

**MỘT SỐ YẾU TỐ CÓ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP  $\gamma$ -  
Decalactone CỦA CHỦNG NẤM MEN *Yarrowia lipolytica* W29**  
**Several factors affecting biosynthesis of gamma- decalactone by yeast strain  
*Yarrowia lipolytica* W29**

Lại Thị Ngọc Hà<sup>1</sup>

SUMMARY

A study was undertaken to determine factors affecting biosynthesis of gamma-decalactone by yeast strain *Yarrowia lipolytica* W29. It was shown that *Yarrowia lipolytica* W29 best produced gamma-decalactone under the following conditions: concentration of ricin oil 2g/200ml, culture pH of 7, and agitation speed of 200 rounds/minute. The pH value had a strong effect on the lipid droplet size but, the agitation time did not have any influence. It was possible that *Yarrowia lipolytica* W29 produced a surfactant responsible for the small size of ricin oil droplet. *Yarrowia lipolytica* W29 consumed gamma-decalactone at a maximum rate at the 12<sup>th</sup> hour of its biosynthesis.

**Keywords:** *Yarrowia lipolytica*, gamma-decalactone, ricin oil.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hương là một trong những cấu tử của sản phẩm thực phẩm, tạo nên giá trị cảm quan cho thực phẩm. Trong đa số trường hợp, hương đem lại cho người sử dụng thực phẩm cảm giác ngon miệng. Hương trong sản phẩm thực phẩm có thể có sẵn từ nguyên liệu ban đầu, có thể được hình thành trong quá trình chế biến hoặc được thêm vào thực phẩm như chất phụ gia với mục đích tăng giá trị cảm quan của thực phẩm.

Hiện nay, ngành công nghiệp chế biến thực phẩm có nhu cầu rất lớn về các chất phụ gia tạo hương. Trong các quá trình chế biến thực phẩm, cấu tử hương của nguyên liệu ban đầu thường xuyên bị mất đi với lượng ít hoặc nhiều bắt buộc các nhà công nghệ phải nghĩ tới phương án thêm chất phụ gia. Mặt khác các sản phẩm thực phẩm pha chế (nước ngọt,

rượu mùi, sữa chua ...) luôn cần sự có mặt của các chất tạo hương.

Ngoài ngành công nghiệp thực phẩm ra, công nghiệp dược cũng là ngành có nhu cầu sử dụng các chất phụ gia tạo hương lớn. Việc thêm các chất tạo hương vào thuốc, đặc biệt là các loại thuốc cho trẻ em làm mất đi hương vị khó chịu của thuốc và làm cho thuốc dễ uống hơn.

Trong số các cấu tử tạo hương (aldehyd, ester, lactone ...), lactone là hợp chất khá phổ biến. Lactone là cấu tử tạo hương chính của nhiều loại quả như đào, dứa... và của rất nhiều sản phẩm thực phẩm như các sản phẩm chế biến từ thịt, các sản phẩm sữa, các loại caramen...

Lactone có thể được tách chiết từ các nguyên liệu thực vật nhưng nguồn lactone dồi dào nhất là nguồn lactone từ vi sinh vật (Albretch &cs, 1992; Belin & cs,1992; Gatfiel &cs, 1993; Haffner & cs, 1996; Labows & cs,

<sup>1</sup> Bộ môn Hoá sinh, Khoa Công nghệ thực phẩm  
222

## MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ...

1983; Shimizu &cs, 1992). Trong phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến sinh tổng hợp  $\gamma$ -decalatone, một lactone có mùi đào bởi chủng nấm men *Yarrowia lipolytica* W29.

### 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu

Chủng vi sinh vật sử dụng là nấm men hoang dại *Yarrowia lipolytica* W29 được phân lập từ nước thải

Môi trường giữ giống: môi trường malt: 50 g chiết malt cho 1l

Môi trường tăng trưởng gồm các thành phần sau (g/l):

Glucose: 15

$\text{NH}_4\text{Cl}$  : 2,5

Chiết nấm men: 0,1

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 2,1

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 6,79

$\text{MgSO}_4$ : 0,1

$\text{NaCl}$ : 0,1

$\text{FeSO}_4$ :  $0,914 \cdot 10^{-2}$

$\text{ZnCl}_2$ :  $0,05 \cdot 10^{-2}$

$\text{CuSO}_4$ :  $0,156 \cdot 10^{-2}$

Môi trường sinh tổng hợp  $\gamma$ -decalactone (cho 200ml)

$\text{NH}_4\text{Cl}$  : 0,5 g

Dầu thầu dầu

Tween 80: 0,2 g

YNB (yeast nitrogen base) 13,4 g/l: 10 ml

Môi trường xác định vận tốc tiêu thụ  $\gamma$ -decalactone: nước muối sinh lý chứa 100 mg  $\gamma$ -decalactone/l.

Các môi trường sinh tổng hợp có pH khác

nhau để nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến kích thước hạt lipit.

Môi trường sinh tổng hợp có bổ sung  $\gamma$ -decalatone để nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ  $\gamma$ -decalactone đến kích thước hạt lipit.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Xác định hàm lượng  $\gamma$ -decalactone bằng phương pháp sắc ký khí (chromatograph gaz).

Xác định đường kính trung bình và diện tích tiếp xúc riêng của hạt lipit bằng máy đo kích thước hạt bằng tia laser S2-01 của Malvern Instrument (Anh).

Các thí nghiệm được lặp lại ba lần. Kết quả đưa ra là trung bình cộng của ba lần đo. Sai số 1%.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến lượng $\gamma$ -decalactone tổng hợp được

##### *Ảnh hưởng của nồng độ dầu thầu dầu*

Trong sinh tổng hợp, dầu thầu dầu được sử dụng làm nguồn cacbon. Acid ricinoleic, thành phần chủ yếu của dầu thầu dầu đóng vai trò vừa là nguồn cacbon vừa là cơ chất cảm ứng cho sinh tổng hợp  $\gamma$ -decalactone.

Chúng tôi đã tiến hành nuôi *Yarrowia lipolytica* W29 trong môi trường có acid ricinoleic như nguồn cacbon duy nhất, kết quả được trình bày ở bảng 1.

Khi hàm lượng dầu thầu dầu tăng từ 1,0 đến 2,0 g/200ml, lượng  $\gamma$ -decalactone thu được tăng dần. Lượng acid béo trong dung dịch tăng đã làm tăng số lượng các hạt lipit được tiếp xúc với tế bào nấm men và được chuyển hoá thành  $\gamma$ -decalactone. Thêm vào đó, sự có mặt của các acid béo khác trong dầu

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ dầu thầu dầu đến sinh tổng hợp  $\gamma$ -decalactone

Nồng độ dầu thầu dầu (g/200ml)	1,0	1,5	2,0	2,5	5,0
Nồng độ $\gamma$ -decalactone (mg/l)	250	297	350	344	295

thần dầu đóng vai trò là chất đồng oxy hoá và có tác dụng cảm ứng hệ enzyme. Tuy nhiên, khi hàm lượng acid béo quá cao, các hạt lipit nhỏ bao kín các tế bào nấm men, làm giảm khả năng tiếp xúc của tế bào nấm men với oxy hoà tan trong dung dịch, do đó kìm hãm sự phát triển của nấm men. Kết quả thu được cho thấy hàm lượng dầu thầu dầu thích hợp cho sinh tổng hợp  $\gamma$ -decalactone là 2g/200ml.

#### Ảnh hưởng của pH môi trường

Tiến hành nuôi *Yarrowia lipolytica* W29 trong môi trường chứa dầu thầu dầu với nồng độ 2g/200ml, ở các pH khác nhau: 3; 5,8 và 7. Kết quả được chỉ ra ở đồ thị 1.

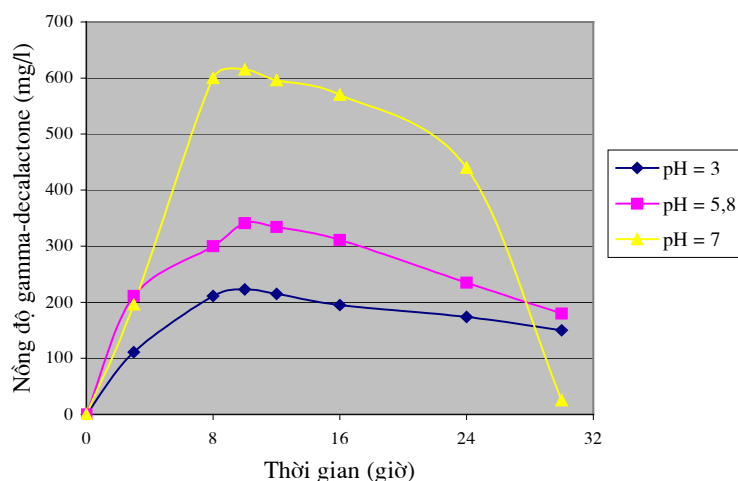
Kết quả cho thấy, pH có ảnh hưởng lớn đến sinh tổng hợp  $\gamma$ -decalactone từ dầu thầu dầu. Ở pH = 3, sinh tổng hợp là kém nhất. Ở pH = 7, sinh tổng hợp  $\gamma$ -decalactone là mạnh nhất, đạt 615 mg/l vào giờ thứ 10. Có thể ở pH = 7,

sự tạo thành các hạt lipit trong môi trường thuận lợi nhất cho sự tiếp xúc giữa tế bào nấm men và cơ chất hoặc tại pH này, tế bào nấm men sản sinh ra một chất nhũ tương hoá giúp lipit hoà tan tốt trong canh trường. Điều này được xem xét kỹ hơn trong phần nghiên cứu về ảnh hưởng của pH đến kích thước các hạt lipit.

#### Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Tiến hành nuôi *Yarrowia lipolytica* W29 trong môi trường chứa dầu thầu dầu với nồng độ 2g/200ml và pH =7 với tốc độ lắc khác nhau. Kết quả được trình bày ở bảng 2. Kết quả cho thấy, tốc độ lắc phù hợp nhất cho sinh tổng hợp  $\gamma$ -decalactone là 200 vòng/phút. Ở tốc độ lắc này, hàm lượng  $\gamma$ -decalactone đạt được là 621 mg/ lit sau 10 giờ nuôi.

#### 3.2. Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến khả năng sinh tổng hợp $\gamma$ -decalactone



Đồ thị 1. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh tổng hợp  $\gamma$ -decalactone

Bảng 2. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh tổng hợp  $\gamma$ -decalactone

Tốc độ lắc (vòng/phút)	100	150	200	250	300
Nồng độ $\gamma$ -decalactone (mg/l)	450	547	621	544	495

MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ...

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH môi trường đến kích thước hạt lipit

pH môi trường	Đường kính hạt lipit ( $\mu\text{m}$ )		Diện tích tiếp xúc riêng ( $\text{m}^2.\text{ml}^{-1}$ )	
	Không nấm men	Có nấm men	Không nấm men	Có nấm men
3	2,34	1,99	3,06	2,61
5,8	2,37	1,67	4,06	2,60
7	2,17	1,64	3,75	2,82
8	2,20	2,03	3,31	2,77

Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến kích thước hạt lipit

Trong quá trình chuyển hoá acid ricinoleic trong dầu thầu dầu thành  $\gamma$ -decalactone, *Yarrowia lipolytica* W29 sinh trưởng, phát triển và thực hiện chuyển hoá cơ chất trong môi trường hai pha. Nấm men sinh trưởng và phát triển trong pha ưa nước, thực hiện chuyển hoá cơ chất trong pha ưa béo. Sự chuyển cơ chất vào tế bào nấm men được thực hiện nhờ sự tiếp xúc trực tiếp giữa các hạt lipit và thành tế bào nấm men. Chính vì vậy, hiệu quả của sự chuyển hoá phụ thuộc chặt chẽ vào kích thước hạt lipit. Hạt lipit càng nhỏ, diện tích tiếp xúc giữa lipit và thành tế bào nấm men càng lớn, sự xâm nhập của lipit - cơ chất vào tế bào nấm men càng dễ dàng. Nhờ vậy, hiệu quả chuyển hoá càng cao. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố cơ bản đến kích thước hạt lipit.

Ảnh hưởng của pH môi trường

pH môi trường ảnh hưởng trực tiếp đến tính háo nước và kỵ nước của thành tế bào nấm men từ đó ảnh hưởng đến sự hấp thụ lipit của tế bào. Mặt khác, theo nhiều nghiên cứu, *Yarrowia lipolytica* W29 có khả năng tiết ra một chất có nhũ hoá (Pagot, 1997; Waché &cs, 1998), pH của môi trường có thể ảnh hưởng đến khả năng trên của nấm men.

Chúng tôi đã tiến hành đo kích thước hạt lipit trong các môi trường có pH khác nhau,

trong trường hợp có mặt và không có mặt tế bào nấm men, kết quả được chỉ ra ở bảng 3.

Trong môi trường không có tế bào nấm men, pH không ảnh hưởng đến kích thước hạt lipit (kích thước hạt lipit xấp xỉ  $2 \mu\text{m}$  ở các pH khác nhau). Trường hợp có tế bào nấm men trong môi trường, khi pH thay đổi, kích thước hạt lipit thay đổi theo. Kích thước hạt lipit là nhỏ nhất ( $1,64 \mu\text{m}$ ) khi pH = 7. Điều này củng cố thêm giả thiết *Yarrowia lipolytica* W29 có tiết ra chất nhũ tương hoá, làm tăng khả năng phân tán chất béo vào môi trường dinh dưỡng. Với kích thước hạt lipit là nhỏ nhất, diện tích tiếp xúc riêng của hạt lipit lớn nhất tạo điều kiện cho sự tiếp xúc giữa hạt lipit và tế bào nấm men, sự xâm nhập của chất béo, cơ chất cảm ứng vào tế bào nấm men. Do vậy, ở pH = 7, khả năng tổng hợp  $\gamma$ -decalactone là lớn nhất (xem kết quả phần trước).

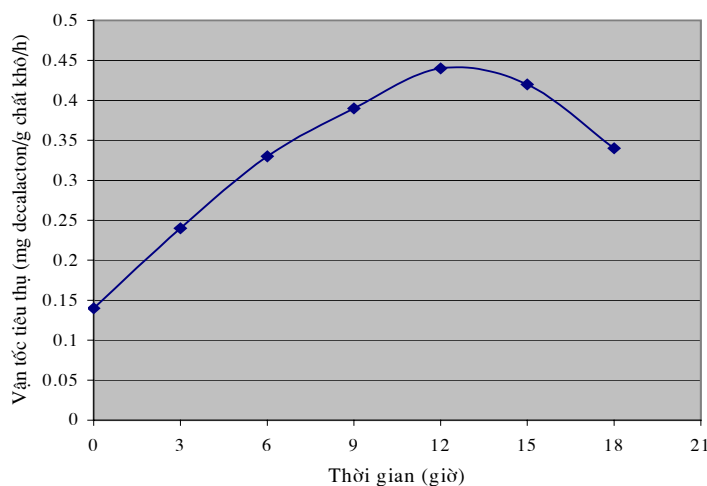
Ảnh hưởng của thời gian lactic đến kích thước hạt lipit

Tiến hành nuôi *Yarrowia lipolytica* W29 ở pH = 7, tốc độ lactic 200 vòng/phút và đo kích thước hạt lipit tại các thời điểm khác nhau. Kết quả được chỉ ra ở bảng 4.

Trong trường hợp không có tế bào nấm men, thời gian lactic càng dài, diện tích tiếp xúc riêng của lipit càng lớn.

Khi có mặt tế bào nấm men trong môi trường, diện tích tiếp xúc riêng của lipit tương đối ổn định, không phụ thuộc vào thời gian

Lại Thị Ngọc Hà



Đồ thị 2. Vận tốc tiêu thụ  $\gamma$ -decalactone của *Yarrowia lipolytica* W29

lắc. Điều này khẳng định giả thiết *Yarrowia lipolytica* W29 có tiết ra một chất nhũ hoá, làm ổn định trạng thái nhũ tương của môi trường. Bản chất và đặc điểm của chất nhũ hoá cần được xác định nhằm tối ưu hoá quá trình tổng hợp  $\gamma$ -decalactone từ dầu thầu dầu.

*Vận tốc tiêu thụ  $\gamma$ -decalactone của Yarrowia lipolytica W29 trong quá trình sinh tổng hợp chất này*

*Yarrowia lipolytica* W29 có khả năng tổng hợp  $\gamma$ -decalactone và cũng có khả năng sử dụng chất này như nguồn cacbon. Sự tiêu thụ  $\gamma$ -decalactone bắt đầu ngay từ đầu quá trình sinh tổng hợp và kéo dài trong suốt quá trình sinh tổng hợp. Chúng tôi tiến hành xác định tốc độ tiêu thụ  $\gamma$ -decalactone của *Yarrowia lipolytica* W29 tại các thời điểm khác nhau

nhằm mục đích giảm thậm chí loại bỏ hoàn toàn sự tiêu thụ  $\gamma$ -decalactone. Tốc độ tiêu thụ  $\gamma$ -decalactone ở những thời điểm khác nhau được biểu diễn ở đồ thị 2.

Đồ thị 2 cho thấy *Yarrowia lipolytica* W29 tiêu thụ  $\gamma$ -decalactone ngay thời điểm đầu của quá trình sinh tổng hợp. Lượng  $\gamma$ -decalactone đo được trong canh trường chính là sự chênh lệch của hai quá trình tổng hợp và tiêu thụ  $\gamma$ -decalactone. Tốc độ tiêu thụ  $\gamma$ -decalactone bởi *Yarrowia lipolytica* W29 tăng từ giờ đầu đến giờ thứ 12, đạt cực đại ở giờ thứ 12 (0,44 mg  $\gamma$ -decalactone/g chất khô nấm men/h) sau đó giảm dần. Sự tăng vận tốc tiêu thụ  $\gamma$ -decalactone trong giai đoạn đầu của quá trình sinh tổng hợp do sự thích nghi dần với  $\gamma$ -decalactone tạo thành của nấm men và lượng

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian lắc đến kích thước hạt lipit

Thời gian lắc (giờ)	Diện tích tiếp xúc riêng ( $\text{m}^2.\text{ml}^{-1}$ )	
	Không nấm men	Có nấm men
60	1,80	1,25
180	2,53	2,04
360	4,57	2,23
480	5,30	2,44
560	5,44	2,40

## MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ...

$\gamma$ -decalactone tạo thành cảm ứng hệ enzyme tiêu thụ  $\gamma$ -decalactone trong tế bào nấm men. Cần xác định các yếu tố ảnh hưởng đến tốc độ tiêu thụ  $\gamma$ -decalactone của nấm men để từ đó có những thay đổi một số điều kiện nhằm giảm tối đa vận tốc tiêu thụ sản phẩm của nấm men, từ đó thu được lượng  $\gamma$ -decalactone cao.

### 4. KẾT LUẬN

Điều kiện thích hợp cho sinh tổng hợp  $\gamma$ -decalactone bởi *Yarrowia lipolytica* W29: nồng độ dầu thầu dầu 2 g/ 200ml; pH canh trường 7; tốc độ lắc 200 vòng/phút. Ở điều kiện này nồng độ  $\gamma$ -decalactone đạt được là 621 mg/l.

Trong điều kiện không có nấm men, pH môi trường không ảnh hưởng đến kích thước hạt lipid trong khi thời gian lắc ảnh hưởng mạnh đến kích thước hạt. Và ngược lại, trong điều kiện có nấm men, ở pH bằng 7, kích thước hạt lipid nhỏ nhất.

*Yarrowia lipolytica* W29 có thể tiết ra chất nhũ hoá làm ổn định trạng thái nhũ tương của canh trường.

Vận tốc tiêu thụ  $\gamma$ -decalactone của nấm men nghiên cứu đạt cực đại ở giờ thứ 12 của quá trình sinh tổng hợp.

### Tài liệu tham khảo

Albrecht W., Schawarz M., Heidlas J., Tressl R., 1992, "Studies on the biosynthesis of aliphatic lactones in *Sporobolomyces odoros*. Conversion of (S)- and (R, S)- 13-hydroxy- (Z, E)-9, 11 octadecadienoic acid into optically pure  $\delta$ -decalactone", *Org. Chem.*, 57, pp: 1954-1956.

Belin J. M., Bensoussan M. et Serrano-Carreón L. (1992), "Microbial biosynthesis for the production of food flavors", *Trends Food Sci*, 3, pp 11.

Gatfiel I. L., Guntert M., Sommer H., Werkhoff P. (1993), "Some aspects of the microbiological production of the flavor-active lactones with the particular reference to  $\gamma$ -decalactone" , *Chem. Mikrobiol. Technol.*, 15, Lebenson, pp: 165-170.

Haffner T. and Tressel R., 1996, "Biosynthesis of (R)- $\gamma$ -decalactone in the yeast *Sporobolomyces odorus* ", *Agric. Food Chem.*, 44, pp: 1218-1223.

Labows J. N., Horsman J., Webster G., Hill L. and Mac Ginley K. (1983), "Production of  $\gamma$ -lactone rich flavor additives by *Pityrosporum* species cultured on lipid rich substrates", *US Patent 4.396.715*.

Pagot Y., 1997, "Etudes des mécanismes cellulaires et moléculaires de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale chez les levures. Effet sur la biotransformation du ricinoléate de méthyle en  $\gamma$ -decalactone", Luận án tiến sỹ, Trường đại học Bourgogne. Ratledge C. and Evans C.

Shimizu S., Kataoka M., Shimizu K., Hirakata M., Sakamoto M., Yamada H., 1992, "Purification and characterization of novel lactonohydrolase, catalysing the hydrolysis of aldonolactones and aromatic lactones from *Fusarium oxysporum*", *Eur. J. Biochem.*, 209, pp: 383-390.

Waché Y., Courthaudon J.L, Aguedo M., Belin J.J.M., 1998, "Cell-surface-active properties are responsible for the small size of the methyl ricinoleate droplets in the  $\gamma$ -decalactone product by *Yarrowia lipolytica* W29". Personal contact.