

# NẤM MEN YARROWIA LIPOLYTICA VÀ CÁC ỨNG DỤNG TRONG LĨNH VỰC CÔNG NGHỆ SINH HỌC CHẤT BÉO

Trần Hải Đăng

Trường Đại học Nha Trang

*Yarrowia lipolytica* là nấm men được nghiên cứu nhiều nhất trong nhóm phi truyền thống. Đây là loài nấm men có khả năng sử dụng chất béo để sinh trưởng và sản sinh các hợp chất có giá trị như các axit hữu cơ, chất nhũ hóa, enzyme, chất thơm, lipid đơn bào, protein đơn bào... Bên cạnh đó, *Y. lipolytica* hiện nay được xem như là công cụ nổi trội trong nghiên cứu xử lý và nâng cao giá trị cho các loại phế thải công nghiệp có hàm lượng lipid cao như nước thải nhà máy sản xuất dầu oliu, dầu cọ hay phế thải từ sản xuất, chế biến cá... Bài báo giới thiệu một số ứng dụng điển hình của *Y. lipolytica* trong công nghệ sinh học chất béo.

Nấm men là nhóm vi sinh vật đã được biết đến từ lâu và hiện nay có rất nhiều ứng dụng. Ngoài loài nấm men điển hình *Saccharomyces cerevisiae*, hiện nhóm nấm men phi truyền thống (như *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans* hay *Y. lipolytica*) cũng thu hút được nhiều sự chú ý của giới khoa học, từ những ứng dụng đặc thù cho tới nguy cơ gây bệnh của chúng. Trong số những nấm men phi truyền thống, *Y. lipolytica* được nghiên cứu nhiều nhất, do loài này có sự khác biệt rất lớn so với những loài nấm men truyền thống (*Saccharomyces cerevisiae* hay *Schizosaccharomyces pombe*) trên các khía cạnh về sự hình thành phát sinh loài, về mặt sinh lý học và sinh học phân tử. Mặc dù có những khác biệt như vậy, *Y. lipolytica* vẫn nổi lên với tư cách là hình mẫu nghiên cứu quan trọng với các ứng dụng đa dạng trong nhiều lĩnh vực nhờ vào khả năng sử dụng chất béo làm nguồn carbon duy nhất. Tế bào của loài nấm men này có khả năng tổng hợp chất thơm (các hợp chất lactone, hexanal...), các enzyme (protease, lipase, esterase, phosphatase), các protein đơn bào và nhất là các lipid đơn bào. Loài nấm men này cũng được sử dụng để xử lý môi trường, chẳng hạn như trong xử lý ô nhiễm cho nguồn nước thải của nhà máy sản xuất dầu oliu hay để xử lý đất ô nhiễm dầu. Không những thế, *Y. lipolytica* còn được Cơ quan Quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (FDA) chấp nhận xếp vào nhóm các chất an toàn (GRAS), tạo điều kiện cho việc ứng dụng nấm men này trong lĩnh vực thực phẩm. Phần đầu của bài viết sẽ giới thiệu ngắn gọn về các khía cạnh sinh lý học và sinh học của nấm men *Y. lipolytica*. Phần tiếp theo sẽ trình bày một số ứng dụng và sản phẩm thu được trong công nghệ sinh học chất béo sử dụng một số chủng nấm men *Y. lipolytica*.

## *Y. lipolytica* - Loài nấm men phi truyền thống

*Y. lipolytica* là một loài nấm túi (ascomycete) thuộc họ *Saccharomycetaceae*. Nó thường được tìm thấy trên các cơ chất từ động vật hay thực vật với nguồn carbon chủ yếu có thể là alkane, lipid hoặc protein. Nấm men này được phân lập lần đầu tiên từ bơ thực vật (margarine). Cũng có thể tìm thấy nó trong các sản phẩm giàu protein và lipid như phomát hay xúc xích. Nấm men này chiếm ưu thế trong các loại phomát camembert hay phomát mốc xanh với mật độ lên tới  $10^6$ - $10^7$  khuẩn lạc/g.

Trái ngược với các loài nấm men *C. albicans* hay *C. tropicalis*, *Y. lipolytica* được xếp vào nhóm không gây bệnh và được FDA nhìn nhận là an toàn, do đó có thể sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm.

*Y. lipolytica* là loài nấm men hiếu khí hoàn toàn, nhạy cảm với nhiệt độ vượt quá 32-34°C. Đây cũng là loài nấm men lưỡng hình với khả năng hình thành các sợi nấm hoặc giả sợi trong những điều kiện nuôi cấy khác nhau như mức độ sục khí, nguồn dinh dưỡng, mức pH... *Y. lipolytica* có khả năng chuyển hóa nhiều loại đường, ngoại trừ saccharose do khuyết thiếu enzyme invertase. Nhưng nó lại có thể sử dụng nhiều dạng cơ chất kỵ nước như alkane, axit béo, các triglyceride hay thậm chí là acetate làm nguồn carbon duy nhất.

## Ứng dụng của *Y. lipolytica* trong công nghệ sinh học chất béo

Công nghệ sinh học chất béo bao gồm quá trình sản xuất và chuyển hóa chất béo và các hợp chất tan trong dầu (như các triacylglycerol, ceramide, phospholipid, carotenoid...) bằng vi sinh vật và công nghệ sinh học. Bảng

1 giới thiệu một vài ứng dụng của công nghệ sinh học chất béo trong một số lĩnh vực đặc thù như công nghiệp mỹ phẩm, thực phẩm chức năng, dược phẩm...

**Bảng 1: một số sản phẩm thương mại tạo ra bằng công nghệ sinh học chất béo**

| Sản phẩm                                             | Quy trình sản xuất                                                     |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Dầu béo từ vi sinh vật (chất béo không no)           | Lên men sử dụng các vi sinh vật từ biển                                |
| Các dạng lipid có cấu trúc                           | Phản ứng biến đổi chọn lọc với enzyme lipase                           |
| Các axit béo đã được làm giàu (tăng hàm lượng)       | Làm giàu bằng phương pháp sử dụng các enzyme lipase đặc hiệu           |
| Các carotenoid (carotene, astaxanthin)               | Lên men bằng tảo <i>Dunaliella</i> , <i>Haematococcus</i> hoặc nấm sợi |
| Các ester trong mỹ phẩm                              | Tổng hợp nhờ enzyme lipase                                             |
| Các sphingolipid                                     | Tạo ra nhờ <i>Pichia ciferrii</i>                                      |
| Các hormone steroid                                  | Chuyển hóa nhờ vi sinh vật                                             |
| Decalactone                                          | Tạo ra nhờ <i>Y. lipolytica</i>                                        |
| Hexanal và các chất thơm chuyển hóa từ chất béo khác | Tạo ra bằng các enzyme lipoxygenase, hydroperoxygenase, lyase          |
| Axit dicarboxylic                                    | Tạo ra nhờ <i>C. Tropicalis</i>                                        |
| Nhiên liệu sinh học                                  | Do các loại tảo sản xuất ra                                            |

Với những đặc trưng nêu trên, *Y. lipolytica* hiện diện trong rất nhiều ứng dụng công nghệ sinh học, đặc biệt trong công nghệ sinh học chất béo (bảng 2). Nó có thể được sử dụng ở dạng tế bào nguyên bản hoặc ở dạng tế bào sau khi biến đổi gen.

**Bảng 2: một số ứng dụng của *Y. lipolytica* trong công nghệ sinh học chất béo**

| Ứng dụng                                                                                | Tài liệu tham khảo                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Tạo ra các hợp chất thơm (γ-decalactone, hexanal)                                       | Aguedo và cs, 2001                               |
| Tạo ra các chất hoạt động bề mặt dạng polymer (liposan, lipomannan)                     | Schörken và Kempers, 2009                        |
| Tạo ra các protein (protease, lipase, esterase, phosphatase)                            | Barth và Gaillardin, 1997; Beckerich và cs, 1998 |
| Tạo ra các axit hữu cơ (axit α-ketoglutaric, axit pyruvic, axit citric, axit isocitric) | Finogenova và cs, 2005                           |
| Tạo ra các chất béo đơn bão (axit arachidonic, axit docosahexaenoic)                    | Papanikolaou và cs, 2002                         |

**Sản xuất protein:** trong một số điều kiện đặc thù, nấm men *Y. lipolytica* có thể tổng hợp nhiều loại protein khác nhau với hàm lượng cao, chẳng hạn như các protein enzyme protease, lipase, RNase, esterase, phosphatase. Theo Barth và Gaillardin (1997), *Y. lipolytica* có thể tạo ra 2 dạng protease tùy theo mức pH. Dạng protease kiềm tính (AEP) do gen XPR2 mã hóa và biểu hiện trong canh trường có chứa peptone và pH > 6. *Y. lipolytica* có thể tiết ra dạng enzyme này với hàm lượng 1-2 g/l. Dạng protease axit (AXP) được tiết ra khi mức pH giảm xuống dưới 4,5 và có 3 loại khác nhau tùy thuộc mức độ glycosyl hóa và hàm lượng glycan.

*Y. lipolytica* có thể tổng hợp 2 dạng enzyme lipase: lipase ngoại bào và lipase bám trên thành tế bào. Các dạng lipase này được sử dụng trong quá trình tổng hợp monoester của axit 2,4-dimethylglutaric, trong quá trình chuyển vị ester của meso-cyclopentane diol, trong công nghiệp thuộc da hay sản xuất phomat.

Ngoài những enzyme hình thành tự nhiên trong tế bào nấm men nguyên bản, ngày nay *Y. lipolytica* còn được sử dụng như một công cụ hiệu quả để sản xuất các loại

protein dị chủng dựa trên công nghệ sinh học phân tử. Đã có trên 42 loại protein có nguồn gốc khác nhau (virus, nấm sợi, vi khuẩn, động vật, con người) được tạo ra nhờ sử dụng *Y. lipolytica*.

**Sản xuất axit hữu cơ:** quá trình nấm men sản sinh ra các axit hữu cơ được phát hiện một cách tình cờ từ những năm 60 của thế kỷ trước trong lúc sử dụng hydrocarbon làm nguyên liệu nuôi cấy. *Y. lipolytica* có khả năng tạo nhiều loại axit hữu cơ khác nhau, ví dụ như các axit α-ketoglutaric, axit pyruvic, axit citric và axit isocitric với nguồn carbon sử dụng có thể là glucose, alkane, glycerol, ethanol... Lượng axit α-ketoglutaric do *Y. lipolytica* sinh ra có thể lên tới 108,7 g/l. Quá trình này phụ thuộc vào nồng độ thiamine, nhất là trong môi trường nuôi cấy nấm men bằng glucose. Khi không có thiamine trong môi trường sử dụng hỗn hợp glucose và glycerol thì lượng axit pyruvic và axit α-ketoglutaric sinh ra sẽ có tỷ lệ tương ứng lần lượt chiếm 75-80% và 20-25%. Hàm lượng axit pyruvic có thể đạt tới 50 g/l. Trong thí nghiệm lên men tạo axit citric thì axit citric chiếm ưu thế khi nuôi cấy *Y. lipolytica* trong môi trường glucose. Có thể điều chỉnh tỷ lệ hình thành axit isocitric bằng cách bổ sung alkane, chẳng hạn như hexadecane vào môi trường nuôi cấy.

**Sản xuất chất thơm:** γ-decalactone (hợp chất có hương đào) là ví dụ quen thuộc nhất trong số các chất thơm được tổng hợp bằng *Y. lipolytica*. Văn bằng sáng chế đầu tiên liên quan đến lĩnh vực này trình bày quá trình chuyển hóa dầu thầu dầu thành γ-decalactone thuộc về Farbood và Willis (1983). Quá trình chuyển hóa sinh học này có thể liên quan đến chu trình β-oxy hóa. Khi nuôi cấy chủng nấm men khuyết dưỡng *Y. lipolytica* PO1D trong môi trường chuyên dụng cho chuyển hóa sinh học có chứa hàm lượng uracil (amine cần thiết bổ sung cho sự khuyết dưỡng) thấp thì sau 75 giờ, hàm lượng γ-decalactone tạo ra có thể lên tới 9,5 g/l.

**Sản xuất lipid đơn bão:** không có nhiều vi sinh vật có khả năng tích lũy được chất béo dưới dạng axit béo không bão hòa đa nối đôi. Vậy mà *Y. lipolytica* lại có thể chuyển hóa 45-57% cơ chất thành lipid nội bào, thành phần này có thể chiếm tới 60% sinh khối khô của nấm men và có thành phần tương tự như cơ chất. Có thể sử dụng các loại dầu thực vật, các axit béo, dầu thô, xà phòng, hydrocarbon, mỡ động vật... làm cơ chất. Quá trình tích tụ chất béo trong tế bào *Y. lipolytica* phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện nuôi cấy (pH, nhiệt độ). Khi nuôi cấy bằng mỡ động vật ở mức pH = 6,0 và nhiệt độ 28-33°C, *Y. lipolytica* có thể tích lũy được lượng chất béo từ 0,45 đến 0,54 g/g sinh khối khô.

Tuy nhiên, các chủng *Y. lipolytica* hoang dại chỉ có các enzyme D9 và D12 desaturase nên chỉ tạo ra được dạng axit béo bão hòa đa nối đôi (PUFA) duy nhất là axit linoleic. Một chủng *Y. lipolytica* được biến đổi bằng kỹ thuật

di truyền có khả năng sinh ra các axit béo  $\omega$ -3 và  $\omega$ -6 nhờ việc đưa vào và biểu hiện các gen mã hóa cần cho quá trình sinh tổng hợp các axit béo trên, các gen này được lấy từ các loài nấm sợi *Schizochytrium aggregatum* và *Mortierella alpine* có khả năng tổng hợp PUFA. Một chủng *Y. lipolytica* tái tổ hợp khác biểu hiện cả gen mã hóa enzyme D12-desaturase (lấy từ *Mortierella alpine*) và isomerase của axit linoleic được tối ưu hóa bằng bộ ba phiên mã lại có thể tạo ra axit linoleic dạng liên hợp (CLA) với hàm lượng lên tới 44% tổng số axit béo khi nuôi cấy bằng dầu đậu nành.

**Xử lý hay nâng cao giá trị cho phế phẩm, phụ phẩm giàu chất béo:** đã có nhiều nghiên cứu sử dụng vi sinh vật nhằm xử lý những khu đất hay nước ô nhiễm hydrocarbon bằng phương pháp sinh học được tiến hành. Chẳng hạn, chủng *Y. lipolytica* ưa lạnh (*Y. lipolytica* RM7/11) phân lập từ đất trên núi Alpes có khả năng sinh trưởng trong dải nhiệt độ rộng (0-30°C) và phân hủy tới 68% lượng dầu diesel chỉ sau 10 ngày. Điểm đáng quan tâm là nghiên cứu này cho phép tạo ra cảm biến sinh học. Các nhà nghiên cứu đã sử dụng các tế bào *Y. lipolytica* dạng cố định để phát hiện các alkane có mạch dài trung bình. Hệ cảm biến sinh học này vận hành tốt ngay cả khi nhiệt độ thấp (5°C) với độ nhạy tối ưu ở 15°C, và đáp ứng với mức nồng độ dodecane lên tới 100 mM. Chủng mang ký hiệu NICM 3589 (bảng 3) cho thấy khả năng phân hủy dầu thô hết sức hiệu quả (đạt 78% trong vòng 5 ngày).

Bảng 3: một số ví dụ sử dụng *Y. lipolytica* để xử lý hay nâng cao giá trị cho phế phẩm

| Chủng        | Phế phẩm, phế thải                        | Sản phẩm                |
|--------------|-------------------------------------------|-------------------------|
| ATCC 20255   | Nước thải từ nhà máy chế biến dầu oliu    | Lipase, protein đơn bào |
| W29          | Nước thải từ nhà máy chế biến dầu oliu    | Lipase                  |
| CECT 1240    | Các loại hạt nghiền nhỏ                   | Lipase                  |
| ACA-DC 50109 | Nước thải từ nhà máy chế biến dầu oliu    | Axit citric             |
| NICM 3589    | Phế phẩm từ dứa                           | Axit citric             |
| UCP 0988     | Phế phẩm từ nhà máy tinh chế dầu thực vật | Chất nhũ hóa            |

Trong công nghiệp chế biến cá, chỉ non nửa lượng nguyên liệu được chế biến thành sản phẩm cho người. Phần còn lại sinh ra lượng phế phẩm, phụ phẩm khổng lồ thường được chế biến thành bột cá. Phế phẩm từ cá thường có hàm lượng lipid cao, điều này làm giảm giá trị thương phẩm của bột cá. Trong báo cáo của mình, Yano và cs (2008) đã chỉ ra khả năng sử dụng *Y. lipolytica* để xử lý hoặc nâng cao giá trị cho phế phẩm từ cá. Tiến hành lên men ở trạng thái rắn cho cá xắt nhỏ với *Y. lipolytica* giúp giảm bớt hàm lượng chất béo trong phế phẩm từ cá. Sau khi ủ 96 giờ kết hợp với đảo trộn gián đoạn, lượng chất béo thô đã giảm tới 46% trong khi lượng protein hao hụt không đến 1%. Với cùng thời gian lên men như vậy, sử dụng hỗn hợp vi khuẩn chỉ làm giảm được 28,3% lượng chất béo thô trong phế phẩm từ cá.

**Những ứng dụng khác:** tế bào nấm men *Y. lipolytica* hoặc các enzyme của nó còn được sử dụng trong công nghiệp dược phẩm, đặc biệt trong các phản ứng nhằm chọn lọc các đồng phân đối quang (thủy phân, phản ứng oxy hóa - khử) hoặc phản ứng tái ester hóa. Những phương pháp truyền thống để thu nhận đồng phân đối quang tinh khiết như phương pháp tổng hợp hóa học bất đối xứng, sắc ký chọn lọc đồng phân đối quang... đều rất đắt đỏ, vì vậy khả năng sử dụng enzyme làm chất xúc tác chọn lọc rất đáng chú ý. Lipase ngoại bào (Lip2p) của *Y. lipolytica* tỏ ra có hiệu quả trong việc phân tách các axit 2-halogeno-carboxylic, chúng là những hợp chất trung gian quan trọng để tạo ra một số loại thuốc giảm đau, prostaglandin... Enzyme này là chất xúc tác chọn lọc ưa đồng phân (S) trong phản ứng chuyển vị ester của các ester axit 2-bromo-phenyl và 2-bromo-tolyl acetic ethyl, những tiền chất để tổng hợp ra thuốc giảm đau và thuốc đối kháng thụ thể angiotensin II dạng phi peptide.

Một enzyme esterase loại B1 thuộc họ enzyme carboxylesterase/lipase lấy từ chủng *Y. lipolytica* CL 180 phân lập từ biển đã được sử dụng để phân tách hỗn hợp đồng phân đối quang của ester ofloxacin. Sử dụng enzyme này cho phép thu nhận được hỗn hợp chứa trên 52% levofloxacin, đồng phân dạng (S) của ofloxacin có phổ kháng sinh với hoạt tính kháng khuẩn mạnh gấp 8-128 lần so với đồng phân dạng (R).

*Y. lipolytica* còn tạo ra nhiều loại chất nhũ hóa khác nhau, những chất này chính là yếu tố quyết định trong quá trình phân hủy và xử lý sinh học các hydrocarbon, dầu, dầu thô. Ngoài ra, loài nấm men này còn có tiềm năng đáng lưu ý với khả năng sản xuất các polyol như erythritol, mannitol và arabitol được sử dụng làm chất tạo ngọt trong công nghiệp thực phẩm.

## Kết luận

*Y. lipolytica* là loài nấm men phi truyền thống có đặc tính lưỡng hình và sản sinh chất béo với khả năng sử dụng cơ chất tan trong dầu làm nguồn carbon duy nhất. Đặc điểm này đã mang lại tiềm năng to lớn cho việc ứng dụng loài *Y. lipolytica* trong công nghệ sinh học chất béo. Các loại phế phẩm, phụ phẩm trong công nghiệp chế biến cá thường có hàm lượng lipid cao, ngay cả khi đã qua công đoạn ép để thu hồi dầu cá. Tiến hành lên men với *Y. lipolytica* có thể là biện pháp hứa hẹn mang lại hiệu quả giảm bớt hàm lượng lipid, từ đó gia tăng giá trị thương phẩm cho bột cá. Mặt khác, các sản phẩm chuyển hóa sản sinh từ quá trình này cũng rất đáng quan tâm, đặc biệt là các chất béo đơn bào có thành phần tương tự như dầu cá.