus* in the National Food industrial Culture Collection of Microorganism of Food Industries Research Institute (FIRI), 6 strains coded as 9.4; 9.74; 1922F1; 1923F2; A1; A20 showed high glucose oxydase enzyme synthesis activity. The strain *A. niger* 9.4 and A20 had the highest glucose oxydase enzyme synthesis activity were selected to test forming aflatoxin. Both of them were negative with aflatoxin B1, B2, G1 and G2 on the test medium. The strain *A. niger* 9.4 synthesized GOx enzyme with the highest content (32.9 U/g of the biomass) was selected for further study to product glucose oxydase enzyme.