

TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH CỦA LACCASE TÁI TỔ HỢP TỪ *ASPERGILLUS NIGER* D15#26 lcc1 1.8B

Nguyễn Thị Phương Mai^{1,2}, Lê Quang Hòa¹, Tô Kim Anh¹

¹Viện Công nghệ sinh học - Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, ²Khoa Công nghệ thực phẩm – Trường Cao đẳng Cộng đồng Hà Tây

Email: tokimanh@mail.hut.edu.vn

Đến Tòa soạn: 25/2/2012; Chấp nhận đăng: 17/11/2012

TÓM TẮT

Laccase là một enzym có ứng dụng công nghiệp rất rộng rãi. Laccase từ *Trametes versicolor* là enzym có thể oxy hóa khử lớn và là nguồn gen hấp dẫn cho nghiên cứu biểu hiện enzym. Laccase 1 từ *T. versicolor* 06 được biểu hiện trong *A. niger* D15#26 lcc1 1.8B, với cơ chất cảm ứng là glucose, đạt hoạt độ cao nhất 4250 U/L sau 7 ngày nuôi ở tốc độ lắc 200 v/phút, pH 6. Laccase tái tổ hợp đã được tinh chế nhờ kết tủa phân đoạn với ammonium sulfate 40 % - 80 % bão hòa ở 4 °C và sắc kí trên cột Hitrap Q Fast Flow với gradien NaCl 0 – 1 M, đạt hiệu suất thu hồi enzym 26 %, hoạt độ riêng 34,7 U/mg protein, tăng 41,19 lần so với enzym thô. Laccase tinh sạch có khối lượng phân tử 70 kDa, phản ứng tối ưu ở nhiệt độ 45⁰C và pH 4. Enzym bền trong khoảng nhiệt độ từ 30 – 35 °C và pH 4 - 6. Các thông số động học của laccase trong phản ứng với ABTS là K_m 1,35 μ M; V_{max} 53,14 μ M/phút¹; K_{cat} $10,42 \times 10^6$ s⁻¹ và K_{cat}/K_m $7,72 \times 10^6$ μ M⁻¹s⁻¹ cho thấy enzyme hoạt động hiệu quả trong oxy hóa cơ chất ABTS.

Từ khoá: Laccase, *Trametes versicolor*, *Aspergillus niger* D15#26, ABTS, mediator

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Laccase (EC 1.10.3.2) là một polyphenol oxidase chứa nhiều nguyên tử đồng trong trung tâm xúc tác và thường được gọi là polyphenol oxidase đa đồng. Laccase có khả năng xúc tác phản ứng chuyên hóa hợp chất phenol thành các gốc quinon và sau đó oxy hóa chúng thành quinon, phản ứng oxy hóa gắn liền với sự khử phân tử oxy tạo thành nước. Laccase được ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp bao gồm tẩy trắng giấy, tẩy màu của thuốc nhuộm vải, loại bỏ hợp chất phenol dư trong rượu, khử độc môi trường, trong sản xuất nhiên liệu sinh học...Laccase có thể thu nhận từ vi khuẩn, thực vật và côn trùng nhưng với hoạt tính hạn chế. Các laccase trong nấm được quan tâm nhiều hơn do khả năng xúc tác của chúng. Các chủng tổng hợp laccase trong tự nhiên thường có hoạt tính thấp và đòi hỏi các chất cảm ứng tạo enzym với giá thành cao. Trong thời gian gần đây việc sản xuất laccase tái tổ hợp đã góp phần giảm đi tính phức tạp của quá trình lên men tổng hợp enzym.

Các hệ thống đã được sử dụng để biểu hiện laccase thành công cho đến nay bao gồm vi khuẩn, nấm men và nấm sợi. Laccase biểu hiện trong vi khuẩn và nấm men thường không cho phép thu nhận được enzym hoạt tính cao do yêu cầu glycosyl hóa của các nguồn gen nấm mốc.

Hệ thống biểu hiện laccase trong nấm sợi có ưu điểm là thực hiện quá trình glycosyl hóa tương tự như nấm mốc ở trạng thái tự nhiên, có khả năng tiết ra một lượng lớn protein tái tổ hợp. Hệ thống biểu hiện nấm sợi thành công chủ yếu là *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *A. sojae*, *Trichoderma reesei*, trong *A. niger* được xem là một trong các hệ thống biểu hiện phổ biến và thành công nhất [1, 2] do khả năng tổng hợp một lượng lớn các enzym tái tổ hợp với hiệu suất cao hơn so với các vật chủ biểu hiện khác. Các công bố cho rằng laccase có thể được biểu hiện với hiệu suất 36,6%.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả về động thái tổng hợp enzym, tinh sạch và đặc tính của laccase tái tổ hợp từ *A. niger* D15#26 *lcc1* 1.8B. Các thông số động học phản ứng enzym (sử dụng cơ chất ABTS) cũng được tính toán và thảo luận.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng *A. niger* D15#26 *lcc1* 1.8B biểu hiện *lcc1* từ *T. versicolor* 06, được cung cấp bởi Viện Công nghệ sinh học-Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội

Thành phần môi trường nuôi cấy nấm mốc

MT1 (g/l) – Môi trường thu bào tử: NaNO₃ 85 mM; KCl 75 mM; KH₂PO₄ 136 mM; MgSO₄ 1 M; glucose 5 %; agar 1 % và 1 ml dung dịch nguyên tố vi lượng (1000 X bao gồm: ZnSO₄ 288 mM, H₃BO₄ 62 mM, MnCl₂ 198 mM, FeSO₄ 278 mM, CoCl₂ 238 mM, CuSO₄ 250 mM, Na₂MoO₄ 242 mM, EDTA 372 mM), pH 5.

MT2 (g/l) – Môi trường sinh tổng hợp laccase : MgSO₄. 7H₂O 0,05 %; NaNO₃ 1 %; KH₂PO₄ 0,05 %; glucose 2,5 %; pepton 1 %; CuSO₄ 0,075 % và 1ml dung dịch nguyên tố vi lượng, pH 6.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định hoạt độ laccase với 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)

Dung dịch phản ứng enzym gồm: 850 μ l dung dịch đệm sodium acetate 0,1 M pH 5, 100 μ l ABTS 1 mM. Ủ hỗn hợp này ở 27 °C trong 10 phút. Bổ sung 50 μ l enzym. Trộn đều hỗn hợp phản ứng so sánh với mẫu kiểm chứng sau mỗi phút phản ứng. Phản ứng kiểm chứng sử dụng nước khử ion thay cho enzym

Một đơn vị hoạt độ laccase là lượng enzym cần thiết để xúc tác oxy hóa 1 μ mol ABTS trong 1 phút ở 27 °C trong dung dịch đệm sodium acetate pH 5.

2.2.2. Xác định protein bằng phương pháp Lowry

Lấy 2 ml dịch mẫu vào ống nghiệm sau đó bổ sung 1 ml dung dịch C (Hỗn hợp dung dịch Na_2CO_3 2 % pha trong NaOH 0,1 N và 5 % dung dịch $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ pha trong sodium citrate 1 %, theo tỉ lệ 50 : 1). Để phản ứng trong 10 phút rồi bổ sung 0,1 ml thuốc thử folin, sau đó để phản ứng xảy ra tiếp trong 30 phút và đo độ hấp thụ màu ở bước sóng 750 nm. Dựa vào đường chuẩn BSA và độ hấp thụ ở bước sóng 750 nm để biết nồng độ protein có trong mẫu phân tích [3].

2.2.3. Xác định đường khử theo phương pháp DNS

Lấy 1 ml dung dịch mẫu cho vào ống nghiệm cùng với 3 ml dung dịch DNS và lắc đều. Hỗn hợp tiếp đó được đun sôi trong 5 phút và sau đó được làm lạnh nhanh tới nhiệt độ phòng. Chuyển dung dịch đã làm nguội sang bình định mức dung tích 10ml và thêm nước cất tới vạch. Dựa vào đường chuẩn glucose 0 ÷ 2 (mg/ml) và độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm để biết nồng độ đường khử có trong mẫu phân tích [4].

2.2.4. Điện di biến tính protein trên gel polyacrylamide

Điện di protein được thực hiện trên gel polyacrylamid 12% theo phương pháp Laemmli. Trộn 20 μl mẫu với 5 μl đệm mẫu (loading dye blue 4X gồm 0,1 M Tris HCl pH 6,8; 0,2 M DTT, 4 % SDS, 20 % glycerol; 0,2 % bromophenol blue) đun sôi trong 10 phút. Sau đó 25 μl mẫu được đưa vào các giếng với thang chuẩn protein (Fermentas), tiến hành điện di với cường độ dòng điện 14 mA/2 giờ. Gel sau khi điện di được nhuộm qua đệm bằng dung dịch Coomassie brilliant blue, tẩy màu trong dung dịch methanol: axit acetic: nước (4 : 1 : 5) [5].

2.2.5. Điện di không biến tính, nhuộm với ABTS phát hiện laccase

Điện di không biến tính được tiến hành trên gel polyacrylamid 12 %. Trộn 20 μl mẫu với 5 μl đệm mẫu (loading dye blue 4X gồm 0,05 M Tris HCl pH 6,8; 0,5 % SDS, 10 % glycerol; 0,1 % bromophenol blue) để phản ứng ở 27 °C trong 10 phút. Sau đó 25 μl mẫu được đưa vào các giếng với thang chuẩn protein (Fermentas), tiến hành điện di với cường độ dòng điện 14 mA/2 giờ ở 4 °C. Gel sau điện di được chia làm hai phần, một phần được nhuộm với Coomassie Brilliant Blue để xác định vị trí của các băng protein, phần gel còn lại được sử dụng để xác định băng hoạt tính của laccase theo các bước: Rửa gel bằng đệm sodium acetate 0,1 M ở pH 5, nhuộm gel bằng dung dịch 0,1 mM ABTS trong 10 phút cho đến khi xuất hiện các băng sáng xanh thì kết thúc (băng sáng xanh chính là băng hoạt tính của laccase tái tổ hợp). Ghép hai phần gel với nhau xác định băng hoạt tính và khối lượng phân tử của laccase [6].

2.2.6. Thu bào tử nấm mốc trên đĩa thạch

Bào tử của nấm mốc thu được nhờ cấy nấm mốc trên môi trường MT1 ở 30 °C trong 4 – 5 ngày. Thu bào tử bằng dung dịch NaCl 0,9 %, đếm số bào tử trên buồng đếm hồng cầu. Dịch bào tử sau khi thu được bảo quản ở 4 °C.

2.2.7. Nuôi cấy nấm mốc và tổng hợp enzym

A. niger D15#26lcc1 1.8B được nuôi trong bình tam giác 250 ml có chứa 100 ml môi trường MT2 ở nhiệt độ 30 °C, tốc độ lắc 200 vòng/phút tại các nồng độ glucose; nồng độ CuSO_4 (sử dụng dung dịch gốc 1 % CuSO_4 tiệt trùng) và tỉ lệ giống cấp ban đầu khác nhau; Các điều kiện khác giữ nguyên bao gồm pH 6; nồng độ NaNO_3 1% và nồng độ pepton 1%. Định kì lấy mẫu và phân tích sinh khối nấm mốc, nồng độ glucose, pH và hoạt độ laccase.

2.2.8. Tinh chế laccase tái tổ hợp

Li tâm 650 ml canh trường nuôi cấy nấm mốc ở 12.000 vòng/phút, 4⁰C trong thời gian 15 phút. Dịch enzym sau li tâm được kết tủa phân đoạn với (NH₄)₂SO₄ 40 % - 80 % bão hòa ở 4 °C qua đêm. Thu kết tủa của các phân đoạn, hòa trong 10 ml đệm sodium acetate 0,1 M pH 5; dịch enzym được loại muối qua cột milipore 30 kDa thu 6 ml, xác định hàm lượng protein và hoạt độ enzym. Đưa 3 ml dịch enzym lên cột Hitrap Q fast flow, hệ thống FPLC, Amersham Pharmacia Biotech, đã được cân bằng trước với đệm sodium acetate pH 5 (đệm A) với tốc độ dòng 0,5 ml/phút. Protein được rửa khỏi cột nhờ đệm A với NaCl gradient 0 – 1 M với tốc độ 0,5 ml/phút. Thu các phân đoạn sắc kí 2 ml/phân đoạn, xác định protein và hoạt độ laccase của các phân đoạn.

2.2.9. Khảo sát đặc tính cơ bản của enzym

Xác định pH tối ưu và độ bền pH

Laccase được phân tích hoạt độ tại các pH từ 3 – 7 (đệm sodium acetate 0,1 M, pH 4 - 5 và đệm citrate – photphat 0,1 M, pH 3, 6 và 7). Để xác định độ bền pH của enzym, dung dịch laccase được ủ trong đệm sodium acetate 0,1 M (pH 4 - 5) và đệm citrate – photphat 0,1 M (pH 3, 6 và 7) trong 7 giờ ở 27 °C. Sau mỗi giờ, xác định hoạt độ laccase còn lại ở điều kiện tiêu chuẩn. Đánh giá độ bền laccase theo % hoạt độ laccase còn lại so với đối chứng (hoạt độ enzym xác định ở điều kiện chuẩn).

Xác định nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt

Laccase được xác định hoạt độ tại các nhiệt độ trong dải từ 30 °C – 60 °C với đệm sodium acetate 0,1 M, pH 4. Để xác định độ bền nhiệt của enzym, enzym được ủ tại các nhiệt độ kiểm tra trong 7 giờ trong đệm sodium acetate 0,1M, pH 4. Cứ sau mỗi giờ, xác định hoạt độ enzym ở điều kiện tiêu chuẩn. Đánh giá % hoạt độ laccase còn lại so với đối chứng (hoạt độ enzym xác định ở điều kiện chuẩn).

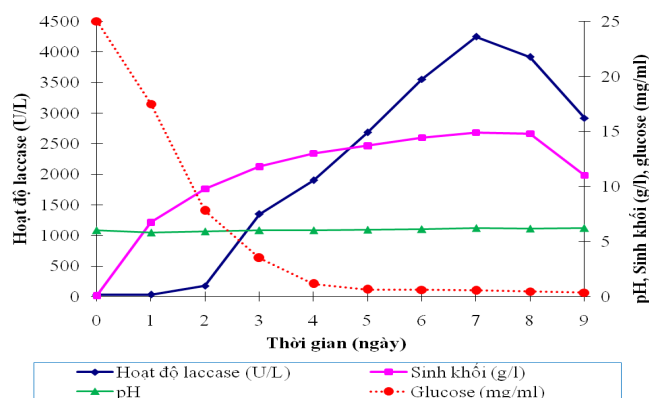
Xác định hằng số động học enzym K_m , V_{max} và K_{cat}

Thực hiện phản ứng enzym với cơ chất ABTS nồng độ từ 0,1 – 1 mM, đo độ hấp thụ ở bước sóng 420 nm trong 3 phút. Tính K_m , V_{max} và K_{cat} dựa trên phương trình động học theo Lineaweaver và Burk [7].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Động thái sinh tổng hợp laccase tái tổ hợp từ *A. niger* D15#26 lcc1 1.8B

Chủng *A. niger* D15#26 lcc1 1.8B được nuôi trong điều kiện môi trường có pH ban đầu $6,0 \pm 0,2$, nồng độ glucose 2,5 %, nồng độ CuSO₄ 0,075 %, lên men ở 30 °C trên máy lắc 200 vòng/phút. Thu 100 ml canh trường sau mỗi ngày để xác định sinh khối, pH, nồng độ glucose và hoạt tính laccase. Kết quả được trình bày ở hình 3.1.



Hình 3.1. Động thái sinh tổng hợp laccase tái tổ hợp từ *A. niger* D15#26lcc1 1.8B

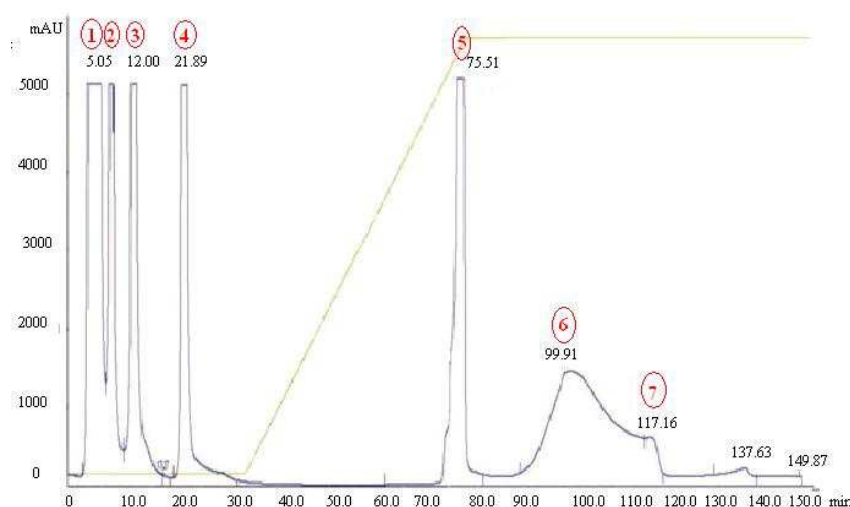
Kết quả cho thấy *A. niger* D15#26lcc1 1.8B sinh trưởng mạnh ở pha log từ ngày 2 – 4, sinh khối đạt cực đại 14,9 g/l vào ngày thứ 7. Laccase bắt đầu được tích lũy trong canh trường ở ngày nuôi cấy thứ 2, tại đó sinh trưởng của nấm mốc tăng nhanh và nồng độ glucose giảm xuống nhanh chóng. Sinh tổng hợp laccase mạnh nhất khi canh trường đạt pha cân bằng, nồng độ glucose giảm về giới hạn (khoảng 1 mg/ml), và hoạt độ tích lũy cực đại vào ngày thứ 7, đạt 4250 U/L. Khi glucose trong môi trường cạn, sinh khối giảm mạnh kéo theo sự giảm của laccase trong canh trường. Kết quả khảo sát động thái tổng hợp laccase trong canh trường gián đoạn cho thấy, sự tổng hợp laccase không gắn liền với sinh trưởng của nấm mốc. Kết quả này phù hợp với nhận xét của Vandertol-Vanier và cộng sự [8].

3.2. Tinh sạch laccase tái tổ hợp

Việc biểu hiện protein tái tổ hợp có gắn đuôi His – tag cho phép việc tinh sạch protein trở nên dễ dàng hơn để thu nhận các protein tái tổ hợp có độ tinh sạch cao. Tuy nhiên, biểu hiện enzym có gắn đuôi His-tag trong một số trường hợp sau khi tinh sạch hoạt tính enzym bị giảm, ngoài ra hiệu suất thu hồi enzym khi sử dụng cột His - tag khá thấp và khó áp dụng trên qui mô sản xuất lớn. Tùy vào mục đích sử dụng, khi các laccase được sử dụng ở dạng chế phẩm kỹ thuật, không cần tới nhu cầu tinh chế enzym, có thể thiết kế biểu hiện các laccase không mang đuôi Histidin. Cũng vì lý do như vậy, trong nghiên cứu này, laccase từ *T. versicolor* 06 được biểu hiện trong nấm mốc *A. niger* D15#26lcc1 1.8B không gắn đuôi nhận biết Histidin. Để làm sạch enzym, vì thế laccase được tinh sạch tương tự như laccase từ các chủng nấm tự nhiên.

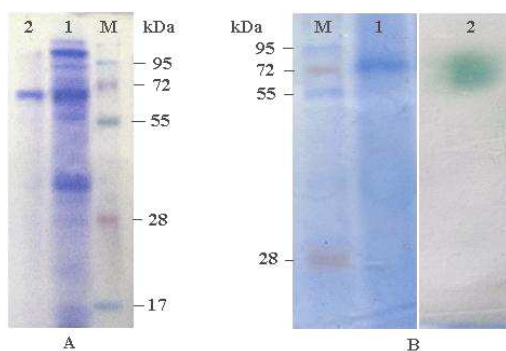
Như đã trình bày trong phần phương pháp, enzym trong canh trường nấm mốc *A. niger* D15#26 lcc1 1.8B được kết tủa phân đoạn với $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 % - 80 % bão hòa ở nhiệt độ 4 °C, hòa tan kết tủa trong 10ml đệm axetat natri 0,1M pH 5. Kết tủa sau hòa tan được đưa qua cột loại muối millipore 30kDa thu 6 ml .

Đưa dung dịch enzym sau loại muối lên cột sắc kí trao đổi ion Hitrap Q fast flow, hệ thống FPLC. Cột được cân bằng trước với đệm sodium acetate 25 mM, pH 5, tốc độ 0,5 ml/phút. Rửa cột với dung dịch đệm sodium acetate 25 mM, pH 5, với gradient NaCl 0 – 1 M, tốc độ dòng 0,5 ml/ phút, thu 2 ml/phân đoạn. Kết quả sắc kí đồ thể hiện trên hình 3.2



Hình 3.2. Sắc kí đồ tinh sạch laccase từ *A. niger* D15#26lcc1 1.8B trên cột Hitrap Q fast flow, rửa cột với đệm sodium acetate 25 mM, pH 5, gradient NaCl 0 – 1 M

Trong 7 đỉnh thu được trên sắc kí đồ, duy nhất protein thu tại đỉnh số 5 có hoạt tính enzym. Gradient NaCl 0 – 1 M dường như không hiệu quả, đỉnh protein bám cột đầu tiên (đỉnh số 5) được rửa ra ở nồng độ NaCl khoảng 1 M. Phân đoạn này có tổng hoạt độ laccase 1483 U. Kiểm tra mức độ tinh sạch của enzym trên SDS – PAGE cho thấy phân đoạn chỉ cho một băng protein duy nhất, enzym đã được làm sạch (hình 3.3).



Hình 3.3. Điện di đồ (A) SDS-PAGE và (B) PAGE (Zymogram)

A: M: Macker protein, 1: Enzym thô, 2: Enzym tinh sạch, B: M: Marker protein, 1: E tinh sạch nhuộm Coomassie brilliant blue R250; 2: E tinh sạch nhuộm ABTS 1mM

Kết quả điện di PAGE – SDS, đường số 2, hình 3.3A cho thấy xuất hiện một băng protein duy nhất có kích thước xấp xỉ 70kDa. Trên Zymogram (điện di không biến tính), đường số 2, hình 3.3 B, vùng oxy hóa cơ chất xung quanh băng protein cho thấy đây là laccase. Khối lượng phân tử của protein laccase tái tổ hợp xấp xỉ 70 kDa, cao hơn khối lượng phân tử của enzym gốc 64 kDa. Sự khác nhau về khối lượng phân tử giữa chủng tái tổ hợp và chủng gốc có thể do quá trình glycosyl hóa xảy ra trong nấm mốc. Sự khác nhau về mức độ glycosyl hóa cũng đã được báo cáo là có thể thay đổi giữa enzym tự nhiên và tái tổ hợp: mức độ tăng glycosyl hóa của laccase *P. ostreatus* biểu hiện trong *Kluyveromyces lactis* là 11,3 % cao hơn so với chủng gốc

[10], laccase từ *T. villosa* biểu hiện trong *A. oryzae* tăng 10 % [11], từ *M. thermophila* biểu hiện trong *A. oryzae* tăng 60 % [12]. Trong nghiên cứu này, mức độ thay đổi là 9,3 %, có thể do mức độ glycosyl hóa cao của enzyme. Các bước tinh sạch laccase từ *A. niger* D15#26 lcc1 1.8B được tóm tắt trong bảng 3.1.

Bảng 3.1. Các bước tinh sạch laccase từ *A. niger* D15#26lcc1 1.8B

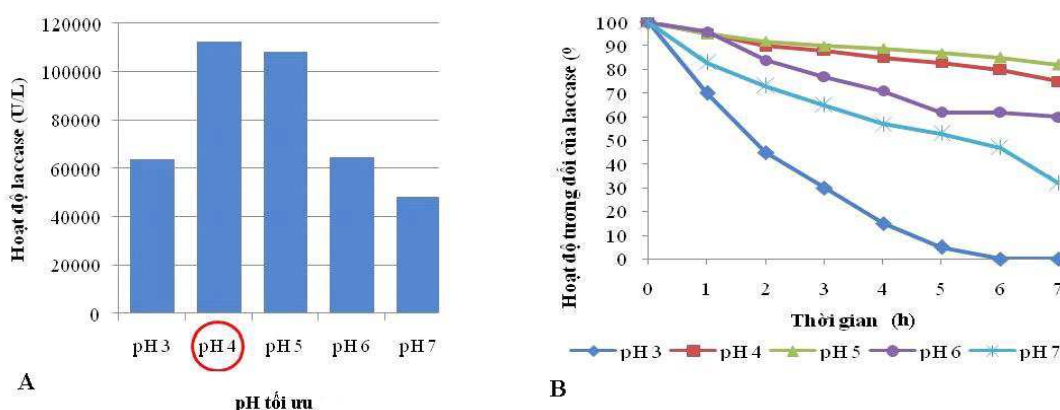
TT	Các bước tinh sạch	Tổng thể tích (ml)	Hoạt độ laccase tổng số (U)	Protein tổng số (mg)	Hoạt độ riêng (U/mg)	Hiệu suất thu hồi (%)	Mức độ tinh sạch (lần)
1	Enzym thô	650	5756	6838	0,8	100	1,00
2	Kết tủa phân đoạn 40% - 80%	6	2257	502	4,5	39	5,34
3	Hitrap Q fast flow	2	1483	42,8	34,7	26	41,19

Kết quả bảng 3.1 cho thấy laccase tái tổ hợp đã được tinh chế, hoạt độ riêng tăng từ 0,8 U/mg protein đến 34,7 U/mg protein, tăng 41,19 lần so với enzym thô. Trong nghiên cứu của Bohlin và cộng sự, laccase tái tổ hợp được tinh sạch với hiệu suất chỉ đạt 2 % và mức độ tinh sạch đạt 6,9 lần [1]. Cũng một nghiên cứu khác, việc tinh chế laccase từ *P. cinnabarinus* trong *A. niger* D15#26 chỉ đạt hiệu suất tinh sạch 16 % [13]. Khi so sánh mức độ tinh sạch của laccase tái tổ hợp từ *A. niger* D15#26lcc1 1.8B với các nghiên cứu khác cho thấy phương pháp tinh sạch qua cột Hitrap QFF đạt hiệu quả.

3.3. Khảo sát đặc tính của laccase tái tổ hợp

3.3.1. Ảnh hưởng của pH tới laccase

Laccase tinh sạch được xác định hoạt độ trong đệm sodium acetate 0,1 M (pH 4 - 5) và đệm citrate – photphat 0,1 M (pH 3, 6 và 7) ở 27 °C để xác định pH tối ưu. Kết quả chỉ ra trong hình 3.4



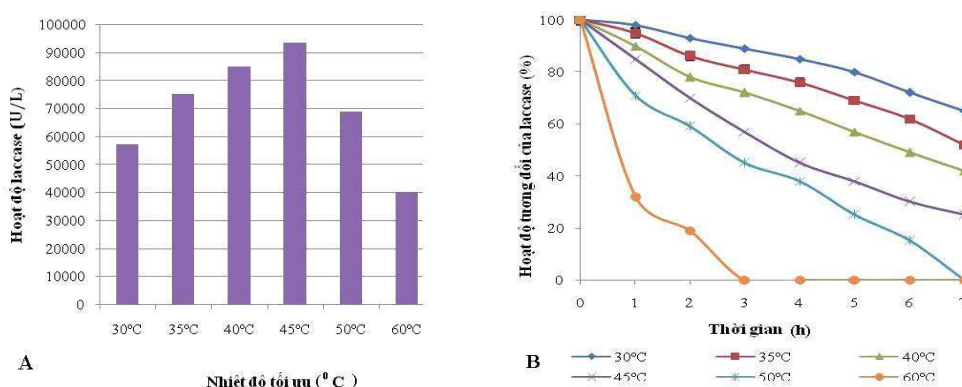
Hình 3.4. Ảnh hưởng của pH tới hoạt độ (A) và độ bền pH (B) của laccase từ *A. niger* D15#26lcc1 1.8B

Laccase từ *A. niger* D15#26lcc1 1.8B có phổ pH hoạt động từ 3 - 6, pH tối ưu của laccase tái tổ hợp là 4 (cơ chất ABTS trong đệm sodium acetate 0,1M - hình 3.4 A). Theo nghiên cứu của Han và cs, pH tối ưu từ chủng gốc *T. versicolor* là 3 [14]. Do enzyme gốc có thể chứa cả isozym laccase I và laccase II do vậy việc so sánh không thực sự chính xác. Khi so sánh pH tối ưu của laccase từ *T. versicolor* biểu hiện trong các vật chủ khác như trong nấm men *Y. lipolytica*, pH tối ưu là 3 tương tự với chủng gốc [15]. Enzym biểu hiện trong *P. methanolica* có pH tối ưu là 5 [16]. Như vậy, pH tối ưu giữa chủng tự nhiên và các chủng tái tổ hợp phụ thuộc vào các hệ thống biểu hiện.

Enzym laccase tái tổ hợp bền trong môi trường axit yếu pH 4 – 6 (hình 3.4 B), sau một giờ ủ tại các pH này hoạt độ enzym còn khoảng 95 – 96 %, sau 7h ủ, hoạt độ vẫn còn lại 60 – 75 %; tại pH 5 sau 7 giờ vẫn giữ được hơn 82 % hoạt độ. Enzym hoàn toàn không bền tại pH 3, mất hoàn toàn hoạt tính sau 6 giờ ủ tại pH này. Enzym gốc của *T. versicolor* chỉ bền ở pH 3 với đệm sodium acetate 0,1 M trong một giờ ủ [14]. Độ bền pH của enzym tái tổ hợp cao hơn so với enzym gốc. Khả năng hoạt động tốt của laccase trong môi trường axit yếu cho phép khoáng sử dụng enzym rộng, đặc biệt trong hỗ trợ quá trình thủy phân lignin của nguyên liệu lignocellulose.

3.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới enzym

Nhiệt độ hoạt động của enzym tinh sạch được kiểm tra trong dải từ 30 – 60 °C với cơ chất ABTS 1mM trong đệm sodium acetate 0,1 M tại pH 4. Độ bền nhiệt của chế phẩm được kiểm tra sau khi ủ enzym ở các nhiệt độ khác nhau từ 30 °C – 60 °C trong vòng 7 giờ, kết quả được trình bày trong hình 3.5



Hình 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt độ (A) và độ bền (B) laccase từ *A. niger* D15#26lcc1 1.8B

Nhiệt độ hoạt động của enzym nằm trong khoảng 30 °C đến 60 °C (hình 3.5 A), nhiệt độ tối ưu của laccase tái tổ hợp là 45 °C, thấp hơn so với nhiệt độ tối ưu 50 °C của enzym gốc *T. versicolor* [14]. Laccase tái tổ hợp từ *T. versicolor* có nhiệt độ tối ưu khá cao như laccase biểu hiện trong *P. methanolica* có nhiệt độ tối ưu 50 °C. Như vậy, nhiệt độ tối ưu của laccase từ *A. niger* D15#26lcc1 1.8B thấp hơn so với chủng gốc và trong các hệ biểu hiện khác.

Laccase tái tổ hợp giữ được hoạt độ sau 1 giờ ủ ở 20 °C – 50 °C, hoạt độ enzym còn 71 – 98 %, sau 7 giờ ủ ở 30 °C – 35 °C hoạt tính enzym còn lại trên 50 %, nhưng sau 1 giờ ủ ở 60 °C hoạt độ enzym chỉ còn 32 %. Nhìn chung, laccase từ nấm mốc kém bền, ở 70 °C enzym chỉ bền

trong 1 giờ và 80 °C trong 10 phút. Laccase từ *G. lucidum* bắt hoạt ngay lập tức ở 60 °C, trong khi đó laccase từ *M. albomyces* có khả năng chịu được nhiệt độ 60 °C trong 5 giờ. Theo nghiên cứu của Han và cộng sự, *T. versicolor* bền ở 50 °C sau 4 giờ ủ [17]. Như vậy, enzym tái tổ hợp không được cải thiện tính bền nhiệt, độ bền nhiệt của nó chỉ tương đương với tính chất của enzym gốc [14].

3.3.3. Hằng số động học của phản ứng enzym

Laccase I của *T. versicolor* biểu hiện trong *A. niger* D15#26lcc1 1.8B có giá trị K_m đối với ABTS khá nhỏ, đạt 1,35 μM , nhỏ hơn giá trị K_m của laccase tự nhiên và các chủng biểu hiện khác. Theo nghiên cứu của Han và cs [14] giá trị K_m của *T. versicolor* đạt 12,8 μM , K_m của *T. versicolor* biểu hiện trong nấm men *Y. lipolytica* là 50 μM [16]. Với K_m thể hiện ái lực của enzym với cơ chất (ở nồng độ cơ chất nhỏ), enzym tái tổ hợp có ái lực lớn với cơ chất ABTS, có thể đạt được tốc độ phản ứng tối đa ngay ở các nồng độ cơ chất thấp. Giá trị V_{\max} của laccase khá cao, đạt tới $53,14 \times 10^6 \mu\text{M/phút}$ lớn hơn nhiều so với V_{\max} của chủng gốc *T. versicolor* (8125,4 $\mu\text{M/phút}$) [14] và các chủng *T. versicolor* biểu hiện trong nấm men *Y. lipolytica* đạt 426 $\mu\text{M/phút}$ [16]. Giá trị K_{cat} của laccase *A. niger* D15#26lcc1 1.8B là $10,42 \times 10^6 (\text{s}^{-1})$ lớn hơn rất nhiều lần so với chủng gốc *T. versicolor* (5865 s^{-1}) [5] và so với chủng *T. versicolor* biểu hiện *P. pastoris* (5899 s^{-1}) [18]. K_{cat} cho thấy enzym nghiên cứu có khả năng xúc tác chuyển hóa cơ chất rất lớn, khoảng 10 triệu phân tử/giây. Khi so sánh hiệu quả xúc tác của laccase, giá trị K_{cat}/K_m của enzym nghiên cứu đạt tới $7,72 \times 10^6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, cao hơn nhiều so với enzym gốc và các chủng biểu hiện khác, cho thấy hiệu quả xúc tác của enzym thu nhận.

4. KẾT LUẬN

Laccase được tổng hợp từ *A. niger* D15#26lcc1 1.8B trong canh trường gián đoạn, đạt cực đại sau 7 ngày nuôi cấy tại giữa pha cân bằng của nấm mốc, tích lũy hoạt độ cực đại 4250U/L. Việc tổng hợp laccase không gắn liền với pha sinh trưởng, có thể gợi ý cho khảo sát kỹ thuật lên men bán liên tục (fed – batch) nâng cao hiệu quả lên men trong các nghiên cứu sau này. Laccase đang được tiếp tục nghiên cứu khảo sát khả năng ứng dụng trong các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bohlin C., Jonsson L. J., Roth. R. and Zyl W. H. V. - Heterologous Expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*, Applied Biochemistry and Biotechnology **06** (2006) 129-132.
2. Kiiskinen L. L., Kruus K., Bailey M., Ylosmaki E., Siika-Aho M., and Saloheimo M. - Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterisation of the purified enzyme, Microbiology **150** (2004) 3065-3074.
3. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J - Protein measurement with the Folin phenol reagent, The Journal of Biological Chemistry **193** (1951) 265-275.
4. Lê Thanh Mai, Hiền N. T. , Thủy P. T, Hằng N. T and Chi L. T. L. - Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 2009.
5. Leammli U. K. - Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature **227** (1970) 680-685.
6. Lantz, M. S and Ciborowski P. - Zymographic techniques for detection and

- characterization of microbial proteases, *Methods in Enzymology*. **235** (1994) 563-594.
7. Phạm Thị Trân Châu., Nghĩa P. T. - Công nghệ sinh học, enzym và ứng dụng, Nhà xuất bản giáo dục, 2009.
 8. Vandertol-Vanier H. A., Vazquez-Duhalt R., Tinoco R. and Pickard M. A. - Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Coriolopsis gallica* laccase, *J. Ind. microbiol. Biotechnol* **29** (2002) 214-220.
 9. Jing D., Li P., Stagnitti F and Xionga X. Optimization of laccase production from *Trametes versicolor* by solid fermentation. *Canadian Journal of microbiology* **53** (2007) 245-251.
 10. Piscitelli, A., Giardina P., Mazzoni C and G. Sannia. - Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccase in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Microbiol Biotechnol* **69** (2005) 428-439.
 11. Yaver D. S., Xu F., Golightly E. J., Brown K. M., Brown S. H., Rey M. W., Schneider P., Halkier T., Mondorf K and Dalboge H. - Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*, *Applied and Environmental of Microbiology* **62** (1996) 834-841.
 12. Berka R. M., Schneider P., Golightly E. J., Brown S. H., Madden M., Brown K. M., Halkier T., Mondorf K. and Xu F. - Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*, *Applied and Environmental of Microbiology* **63** (1997) 3151-3157.
 13. Record E., Punt P. J., Chamkha M., Labat M., Hondel C. A. M. J. J. V. D. and Asther M. - Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme, *European Journal of Biochemistry* **269** (2002) 602-609.
 14. Han M., Choi H. and Song H. - Purification and Characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*, *The Journal of Microbiology* **43** (2005) 555-560.
 15. Madzak, C., Otterbein L., Chamkha M., Moukha S., Asther M., Gaillardin C. and Beckerich J. M. - Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Yeast Res* **5** (2005) 635-646.
 16. Madzak C., Mimmi M. C., Caminade E., Brault A., Baumberger S., Briozzo P., Mougin C. and Jolivald C. - Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis, *Protein Engineering, Design and Selection* **19** (2006) 77-84.
 17. Galhaup C., Wagner H., Hinterstoisser B. and Haltrich D. - Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*, *Enzyme Microbiology Technology* **30** (2002) 529-536.
 18. Colao M. C., Lupino S., Garzillo A. M., Buonocore V. and Ruzzi M. - Heterologous expression of *lcc1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme, *Microb Cell Fact* **5** (2006) 31.

ABSTRACT

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT LACCASE FROM *ASPERGILLUS NIGER* D15#26 lcc1 1.8B

Nguyen Thi Phuong Mai², Le Quang Hoa¹, To Kim Anh¹

¹ *School of Biotechnology and Food Technology, Hanoi University of Technology,* ² *food technology faculty, Hatay Community College*

Email: tokimanh@mail.hut.edu.vn

Laccase is an interesting enzyme thanks to its wide application in the industry. Since complexity of reducers for natural enzymes, the production of recombinant laccase using simple reducers attracts scientists worldwide. Laccase from *Trametes versicolor* 06 was expressed in *A. niger* D15#26 using glucose as an ideal reducer, achieved highest activity of 4,250 U/L after 7 days of incubation at 200 rpm, pH 6. The studied enzyme was purified by fractionation with 40 % - 80 % saturated ammonium sulfate then eluted on the Hitrap Q Fast Flow with a gradient NaCl 0 – 1 M. The purification yield was of 26 % achieving a specific activity of 34.7 U/mg protein, increased 41.19 folds to the native one. The recombinant enzyme had a molecular weight of 70 kDa and optimal temperature and pH for the reaction (with ABTS) of 45°C and pH 4, respectively. The enzyme was stable at a temperature from 30 – 35 °C and pH 4 – 6, having K_m 1,35 μ M; V_{max} 53,14 $\times 10^6$ μ M/min⁻¹; K_{cat} 10,42 $\times 10^6$ s⁻¹ and K_{cat}/K_m 7,72 $\times 10^6$ μ M⁻¹s⁻¹ with ABTS showing its highly catalytic ability.

Keywords: laccase, *Trametes versicolor*, *Aspergillus niger* D15#26, ABTS, mediator.