

TỐI ƯU HÓA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY *ASPERGILLUS NIGER* ĐỂ TĂNG HIỆU SUẤT SẢN SINH PHYTASE

Nguyễn Thị Xuân Dung¹, Nguyễn Việt Khoa², Nguyễn Văn Tính³,
Trần Nguyễn Nhật Khoa³ và Lâm Thị Kim Chung⁴

ABSTRACT

*This study aimed to determine the most appropriate culture conditions *Aspergillus niger* such as substrate, moisture, cultivation time, pH, temperature, and minerals for culturing the selected isolate. In addition, the applicability of this phytase was investigated. The results showed that phytase production by *A. niger* PE1 was optimized through a 5-day semi-solid culture on corn meal substrate (60% moisture, pH 7.0) supplemented with 1% glucose:sucrose (1:1), 0.25% malt extract: ammonium sulfate (1:1), and 1% of KH_2PO_4 . The optimal pH and temperature of the crude enzyme extract were 3.5 and 65°C, respectively. The enzyme appeared to be stable during a 24-hour incubation at 4°C in a pH 3.5 buffer. It was strongly inhibited by the presence of 1mM and 5mM Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , K^+ and Zn^{2+} . Partly purified phytase through acetone precipitation could be stored at 4°C in a pH 3.5 buffer for 3 weeks without major loss of activity.*

Keywords: acetone precipitate, *A. niger*, culture conditions, phytase, preservation

Title: Optimizing the culture conditions of *Aspergillus niger* for high level phytase production

TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện nhằm tìm ra các điều kiện nuôi cấy *Aspergillus niger* PE1 như pH, ẩm độ, thời gian, khoáng chất cũng như nguồn cơ chất thích hợp để tăng năng suất sinh tổng hợp phytase. Đồng thời khảo sát một số điều kiện lý hóa để ứng dụng enzyme này vào trong chăn nuôi một cách hiệu quả. Kết quả nghiên cứu cho thấy với nguồn cơ chất là bột bắp thì chủng nấm *A. niger* PE1 sẽ cho hoạt tính cao nhất (8.897 U/g cơ chất) trong thời gian nuôi cấy là 5 ngày. pH tối ưu để nấm phát triển và tổng hợp enzyme là 7 cùng với ẩm độ là 60%, glucose pha trộn với sucrose (tỷ lệ 1:1) với nồng độ 1%, hỗn hợp malt extract và ammonium sulfate (tỷ lệ 1:1) với nồng độ 0,25%, KH_2PO_4 1%. pH và nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của phytase lần lượt là 3,5 và 65°C. Phytase khá bền ở nhiệt độ 4°C và pH 3,5 trong 24 giờ. Ngoài ra, phytase còn bị ức chế bởi một số ion kim loại như Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , K^+ và Zn^{2+} ở nồng độ 1mM và 5mM. Sản phẩm phytase thô kết tủa bằng acetone có thể được bảo quản ở dạng dung dịch ở pH 3,5 trong 3 tuần ở 4°C.

Từ khóa: *Aspergillus niger*, bảo quản, điều kiện nuôi cấy, phytase, tủa acetone

1 GIỚI THIỆU

Nguồn phospho chủ yếu có trong ngũ cốc ở dạng hợp chất phytate rất khó tiêu đối với vật nuôi dạ dày đơn nên thường bị thải ra ngoài nhưng để đáp ứng nhu cầu

¹ Viện NC&PT CNSH, Trường Đại học Cần Thơ

² Sinh viên CNSHTTK33, Viện NC&PT CNSH, Trường Đại học Cần Thơ

³ Sinh viên CNSHTTK34, Viện NC&PT CNSH, Trường Đại học Cần Thơ

⁴ Sinh viên CNSHK33, Viện NC&PT CNSH, Trường Đại học Cần Thơ

phospho cần thiết phải bổ sung phospho vô cơ. Tuy nhiên, các chất này không tiêu hóa hết sẽ bài tiết phospho vào trong phân thải làm ô nhiễm môi trường.

Các nghiên cứu gần đây cho thấy việc bổ sung phytase tỏ ra có hiệu quả trong việc cải thiện tình hình trên. Phytase là enzyme có thể thủy phân phytate trong đường tiêu hóa của vật nuôi, giúp hấp thụ phospho tốt hơn. Bổ sung phytase vào thức ăn có thể làm giảm sự bài tiết P trong phân, từ đó hạn chế được ô nhiễm môi trường. Phytase còn giúp giải phóng canxi và các nguyên tố vi lượng khác, đồng thời giảm lượng phospho vô cơ sử dụng; do đó giảm chi phí thức ăn cho vật nuôi.

Chăn nuôi là một lĩnh vực quan trọng ở Việt Nam nên nhu cầu về thức ăn gia súc rất cao. Vì vậy, việc nghiên cứu sản xuất phytase là hết sức cần thiết. Phần lớn enzyme phytase được sinh tổng hợp bởi các vi sinh vật. Trong đó, loài nấm *Aspergillus niger* là nguồn sản xuất phytase tiềm năng. Tuy nhiên, có ít tài liệu trong nước nghiên cứu về môi trường nuôi cấy để sinh tổng hợp phytase cao từ loài nấm mốc này. Do đó, đề tài được thực hiện nhằm tối ưu hóa môi trường nuôi cấy để tăng năng suất sinh tổng hợp phytase cao. Từ đó thiết lập được quy trình sản xuất chế phẩm sinh học phytase từ *A. niger* để đáp ứng nhu cầu phytase bổ sung trong thức ăn gia súc.

2 NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Chủng *A. niger* PE1 được phân lập từ phòng Công nghệ Enzyme, Viện NC&PT CNSH, khoai tây, trấu, bột mì, bột bắp.

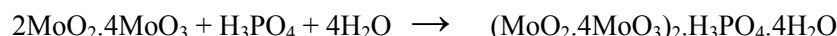
Hóa chất: Glucose, Sucrose, Maltose, Mannose, Fructose, KH_2PO_4 , NaCl, agar, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Ammonium sulphate, Glycine, CaCl_2 , FeSO_4 .

Môi trường bán rắn cơ bản: phytate : trấu (tỉ lệ 1:2) bổ sung 50% dung dịch khoáng gồm: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1g/l), KCl (0,5g/l), FeSO_4 (0,01g/l), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5g/l), MnSO_4 (0,01g/l), NaCl (0,1g/l), CaCl_2 (5g/l), pH 5,0.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Xác định hoạt tính phytase theo phương pháp Heinonen và Lahti (1981)

Các gốc phosphate tự do (do phytase cắt cơ chất phytate tạo ra) sẽ tác dụng với ammonium molybdate cho ra phosphomolybdate có màu vàng. Khi khử phosphomolybdate, màu vàng sẽ chuyển thành màu xanh molybdate theo phản ứng:



Hoạt tính của phytase được xác định dựa trên lượng phosphorus sinh ra trong mẫu khi đo độ hấp thụ ở bước sóng 880nm.

2.2.2 Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy để nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp phytase của chủng *A. niger* chọn lọc được

TN1: Ảnh hưởng của nguồn phytate và thời gian nuôi cấy

Chủng *A. niger* PE1 được nuôi trên môi trường bán rắn cơ bản với các 5 nguồn phytate (bột mì, bột bắp, bột bắp trích béo, bột đậu, bột đậu trích béo) và thời gian nuôi cấy từ 3 đến 7 ngày.

TN2: Khảo sát ảnh hưởng của ẩm độ và pH lên môi trường nuôi cấy

Nuôi cấy nấm mốc với nguồn phytate và thời gian được chọn từ TN1. Ẩm độ thay đổi trong khoảng 40, 50, 60, 70, 80% và pH từ 3 đến 7.

TN3: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng và nguồn carbon bổ sung

Với các điều kiện được chọn từ hai TN trên, bổ sung thêm 5 nguồn carbon (Glu, Suc, Mal, Man, Fru, Glu+Suc) với các hàm lượng khác nhau: 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5%

TN4: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng và nguồn nitơ bổ sung

Từ các điều kiện tối thích được chọn, tiến hành bổ sung 5 nguồn nitơ khác nhau (glycine (Gly), malt extract (ME), yeast extract (YE), ammonium sulfate (AS), malt extract + ammonium sulfate (ME+AS)) với hàm lượng tăng dần từ: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1%.

TN5: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng KH_2PO_4 (nguồn P) bổ sung

A. niger được nuôi với các điều kiện tối ưu từ các TN trên nhưng thay đổi hàm lượng KH_2PO_4 (nguồn P) từ 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0g; 2,5g/100g môi trường.

2.2.3 Khảo sát các điều kiện hóa lý lên sản phẩm enzyme phytase thô từ A. niger

TN6: Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính của phytase

Nhiệt độ tối ưu: Dịch trích enzyme thô (trích ly từ sinh khối nấm mốc được nuôi cấy trong các điều kiện được chọn ra ở trên) được ủ 10 phút ở các nhiệt độ: phòng ($\sim 35^\circ C$), $45^\circ C$, $55^\circ C$, $65^\circ C$, $75^\circ C$, $85^\circ C$.

Độ bền nhiệt: Dịch trích enzyme thô được ủ 24 giờ ở các nhiệt độ: $4^\circ C$, $35^\circ C$, $45^\circ C$, $55^\circ C$, $65^\circ C$, $75^\circ C$, $85^\circ C$.

TN7: Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính của enzyme phytase thô

pH tối ưu: Phản ứng xúc tác enzyme được thực hiện ở các pH với các mức: 2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5.

Độ bền pH: Mẫu enzyme phytase thô sau khi được chỉnh về các pH 2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5, được ủ 24 giờ.

TN8: Khảo sát ảnh hưởng của các ion kim loại lên hoạt tính phytase

Bổ sung $FeSO_4$, $MgSO_4$, $MnSO_4$, NaCl, KCl và $ZnSO_4$ vào dung dịch enzyme ở các nồng độ nồng độ ion kim loại (0mM, 1mM và 5mM), ủ ở $4^\circ C$ trong 30 phút.

TN9: Khảo sát nhiệt độ, thời gian và dạng sản phẩm bảo quản phytase thô

Dạng sản phẩm M1 (trích ly bằng ammonium acetate pH 3,5), M2 (M1+maltose dextrin 5%), M3 (sinh khối nấm mốc sấy khô ở nhiệt độ $45^\circ C$), M4 (phytase thô tủa bằng acetone), được giữ trong 12 tuần ở nhiệt độ phòng và $4^\circ C$.

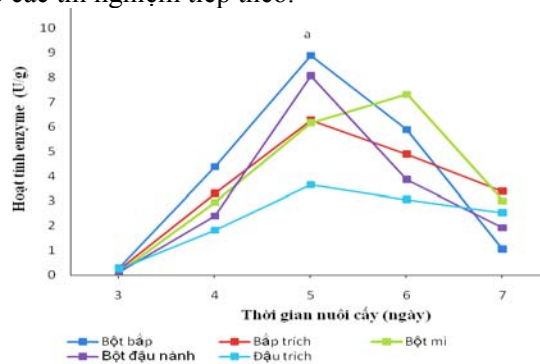
Các thí nghiệm 3 lần lặp lại. Số liệu được phân tích bằng phần mềm Excel và Statgraphics 3.0.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy để nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp phytase của chủng *A. niger* PE1

3.1.1 Ảnh hưởng của nguồn phytase bổ sung và thời gian nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp phytase

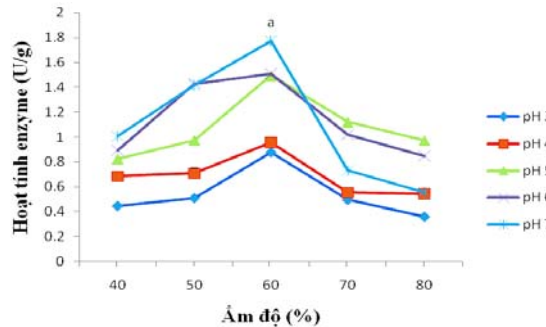
A. niger PE1 sinh phytase tăng dần từ ngày thứ 3 và cao nhất vào ngày thứ 5 với 4 nguồn cơ chất là bột bắp, bột đậu trich, bột bắp trich và bột đậu nành - khác biệt có ý nghĩa so với các ngày khác. Ở nguồn phytate là bột bắp, *A. niger* PE1 sinh enzyme phytase cao nhất kể đến là bột đậu nành khác biệt có ý nghĩa so với các nguồn phytate khác, bột đậu nành trích có hoạt tính enzyme thấp nhất. Các loại bột trích qua trích béo nên các thành phần dinh dưỡng cũng mất đi nhiều so với các loại bột chưa trích nên cho hoạt tính thấp hơn các loại bột thường. Kết quả này cũng tương tự với kết quả của Shieh và Ware (1968) trên *A. niger* NRRL 3135, của Vats và Banerjee (2002) trên là *A. niger*. Vậy, thời gian nuôi cấy 5 ngày và bột bắp (nguồn phytate) được xem là tối ưu để *A. niger* PE1 sinh phytase cao nhất và được áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1: Hoạt tính enzyme phytase của *A. niger* PE1 theo thời gian và nguồn phytase bổ sung

3.1.2 Ảnh hưởng của ẩm độ và pH lên môi trường nuôi cấy

Hình 2 thể hiện sự tương tác pH và ẩm độ ảnh hưởng lên quá trình sinh tổng hợp phytase của *A. niger* PE1.



Hình 2: Hoạt tính enzyme phytase của nấm *A. niger* theo ẩm độ và pH

Khi độ ẩm đạt 60%, hoạt tính phytase cao nhất, khác biệt có ý nghĩa đối với các nghiệm thức khác (độ ẩm quá thấp), độ ẩm tăng hơn 60% làm lượng nước dư trong môi trường sẽ làm hồ hoá với cơ chất và kết chặt môi trường lại làm mất độ xốp,

thoáng khí của môi trường đồng thời cũng gây khó khăn cho khuẩn ty phát triển. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Batal và Karem (2001), độ ẩm 60% thì thích hợp cho *A. niger* sinh phytase. Quá trình sinh tổng hợp phytase bị ức chế tại pH 3 và 4 ở tất cả các âm độ sau 5 ngày ủ dẫn đến hoạt tính phytase không cao. Tuy nhiên, quá trình sinh tổng hợp bắt đầu được đẩy mạnh kể từ pH 5 và đạt cao nhất ở pH 7 với sự khác biệt thống kê ở mức 5%. Kết quả trên tương tự với nghiên cứu trên *A. niger* 307 của Gargova và Sariyska (2002), nhưng có thấp hơn *A. niger* NRRL – 363 tổng hợp phytase cao nhất ở pH 5,5 (Trần Thị Tuyết, 2004); theo Vats và Banerjee (2002) pH tối ưu cho sinh tổng hợp phytase ở *A. niger* là 6,5. Điều này có thể do phytase được sản xuất từ các chủng nấm khác nhau nên đặc tính của chúng cũng khác nhau.

3.1.3 Ảnh hưởng của nguồn carbon và hàm lượng carbon bổ sung

Glucose+sucrose với nồng độ 1% cho hoạt tính cao nhất và khác biệt có ý nghĩa 5% về mặt thống kê so với các nguồn khác (Bảng 1). Nguyên nhân là khi hàm lượng carbon cao quá sẽ trở nên dư thừa và ức chế quá trình sinh phytase. Vats và Banerjee (2002) còn chỉ ra rằng khi có mặt trong môi trường các đường đơn sẽ ngăn cản mạnh quá trình tổng hợp enzyme; phytase sinh ra cao nhất đối với nguồn carbon là tinh bột, tuy nhiên việc thiết kế môi trường có độ dính cao là rất khó. Vì vậy sự kết hợp giữa đường đa và một đường đơn sẽ cho kết quả tốt nhất. Riêng nghiệm thức bổ sung mannose cũng cho hoạt tính phytase cao không khác biệt so với glucose+sucrose nhưng so về giá thành thì G+S rẻ hơn rất nhiều so với manose, nên S+G (1:1) với nồng độ 1% được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 1: Hoạt tính phytase (U/g cơ chất) theo nguồn carbon và nồng độ carbon bổ sung

Nguồn carbon	Nồng độ (%)				
	0	0,25	0,5	1	1,5
Glu		0,889 ^k	1,039 ^{hij}	1,101 ^{efghi}	0,984 ^{ijk}
Suc		1,047 ^{hij}	1,256 ^{bcd}	1,041 ^{hij}	0,988 ^{ijk}
Malt	1,153 ^{defgh}	1,073 ^{ghij}	1,234 ^{bcd}	1,226 ^{bcd}	1,167 ^{cdefg}
Man		1,206 ^{bedef}	1,285 ^b	1,416 ^a	0,974 ^{ijk}
Fruc		1,277 ^{bc}	1,213 ^{bced}	0,638 ^l	0,571 ^l
Glu+Sur		1,153 ^{defgh}	0,902 ^k	1,462 ^a	1,091 ^{fghij}

(Ghi chú: Các giá trị trung bình có cùng chữ thì không khác biệt có ý nghĩa, mức độ ý nghĩa 5%. Số liệu trong bảng là giá trị trung bình của ba lần lặp lại.)

3.1.4 Ảnh hưởng của nguồn nitơ và hàm lượng nitơ bổ sung

Nguồn nitơ là malt extract + ammonium sulfate (Mal+As) cho hoạt tính cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với các nguồn nitơ khác (Bảng 2).

Bảng 2: Hoạt tính enzyme phytase theo nguồn nitrogen và hàm lượng nitrogen bổ sung

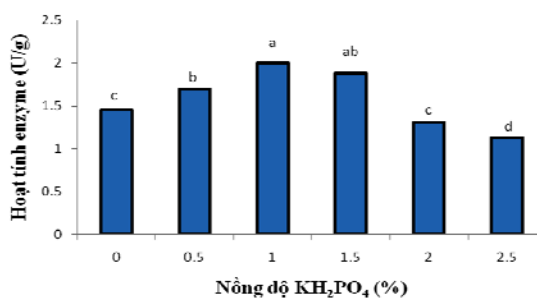
Nguồn nitrogen	Nồng độ (%)				
	0	0,25	0,5	0,75	1
Mal		1,924 ^{bc}	0,773 ^{ij}	0,718 ^j	0,626 ^{jk}
Amino		1,553 ^e	0,933 ^{hi}	0,647 ^{jk}	0,54 ^k
Mal+Amino	1,67 ^{de}	2,425 ^a	1,691 ^{de}	1,137 ^g	0,99 ^{gh}
Gly		1,787 ^{cd}	1,73 ^d	1,322 ^f	0,487 ^k
Yeast		1,958 ^b	1,538 ^e	1,315 ^f	1,32 ^f

(Ghi chú: Các giá trị trung bình có cùng chữ thì không khác biệt có ý nghĩa, mức độ ý nghĩa 5%. Số liệu trong bảng là giá trị trung bình của ba lần lặp lại.)

Kết quả thí nghiệm này khác so với nghiên cứu của Vats và Banerjee (2002), nguồn nitơ hữu cơ có tác động giúp vi sinh vật tăng sinh khối và cho hoạt tính cao hơn nguồn nitơ vô cơ. Điều này có thể là do chủng đối với *A. niger* PE1 nguồn nitơ hữu cơ có tác dụng tăng sinh khối và nguồn nitơ vô cơ có thể ảnh hưởng nhiều đến quá trình sinh tổng hợp phytase. Sau 5 ngày, ở tất cả các nguồn nitơ, hàm lượng nitơ 0,25% cho hoạt tính cao nhất và khác biệt ở mức ý nghĩa 5% so với các nồng độ khác. Như vậy, khi hàm lượng nitơ cao hơn 0,25% sẽ ức chế quá trình sinh phytase; lượng dinh dưỡng cung cấp dư sẽ được *A. niger* PE1 sử dụng để phát triển mà không cần phải tiết ra enzyme để phân hủy cơ chất. Kết quả này gần bằng với kết quả của El-Gindy *et al.* (2009) nghiên cứu trên *A. niger* với lượng malt extract là 0,3%.

Như vậy, nguồn nitơ Mal+As với nồng độ 0,25% (0,125% Mal+0,125% As) sẽ được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

3.1.5 Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng KH_2PO_4 (nguồn P) bổ sung

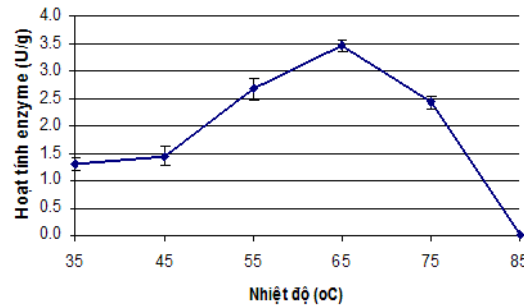


Hình 3: Hoạt tính enzyme phytase theo hàm lượng KH_2PO_4 bổ sung

Kết quả cho thấy khi không bổ sung KH_2PO_4 thì hoạt tính phytase là 1,448 U/g, trong khi hoạt tính phytase tăng lên đáng kể khi có sự bổ sung KH_2PO_4 và đạt giá trị cao nhất tại nồng độ 1% và khác biệt ý nghĩa thống kê mức 5% so với các nồng độ khác trừ 1,5%. Sau đó hoạt tính bắt đầu giảm dần từ nồng độ 2% (1,338U/g) và 2,5% (1,127U/g). Garvova và Sariyska (2002) giải thích rằng hàm lượng P trong KH_2PO_4 dư thừa có khả năng gây ức chế quá trình tổng hợp enzyme nhưng nhân tố P này không ảnh hưởng đến sự tăng sinh khối của nấm. Có thể *A. niger* PE1 lúc này sẽ không tiết ra enzyme phân hủy cơ chất có trong môi trường mà sử dụng nguồn photpho có sẵn. Riêng nghiệm thức 1% và 1,5% không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê nhưng để tiết kiệm giá thành trong sản xuất ta nên chọn KH_2PO_4 ở 1% làm giá trị tối ưu. Điều này tương tự với kết quả của Lâm Thị Kim Chung (2011), hàm lượng KH_2PO_4 là 1%. Tuy nhiên lại cao hơn so với nghiên cứu của Shieh (1969) trên chủng *A. ficuum* với hàm lượng P_i trong từ 0,0001- 0,005%.

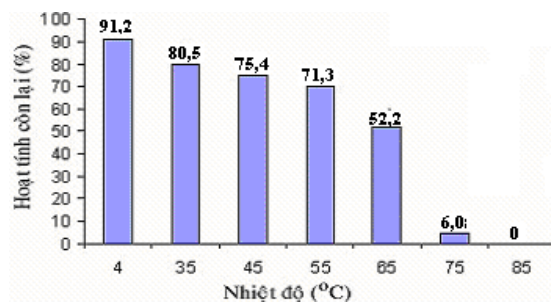
3.2 Khảo sát các điều kiện hóa lý lên sản phẩm enzyme phytase thô từ *A. niger*

3.2.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính của enzyme phytase thô từ *A. niger*



Hình 4: Nhiệt độ tối ưu của enzyme phytase thô từ *A. niger*

Phytase hoạt động mạnh ở nhiệt độ khá cao từ 55-75°C, đạt tối ưu tại giá trị 65°C (Hình 6). Nhiệt độ này cũng trong khoảng nhiệt độ tối ưu của phytase khác nhau từ 40-77°C (Kim *et al.*, 1998). Tuy nhiên, kết quả này không phù hợp với kết quả của Sariyska *et al.* (2005) phytase ngoại bào từ loài *A. niger* hoang dại có nhiệt độ tối ưu là 55°C tại pH 2,62; 58°C tại pH 5,05. Ở nhiệt độ thấp trong khoảng 35-45°C phytase hoạt động yếu. Ở 85°C phytase mất hoàn toàn hoạt tính. Khoảng nhiệt độ tối ưu của phytase ở *A. niger* PE1 khá cao có thể ứng dụng bổ sung vào thức ăn gia súc và thức ăn cá.

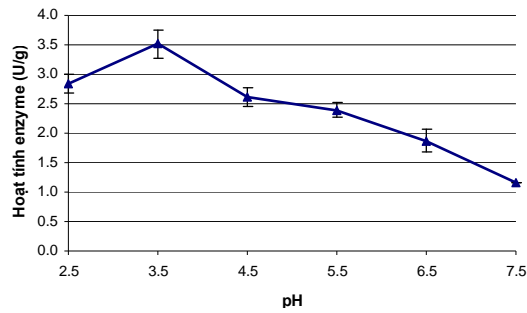


Hình 5: Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính của phytase trong 24 giờ

Phytase thô khá bền ở 4°C với hoạt tính còn lại khoảng 91,2%, giảm 9,8% so với trước khi ủ. Ở nhiệt độ 30-55°C hoạt tính còn lại giảm khoảng 40% hoạt tính so với trước ủ và gần như mất hẳn hoạt tính ở 75, 85°C (Hình 5). Kết quả này khác so với kết quả của Howson và Davis (1983), phytase có thể chịu được nhiệt độ từ 30-85°C, Fujita *et al.* (2003) ở *A. oryzae* bền ở nhiệt độ từ 10-80°C. Tuy nhiên, theo Powar và Jagannathan (1982), phytase từ *B. subtilis* có thể giữ ở -20°C mà không bị mất hoạt tính trong vòng 1 năm. Vì vậy phytase thô từ *A. niger* PE1 có thể bảo quản tốt nhất ở điều kiện dưới 4°C, thích hợp sử dụng ở các hộ gia đình.

3.2.2 Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính của enzyme phytase thô từ *A. niger*

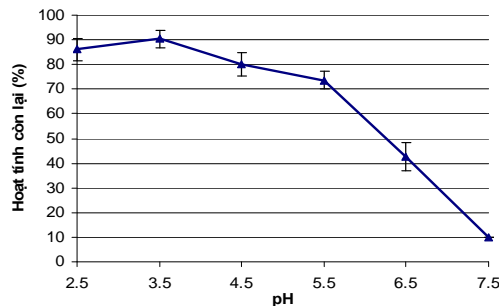
Phytase từ nấm mốc *A. niger* PE1 hoạt động mạnh ở môi trường acid trong khoảng pH 2,5-4,5 và đạt giá trị tối ưu tại pH 3,5 (Hình 6). Kết quả pH tối ưu này khác với hầu hết các nghiên cứu đã tham khảo, phytase ở *A. niger* có 2 giá trị tối ưu ở khoảng pH từ 2-2,5 và từ 5,0-5,5.



Hình 6: pH tối ưu của phytase thô từ *A. niger*

Nghiên cứu của Gargova và Sariyska (2002) ở nấm mốc *A. niger* 307 cho thấy pH tối ưu của phytase là 2,5 và 5,0. Theo Howson và Davis (1983), phytase từ *A. niger* có mức pH tối ưu khác nhau: 5,5 và 2,5 (PhyA); 2,0 (PhyB). Trong khi đó, phytase từ vi khuẩn có pH tối ưu cao hơn (pH 6,5-7,5), ở *Bacillus* là 7,0 (Kim *et al.*, 1998), ở *Enterobacter* sp. là 7,0-7,5 (Yoon *et al.*, 1996).

Theo kết quả ở hình 7, phytase có thể chịu được khoảng pH khá rộng từ 2,5-5,5. Tuy nhiên, ở pH 3,5 là bền nhất với hoạt tính còn lại khoảng 90% sau khi ủ 24 giờ. Hoạt tính enzyme có xu hướng giảm mạnh khi pH tăng dần đến pH 6,5 và 7,5.

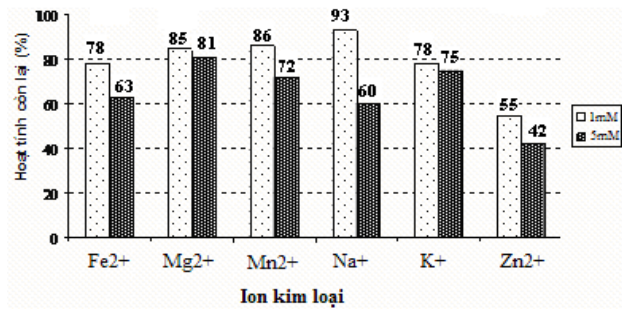


Hình 7: Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính phytase thô trong 24 giờ

Khoảng pH của phytase trong khoảng acid phù hợp với điều kiện tiêu hóa trong dạ dày (pH 2,0-4,0) và ruột non (pH 4,0-6,0) của động vật nên giúp tăng hiệu quả bổ sung trong thức ăn gia súc (Casey và Walsh, 2002). Howson và Davis (1983) cho rằng khoảng pH bền của phytase là từ 1,8-8,0. Nhưng kết quả này thấp hơn so với kết quả của Kim *et al.* (1998) phytase từ *B. subtilis* có khoảng pH bền là từ 4,0-8,0.

3.2.3 Ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt tính phytase

Hoạt tính phytase tinh sạch bị ức chế bởi tất cả các ion kim loại khảo sát ở hai nồng độ 1mM và 5mM. Zn^{2+} ức chế mạnh nhất ở 5mM với hoạt tính giảm 58%. Hiệu quả ức chế phytase tăng theo nồng độ các ion kim loại (1mM đến 5mM). Đối với Mg^{2+} và K^+ chênh lệch hiệu quả ức chế không cao ở hai nồng độ 1mM và 5mM. Trong khi đó, Fe^{2+} , Mn^{2+} và Zn^{2+} ức chế từ 13-15% hoạt tính. Riêng đối với Na^+ ở 1mM hoạt tính phytase giảm 7%, nhưng ở 5mM hoạt tính giảm đến 40% (Hình 8).

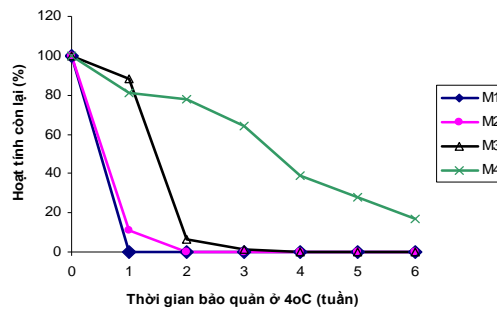


Hình 8: Ảnh hưởng các ion kim loại đến hoạt tính phytase

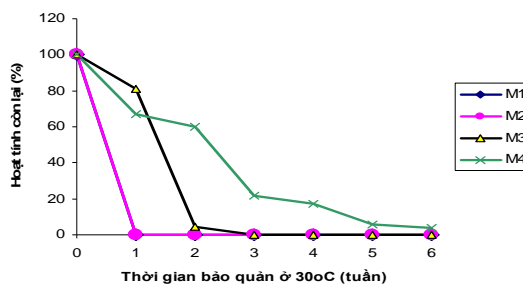
Các ion kim loại có ảnh hưởng làm giảm hoạt tính của phytase có thể do các ion này tạo phức hòa tan kém với cơ chất làm giảm nồng độ cơ chất hoạt động hoặc liên kết với enzyme làm thay đổi cấu trúc dẫn đến giảm hoạt tính Sariyska *et al.* (2005) cho thấy ion Fe²⁺, Na⁺, K⁺ và Mn²⁺ ức chế hoạt động phytase từ *A. niger* hoang dại với hoạt tính còn lại là 59,26%, 94,59%, 95,08% và 96,38% tương ứng nhưng ở nồng độ thấp hơn 0,1mM. Tuy nhiên, Mg²⁺ ở đây lại đóng vai trò hoạt hóa phytase. Như vậy, để tránh làm giảm hoạt tính phytase cần chú ý hàm lượng các ion kim loại khi bổ sung vào thức ăn.

3.2.4 Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản lên hoạt tính của enzyme phytase

Kết quả ở hình 9 và hình 10 cho thấy, ở 30°C và 4°C, sản phẩm M3 (sinh khối nấm mốc sấy khô ở nhiệt độ 45°C) giảm hoạt tính khoảng 12% ở 4°C và 19% ở 30°C sau 1 tuần bảo quản; nhưng đến tuần thứ 2, hoạt tính giảm nhanh, mất hoàn toàn hoạt tính ở tuần thứ 3. Trong khi đó sản phẩm M4 (phytase thô tủa bằng acetone) ở tuần thứ 3 ở 4°C hoạt tính giảm 36% và ở tuần thứ hai ở nhiệt độ 30°C ở tuần thứ 2 hoạt tính giảm khoảng 40%. Riêng sản phẩm M1 (trích ly bằng ammonium acetate pH 3,5) và M2 (M1+maltose dextrin 5%) lại mất hoạt tính khá nhanh chỉ sau 1 tuần bảo quản ở cả hai nhiệt độ. Theo El-Gindy *et al.* (2009) hoạt tính enzyme phytase thô từ *A. nives* và *Malbranchea sulfurea* bảo quản ở 4°C trong 20 ngày hoạt tính giảm khoảng 32,5% và 25,5%. Như vậy sản phẩm M4 có thể xem là sản phẩm tối ưu và thời gian bảo quản không quá 3 tuần ở nhiệt độ 4°C.



Hình 9: Hoạt tính còn lại (%) của phytase theo thời gian bảo quản ở 4°C



Hình 10: Hoạt tính còn lại (%) của phytase theo thời gian bảo quản ở 30°C

4 KẾT LUẬN

Đề tài bước đầu đã chọn lọc chủng *A. niger* có tiềm năng sinh tổng hợp phytase cao và thiết lập được môi trường nuôi cấy tối ưu cho chủng nấm *A. niger* PE1. Chủng nấm này sinh tổng hợp enzyme phytase cao nhất trong 5 ngày nuôi cấy, trên cơ chất bột bắp có bổ sung glucose + sucrose nồng độ 1%, malt extract + ammonium sulfate nồng độ 0,25%, KH₂PO₄ 1% với pH và ẩm độ tối ưu lần lượt là 7 và 60%. pH và nhiệt độ tối ưu của phytase lần lượt là 3,5 và 65°C. Phytase bị ức chế bởi một số ion kim loại như Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Na⁺, K⁺ và Zn²⁺ ở nồng độ 1mM và 5mM. Sản phẩm phytase thô kết tủa bằng acetone có thể được bảo quản ở dạng dung dịch ở pH 3,5 trong 3 tuần ở 4°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Casey, A. and G. Walsh. 2003. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresour Technol*, 86(2):183-188.
- El – Gindy, A.A., Ibrahim Z.M., Al, U.F. and O.M.El-Mahdy. 2009. Extracellular phytase production by solid – state cultures of *Malbranchea sulfurea* and *Aspergillus niveus* on cost – effective medium. *Agriculture and Biological Sciences*, 5(1):42 – 62.
- El-Batal, A.I, Karem. H. A, 2001, Phytase production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation. *Food Research International* 34(2001):715–720.
- Fujita, J., S. Shigeta, Y. Yamane, H. Fukuda, Y. Kizaki, S. Wakabayashi and K. Ono. 2003. Production of two types of phytase from *Aspergillus oryzae* during industrial koji making. *J Biosci Bioeng*, 95(5):460-465.
- Gargova S., M. Sariyska, A. Angelove, I. Stoilova, 2006. *Aspergillus niger* pH 2.1 optimum acid phosphatase with high affinity for phytate. *Folia Microbio*. 51(6):541-545.
- Heinonen, J.K. and R.J. Lahti. 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal Biochem*, 113(2):313-317.
- Howson S. J. and Davis R. P. 1983. Production of phytate – hydrolysing enzyme by some fungi. *Enz. Microbial. Technol.*, 5:377 – 382.
- Kim, Y.-O., H.-K. Kim, K.-S. Bae, J.-H. Yu and T.-K. Oh. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb Technol*, 22(1):2-7.
- Lâm Thị Kim Chung. 2011. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp enzyme phytase từ nấm mốc *Aspergillus niger*. Luận văn tốt nghiệp Cử nhân Công nghệ Sinh học. Đại học Cần Thơ.

- Powar, V.K. and V. Jagannathan. 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 151(3):1102-1108.
- Quan, C.S., S.D. Fan, L.H. Zhang, Y.J. Wang and Y. Ohta. 2002. Purification and properties of a phytase from *Candida krusei* WZ-001. *J Biosci Bioeng*, 94(5):419-425.
- Sariyska, M., S. Gargovar, L. Koleva and A. Angelov. 2005. *Aspergillus niger* phytase: purification and characterization. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 19:98-106.
- Shieh, T.R. and J.H. Ware. 1968. Survey of microorganism for the production of extracellular phytase. *Appl Microbiol*, 16(9):1348-1351.
- Trần Thị Tuyết. 2004. Thu nhận và khảo sát enzyme phytase của nấm *Aspergillus niger* NRRL 363 trong môi trường lên men bán rắn. Luận văn tốt nghiệp Cử nhân Công nghệ Sinh học, Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên.
- Vats, P. and U.C. Banerjee. 2002. Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *A. niger* var Teigham obtained from rotten wood-logs. *Proceed Biochemistry*.38:211–217.
- Yoon, S.J., J.C. Yun, K.M. Hae, K.C. Kwang, W.K. Jin, C.I. Sang and H.J. Yeon. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microbial. Technol.* 18:449-454.