

ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG *Aspergillus terreus* VNA 05 VÀ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP LOVASTATIN

CHU THANH BÌNH, NGUYỄN THU HOÀI

ĐẶT VẤN ĐỀ

Aspergillus terreus là nấm mốc có tới hàng trăm thành phần dưới loài với các đặc điểm sinh học đa dạng, và thuộc loại có khả năng sinh tổng hợp lovastatin giống như một số chủng vi nấm khác như *A. flavipes*, *Penicillium* sp., *Monascus ruber* [2, 3, 4, 11]. Hiện nay có nhiều công trình nghiên cứu về đặc điểm sinh học và quá trình sinh tổng hợp lovastatin của *Aspergillus terreus*. Chẳng hạn, quá trình sinh tổng hợp lovastatin từ *A. terreus* ATCC 20542 với nguyên liệu là lúa mạch đã được nghiên cứu và có điều kiện nuôi cấy là 28°C, với thời gian nuôi cấy chìm nhỏ hơn 10 ngày [4, 6]; cấu trúc hình thái, đặc điểm sinh học *A. terreus* LA 4414 và sản phẩm bậc hai của chủng cũng đã được khảo sát [8].

Hiện nay, trong Bộ sưu tập vi nấm tại Phòng thí nghiệm vi sinh, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga có chủng *A. terreus* VNA 05 có nguồn gốc phân lập trong nước. Bài báo này trình bày một số đặc điểm sinh học và khả năng sinh tổng hợp lovastatin của chủng *A. terreus* VNA 05, góp thêm thông tin về lĩnh vực nghiên cứu lên men và khả năng sinh tổng hợp lovastatin bằng chủng *A. terreus*.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi sinh vật sử dụng là *A. terreus* VNA 05 được phân lập tại Phòng Vi sinh vật - Phân viện Công nghệ sinh học.

Các môi trường được sử dụng:

- Môi trường nuôi cấy MEA (Malt Extract Agar - Merck), Czapeck - Dox và môi trường PDA (Potato Dextro Agar) sử dụng để nghiên cứu đặc điểm hình thái tế bào, cấu trúc sinh bào tử của chủng [1].

- Môi trường khoáng: KNO₃ - 2g; KH₂PO₄ - 0,3g; NaH₂PO₄ - 0,7g; NaCl - 1g; MgSO₄.7H₂O - 0,4g; NH₄Cl - 1g; nước cất - 1 lít, pH 6,8 - 7,0; bổ sung nguồn cacbon khác nhau (20 g/l): Glucoza, sacaroza, glycerol, mannoza, lactoza, và nguồn nitơ (8 g/l): Cao nấm men, bột đậu tương, nước chiết ngô, pepton để khảo sát đặc điểm sinh học của chủng VNA 05.

- Môi trường lên men số 3: Glycerol - 10g; bột đậu tương - 8g; KH₂PO₄ - 1,5g; MgSO₄.7H₂O - 0,52g; NaCl - 0,4g; nước cất - 1 lít [6].

Trong nghiên cứu đặc điểm sinh học của *A. terreus* VNA 05, chủng được nuôi cấy khảo sát với các môi trường sau: Môi trường sữa đã tách chất béo để xác định khả năng pepton hóa sữa; môi trường gelatin để xác định hoạt tính gelatinase; môi trường carboxymethyl xelluloza (CMC) để xác định hoạt tính xellulaza; môi trường casein để xác định hoạt tính protease và môi trường tinh bột để xác định khả năng sinh amylaza.

1.2. Phương pháp nghiên cứu

1.2.1. Đặc điểm hình thái của chủng VNA 05 được quan sát trên kính hiển vi điện tử Olympus BX51 và được phân loại theo khóa phân loại Raper and Fennel [10].

1.2.2. Lưu giữ và bảo quản chủng giống theo phương pháp của Viện Quốc gia về giữ giống London (National Collection Type Culture - NCTC).

1.2.3. Hoạt hóa chủng giống theo phương pháp của Viện giữ giống Hoa Kỳ (American Type Culture Collection Washington - ATCC), Viện sưu tầm giống - NRRL Collection - ARS Culture Collection.

1.2.4. Định tính lovastatin bằng phương pháp sắc ký bản mỏng (Boris Lisec, Ivan Radez & cs., 2012) [5]. Dịch lên men được thu nhận qua màng lọc Milipore 0,45 μm .

1.2.5. Quá trình lên men lovastatin từ chủng *A. terreus* VNA 05 trong môi trường số 3 (g/l). Điều kiện lên men với pH = 6,5; tốc độ lắc 250 vòng/phút, nhiệt độ 30°C và thời gian 120 h.

1.2.6. Sắc ký bản mỏng (Boris Lisec, Ivan Radez & cs., 2012) [5]. Rửa dịch lên men nhiều lần bằng nước cất vô trùng, đưa qua màng lọc Milipore 0,45 μm . Lovastatin được định tính bằng phương pháp sắc ký bản mỏng.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

2.1. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp lovastatin của chủng VNA 05

Nuôi cấy *A. terreus* VNA 05 trên môi trường nuôi cấy số 3, trong thời gian 8 ngày ở nhiệt độ 30°C. Dịch lên men được chiết bằng dung môi etylaxetat với tỷ lệ 1:1 theo thể tích. Kết quả được kiểm tra bằng phương pháp sắc ký bản mỏng và được biểu thị ở hình 1.



M: Lovastatin chuẩn;

Lo: Dịch chiết lên men *A. terreus* VNA 05

Hình 1. Sắc ký bản mỏng của dịch lên men và lovastatin chuẩn

Hình 1 cho thấy, phổ của mẫu (ký hiệu Lo) có vị trí tương đương với phổ lovastatin chuẩn (ký hiệu M). Như vậy, sản phẩm lên men chính của *A. terreus* VNA 05 là lovastatin.

2.2. Đặc điểm hình thái của chủng VNA 05

Đặc điểm cấu trúc sinh bào tử và hình thái khuẩn lạc *A. terreus* VNA 05 được thể hiện trên hình 2.



a



b

a. Cấu trúc sinh bào tử của *A. terreus* VNA 05 trên kính hiển vi điện tử BX51, 400X

b. Hình thái khuẩn lạc trên môi trường MEA

Hình 2. Đặc điểm cấu trúc sinh bào tử và hình thái khuẩn lạc *A. terreus* VNA 05

Có thể thấy, cuống sinh bào tử có kích thước 100 - 250 μm , sợi nấm mọc thẳng, bào tử có màu nâu nhạt, có hình trứng kích thước 6 - 8 μm . Trên môi trường MEA ở nhiệt độ 24 - 26°C, khuẩn lạc có đường kính 3 - 3,5 cm, ban đầu có màu vàng chanh, dần dần chuyển sang màu nâu nhạt, màu nâu sẫm.

2.3. Đặc điểm sinh lý, sinh hoá chủng *A. terreus* VNA 05

* Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH đến khả năng phát triển của chủng *A. terreus* VNA 05

Kết quả khảo sát đặc điểm sinh lý và sinh hóa của *A. terreus* VNA 05 được nuôi trên môi trường Czapeck - Dox ở các điều kiện pH và nhiệt độ khác nhau được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến khả năng sinh trưởng của *A. terreus* VNA 05

Nhiệt độ	Khả năng Sinh trưởng	pH	Khả năng Sinh trưởng
15	±	4,0	±
20	+	5,0	±
25	++	5,5	+
30	++	6,0	+
35	+	6,5	++
40	±	7,0	+
45	-	7,5	+
50	-		

++ : Sinh trưởng tốt; + : Sinh trưởng bình thường;

± : Sinh trưởng kém; - : Không sinh trưởng.

Có thể thấy, *A. terreus* VNA 05 có thể sinh trưởng trong dải nhiệt độ từ 25 - 45°C và kém phát triển với nhiệt độ 45°C trở lên. Ngoài ra, *A. terreus* VNA 05 sinh trưởng được trong khoảng pH từ 5,5 - 7,5 và tốt nhất ở pH = 6,5. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu chủng *A. terreus* LA4414 của Zhijia Jia và *A. terreus* ATCC 20542 của Bizukojc [4, 8].

** Khả năng sử dụng nguồn cacbon và nitơ của A. terreus VNA 05*

Để nghiên cứu khả năng đồng hóa các nguồn cacbon và nitơ khác nhau, *A. terreus* VNA 05 được nuôi trong môi trường khoáng có bổ sung các nguồn cacbon và nitơ (bảng 2).

Bảng 2. Khả năng sử dụng một số nguồn cacbon và nitơ của *A. terreus* VNA 05

Khả năng sử dụng nguồn cacbon	
<i>Nguồn cac bon</i>	<i>Sinh trưởng</i>
Glucosa	++
Lactosa	+
Sacaroza	++
Glycerol	++
Manoza	±
Khả năng sử dụng nguồn nitơ	
<i>Nguồn nitơ</i>	<i>Sinh trưởng</i>
Cao nấm men	++
Bột đậu tương	++
Nước chiết ngô (corn steep liquor)	+
Pepton	++

++ : Sinh trưởng tốt; + : Sinh trưởng bình thường; ± : Sinh trưởng kém

Có thể thấy *A. terreus* VNA 05 có khả năng sử dụng hầu hết các nguồn đường thông dụng để tăng sinh. Với đường manozơ, *A. terreus* VNA 05 tăng sinh kém nhất, còn glucosa, sacaroza, glycerol là những nguồn cacbon giúp *A. terreus* VNA 05 đồng hóa tốt nhất, và đây là những nguồn cacbon rất sẵn.

Việc khảo sát khả năng sử dụng các nguồn nitơ khác nhau cho thấy *A. terreus* VNA 05 sinh trưởng tốt trên môi trường với nguồn nitơ là cao nấm men, bột đậu tương, pepton. Nhằm lựa chọn những nguồn nguyên liệu sẵn có và rẻ tiền tại chỗ, trong nghiên cứu tiếp theo chúng tôi lựa chọn glycerol và bột đậu tương làm nguồn cacbon và nitơ cho quá trình sinh tổng hợp lovastatin từ *A. terreus* VNA 05. Đây là giải pháp hợp lý trong triển khai tổng hợp lovastatin từ những nguồn nguyên liệu phổ biến bằng con đường sinh học. Bizukoje, J. L Casas Lopez và cs. cũng lựa chọn glycerol cho quá trình sinh tổng hợp lovastatin [4, 6].

** Các đặc điểm sinh học khác của A. terreus VNA 05*

Trong các nghiên cứu về đặc điểm sinh học tiếp theo, có thể thấy *A. terreus* VNA 05 có khả năng sinh một số enzym ngoại bào thủy phân cơ chất nghiên cứu (bảng 3).

Bảng 3. Một số đặc điểm sinh học của *A. terreus* VNA 05

Đặc điểm sinh học	Khả năng
Sinh bào tử	++
Phân giải casein	++
Phân giải CMC	++
Thủy phân tinh bột	++
Pepton hóa sữa	++
Phân giải gelatin	++
Nhiệt độ tối ưu	30°C ± 2
pH tối ưu	6,5

++ : Sinh trưởng tốt

Đây là điều rất thuận lợi cho việc lựa chọn thành phần môi trường lên men và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men sau này. Các kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu của Zhilua Jia, Lai, Liu G., Xu Z. và cs. [8, 9].

Theo một số tác giả Bizukoje và cs., 2007; Barrios - Gonzalez., J Miranda 2010 [3, 4, ...] sinh tổng hợp lovastatin phụ thuộc rất nhiều vào chủng giống, các yếu tố lên men như pH, nhiệt độ, tỷ lệ C:N. Những kết quả nghiên cứu thu được về đặc điểm sinh học *A. terreus* VNA 05 đã góp phần rút ngắn thời gian nghiên cứu thành phần môi trường và điều kiện lên men, đồng thời theo dõi được mức độ ổn định của *A. terreus* VNA 05 trong quá trình nuôi cấy, giữ hoạt tính và tránh tạp nhiễm. Trong khuôn khổ bài báo này, tính ổn định chủng giống đã được bảo đảm, 6 tháng một lần được kiểm tra lại hoạt tính, hoạt hóa, lựa chọn, cấy chuyển và sử dụng phương pháp đông khô.

IV. KẾT LUẬN

1. Chủng *A. terreus* VNA 05 có khả năng sinh tổng hợp lovastatin.
2. Chủng *A. terreus* VNA 05 phát triển tốt ở pH từ 5-7,5; nhiệt độ 28°C - 30°C, sử dụng tốt các nguồn cacbon (glucoza, sacaroza, glycerol, mannoza, lactoza) và các nguồn nitơ thông dụng (cao nấm men, bột đậu tương, nước chiết ngô, pepton).
3. Chủng *A. terreus* VNA 05 có khả năng sinh các enzym thủy phân tinh bột, casein, gelatin, xelluloza. Đây là điều kiện thuận lợi cho việc lựa chọn nguồn dinh dưỡng khi lên men sản xuất lovastatin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng dịch, EGOROV, *Thực tập vi sinh vật học*, NXB Giáo dục, 1995.
2. Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan G, Currie S, Stapley E, Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol-lowering agent, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 3957-3961.
3. Barrios-Gonzalez J, Miranda RU, *Biotechnological production and applications of statins*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85: 869-883.
4. Bizukoje M., Pecyna M., *Lovastatin and geodin formation by Aspergillus terreus ATCC 20542 in a batch culture with the simultaneous use of lactose and glycerol as carbon sources*, *Eng. Life Sci.*, 2011, 11: 272-282.
5. Boris Lisec, Ivan Radez, Ljudmila Fele Zilnik, *Solvent extraction of lovastatin from a fermentation broth*, *Separation and Purification Technology*, 2012, 96: 187-193.
6. Casas Lopez J.A., Sanchez Perez J.M., Fernandez Sevilla F.G., Acien Fernandez E., Molina Grima Y., Chisti, *Production of lovastatin by Aspergillus terreus: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production*, *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33:270-273.
7. *Drug Invention Today*, 2011, 3(6): 75-77.
8. Zhihua Jia, Long-Shan T. Lai, Tai-Her Tsai, Te Chi Wang, Tsung-Yao Cheng, *The influence of culturing environments on lovastatin production by Aspergillus terreus in submerged cultures*, *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36: 737-748.
9. Liu G., Xu Z., Cen P., *A morphologically structured model for mycelial growth and secondary metabolite formation*, *Chin. J Chem. Eng.*, 2000, 8:46-51.
10. Raper and Fennel, *Compendium of soil fungi*, Institute of Soil Biology Federal Agricultural Research Centre Braunschweig of Germany, 1980.
11. Valera J., Gomes S., Lakshmi R., Gururaja, *Lovastatin production by solid state fermentation using Aspergillus flavipes*, *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37: 521-526.

SUMMARY

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE STRAIN *Aspergillus terreus* VNA 05 AND THEIR LOVASTATIN BIOSYNTHESIS CAPABILITY

This paper presents some biological features and lovastatin biosynthesis capability of strain *A. terreus* VNA 05. It is found that the strain is capable of lovastatin biosynthesis and develops well in pH from 5 to 7.5 and at temperature 28°C - 30°C. The strain consumes some commonly used carbon sources (glucose, saccharose, glycerol, mannose, lactose) and nitrogen sources (yeast extract, soybean powder, corn extracted water, peptone). *A. terreus* VNA 05 also yields enzyme activities hydrolyzing starch, casein, gelatin, xelluloza, which are favorable conditions for selecting nutrients during lovastatin fermentation.

Từ khoá: Aspergillus terreus VNA 05, lovastatin, biological characterization.

Nhận bài ngày 05 tháng 11 năm 2013

Hoàn thiện ngày 26 tháng 12 năm 2013

Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga