

PHÂN LẬP VÀ THU NHẬN enzym phytase TỪ MỘT SỐ NẤM MỐC *Aspergillus* TRÊN MÔI TRƯỜNG LÊN MEN BÈ MẶT

Nguyễn Duy Long, Nguyễn Thị Mỹ Hạnh, Hoàng Quốc Khánh
Phòng Vi Sinh ứng dụng, Viện Sinh học Nhiệt đới

MỞ ĐẦU

Photpho là nguyên tố thiết yếu cần thiết cho sự tăng trưởng, phát triển và sinh sản của động vật. Tuy nhiên, có khoảng 60-75% photpho trong ngũ cốc và hạt dầu trong thức ăn của động vật được tìm thấy ở dạng phytat (inositol hexaphosphat) hoặc axit phytic. Động vật không thể hấp thụ photpho trong phytat vì chúng không có enzym phytase trong đường ruột. Vì thế phần lớn photpho được tìm thấy trong phân của động vật. Ngoài ra những chất dinh dưỡng khác như protein, Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} cũng sẽ bị liên kết vào cấu trúc của axit phytic. Do đó cơ thể động vật không thể hấp thụ được các ion này. Photpho trong phân của động vật được hấp thụ vào đất, chúng cần thiết cho sự phát triển của thực vật. Lượng photpho dư thừa không được cây hấp thụ sẽ bị cuốn trôi ra ao, hồ, sông, suối kích thích sự phát triển của thực vật (tảo) gây ra hiện tượng phú dưỡng hoá. Ngoài ra, sự thiếu hụt oxy sẽ làm cá chết và giảm sự đa dạng của hệ sinh vật có lợi trong nước.

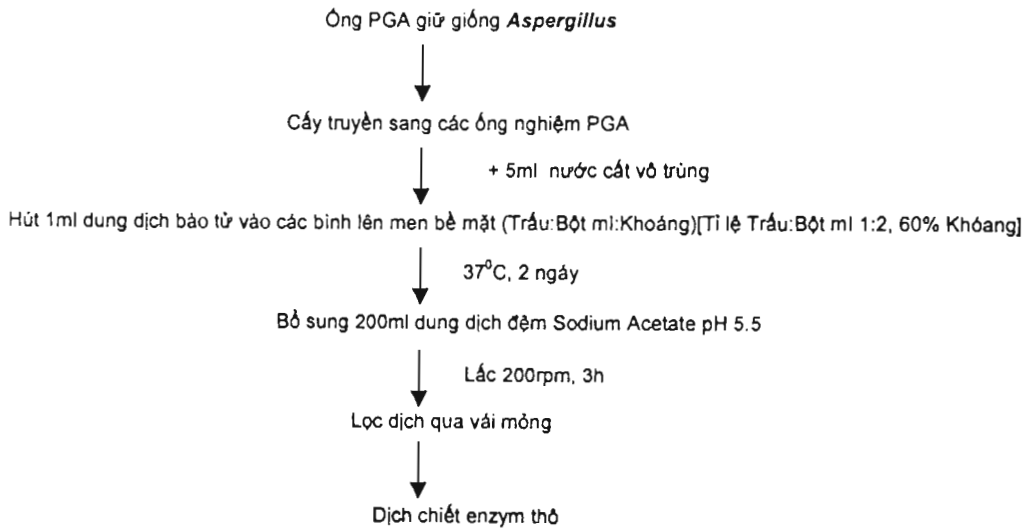
Phytase là một trong số các enzym hiện đang rất được quan tâm. Phytase thủy phân liên kết giữa photpho và vòng phytat sẽ phóng thích photpho vô cơ. Việc bổ sung phytase vào thức ăn gia súc giúp tận dụng tối đa nguồn photpho trong các loại nguyên liệu chế biến vì hệ vi sinh vật đường ruột của động vật hầu như không có khả năng sinh tổng hợp phytase, và đồng thời giúp giảm chi phí bổ sung lượng photpho vô cơ cần thiết vào thức ăn gia súc. Hơn thế nữa, phytase còn giúp giảm thiểu ô nhiễm photpho vào môi trường do chất thải động vật. Enzym phytase được nghiên cứu trên nhiều đối tượng khác nhau như nấm men, nấm mốc và vi khuẩn nhưng nhiều nhất vẫn là trên các loại nấm mốc đặc biệt là *Aspergillus* sp. vì khả năng sinh tổng hợp enzym phytase cao và có thể chịu được pH thấp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Các chủng *Aspergillus* được phân lập từ các loại men rượu (men cơm rượu, men rượu) và một số chủng *Aspergillus* khác (*A. aculeatus*, *A. awamori*, *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. ficuum*, *A. flavus*, *A. niger* NRRL-363, *A. ochraceus* A175, *A. oryzae*, *A. phoenisis*, *A. tubingensis*) từ bộ sưu tập giống của phòng Vi sinh ứng dụng - Viện Sinh học Nhiệt đới trên môi trường PGA.

Quá trình nuôi cấy và tách chiết enzyme phytase được thực hiện theo quy trình dưới (Hình 1). Enzym phytase được phân tích hàm lượng protein theo phương pháp Bradford. Hoạt tính enzym phytase được xác định trên cơ chất sodium phytate (một đơn vị hoạt tính phytase (U) được định nghĩa là lượng phytase giải phóng được 1 μmol photphat vô cơ trong

một phút từ sodium phytat ở 37°C , pH 5,5). Quá trình khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ, pH đến hoạt tính enzym phytase được thực hiện trong dải nhiệt độ từ $30-95^{\circ}\text{C}$, trong đệm Glycin: 2,5pH, trong Sodium acetat: 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5, trong đệm Imidazol-HCl: 6,0; 6,5; 7,0, trong đệm Tris-HCl: 7,5; 8,0; 8,5; 9,0. Enzym phytase được phân tích trên gel polyacrylamide theo phương pháp SDS-PAGE.



Hình 1: Quy trình lên men bề mặt *aspergillus* sinh tổng hợp enzyme phytase

KẾT QUẢ

1. Phân lập nấm *Aspergillus* từ men rượu

Trong số 14 loại men rượu thu nhận từ các nơi khác nhau cho thấy sự phân bố các chủng nấm mốc không có sự khác biệt nhiều. trong đó chúng tôi đã xác định được 4 chủng nấm mốc khác biệt nhau rõ rệt về hình thái là *Aspergillus.MCR1* (hình 2.1; 2.2; 2.3), *Aspergillus.MCR2*(hình 3.1; 3.2; 3.3), *Aspergillus. MR5* (hình 4.1; 4.2; 4.3), *Aspergillus.MR2* (hình 5.1; 5.2; 5.3),



Hình 2.1. Hình thái chủng MCR1 mọc trên môi trường PGA



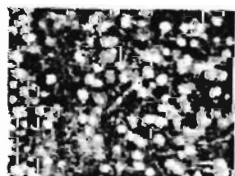
Hình 2.2. Hình thái và kích thước



Hình 2.3. Hình thái và kích thước



Hình 3.1. Hình thái chủng MCR2



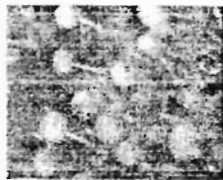
Hình 3.2. Hình thái và kích thước conidophores chủng MCR2; X 6



Hình 3.3. Hình thái và kích thước bào tử chủng MCR2 (conidia); X 100



Hình 4.1. Hình thái chủng MR5 mọc trên môi trường PGA



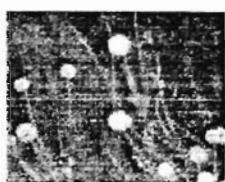
Hình 4.2. Hình thái và kích thước Conidiophores chủng MR5; X 6



Hình 4.3. Hình thái và kích thước bào tử chủng MR5 (conidia); X 100



Hình 5.1. Hình thái chủng MR2 trên môi trường PGA



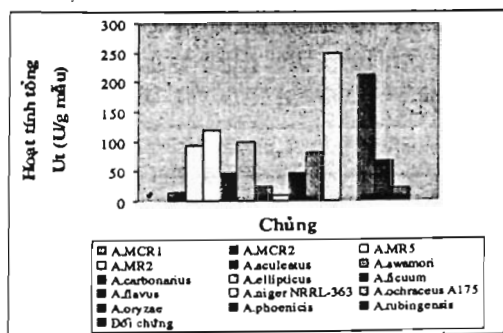
Hình 5.2. Hình thái và kích thước Conidiophores chủng MR2; X 6



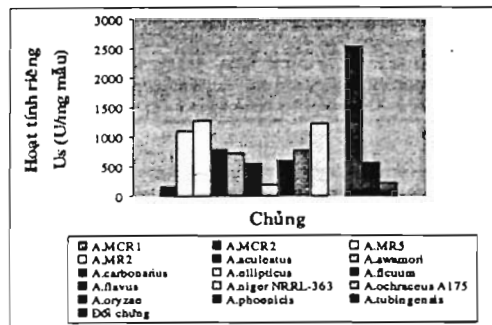
Hình 5.3. Hình thái và kích thước bào tử chủng MR2 (conidia); X 100

2. Xác định hoạt tính enzyme phytase của các chủng *Aspergillus*

Trong 4 chủng được phân lập từ các loại men thương mại, có 3 chủng *Aspergillus* có khả năng sinh phytase là A.MCR2, A.MR2, A.MR5 và 1 chủng không sinh phytase là A.MCR1. Trong số 3 chủng có hoạt tính phytase thì A.MR2 cho hoạt tính cao nhất. Ngoài ra, 1 chủng trong Bộ sưu tập giống- Phòng Vi sinh ứng dụng cũng không có khả năng sinh phytase là *A.ochraceus*. Hai chủng *Aspergillus* cho hoạt tính phytase cao nhất là *A.niger* NRRL-363 và *A.oryzae*. *A.niger* NRRL-363 có hoạt tính tổng (Ut) cao hơn *A.oryzae* nhưng *A.oryzae* lại cho hoạt tính riêng cao hơn. Enzyme từ các chủng còn lại có hoạt tính trung bình hoặc thấp (hình 6a, 6b). Đối với *A.flavus*, một loại nấm mốc sinh độc tố anfatocin cũng có khả năng sinh enzyme phytase, do đó cần thận trọng trong việc tuyển chọn nấm mốc. Từ các chủng trên, chọn ra 3 chủng *A.niger* NRRL-363, *A.oryzae*, A.MR2 cho hoạt tính phytase cao nhất để khảo sát phổ nhiệt độ, pH.



Hình 6a: Hoạt tính tổng Ut (U/g mẫu)

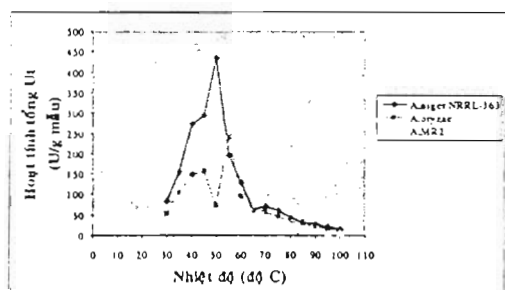


Hình 6b. Hoạt tính riêng Us (U/mg mẫu) của các chủng nấm mốc

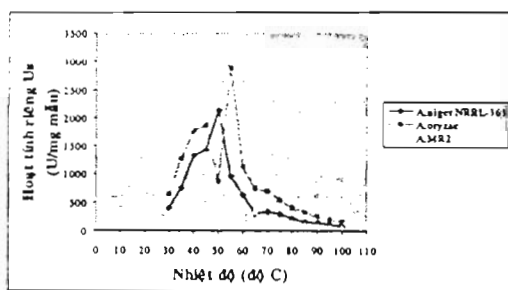
3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính enzyme phytase

Từ đồ thị cho thấy nhiệt độ tối ưu cho hoạt tính phytase cao đối với cả 3 chủng *A.niger* NRRL-363, *A.oryzae*, A.MR2 là 50-55°C so sánh với các kết quả đã nghiên

cứu đa số phytase có nhiệt độ tối ưu trong khoảng 44-60°C [6,10]. Tại khoảng nhiệt độ tối ưu này, *A.niger* NRRL-363 cho hoạt tính enzym phytase tổng Ut cao nhất nhưng lại có hoạt tính riêng Us thấp nhất trong 3 chủng. *A.niger* NRRL-363 có hàm lượng protein cao, hoạt tính tổng cao, hoạt tính riêng thấp chứng tỏ chủng này cho ít enzym phytase hơn trong tổng số nhiều loại protein được sinh ra, hình (7a, 7b). Trong sản xuất, hoạt tính riêng cao được quan tâm nhiều hơn. *A.oryzae* và *A.MR2* đáp ứng được yêu tố này, cả 2 chủng đều có hoạt tính enzym phytase tổng thấp hơn *A.niger* NRRL-363 nhưng lại có hoạt tính riêng cao hơn hẳn nhất là *A.oryzae*. Từ kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính phytase từ *A.niger* NRRL-363, *A.oryzae*, *A.MR2*, chúng tôi có kết luận và nhận xét như sau: Các tính chất này của phytase từ 3 chủng nấm mốc trên rất thích hợp cho các ứng dụng công nghiệp, đặc biệt trong chế biến thức ăn gia súc.



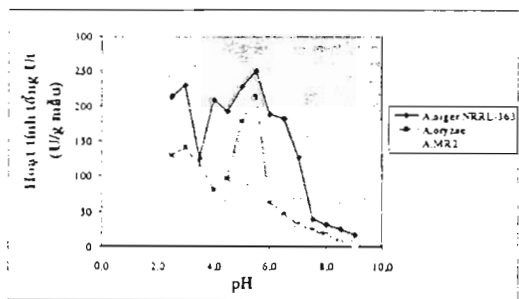
Hình 7a. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính tổng của U_t



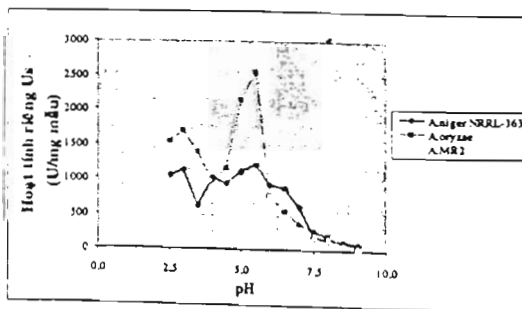
Hình 7b. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính tổng của U_s

4. Khảo sát ảnh hưởng của pH đến hoạt tính enzyme phytase

Từ đồ thị cho thấy, cả 3 chủng *A.niger* NRRL-363, *A.oryzae*, *A.MR2* có pH tối ưu cho hoạt tính phytase cao là 2,5 và 5,0-5,5. Hầu hết enzym phytase từ vi sinh vật thể hiện pH tối ưu giữa 4,5 và 5,5, đặc biệt đối với phytase từ nấm mốc [10,11]. Tính chất này rất cần thiết trong các ứng dụng công nghiệp và phù hợp với điều kiện trong dạ dày (pH 2,0-4,0) và ruột non (pH 4,0-6,0) của động vật [9].



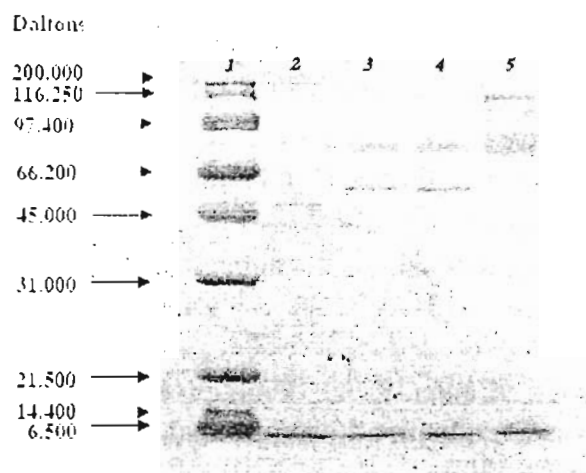
Hình 8a. Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính tổng enzym phytase chủng *A.niger* NRRL-363, *A.oryzae*, *A.MR2*



Hình 8b. Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính tổng enzym phytase chủng *A.niger* NRRL-363, *A.oryzae*, *A.MR2*

5. Phân tích enzyme phytase trên gel polyacrylamide

Mục đích của thí nghiệm nhằm xác định một số thành phần protein có trong dịch chiết enzym phytase của ba chủng *A.niger* NRRL-363, *A.oryzae*, *Aspergillus* MR2. Kết quả xác định được trình bày ở hình 9 dưới đây:



Hình 9: Phân tích enzym phytase trên gel polyacrylamide bằng phương pháp điện di SDS PAGE.

Band 1: chứa các protein marker có trọng lượng phân tử là 200.000, 116.250, 97.400, 66.200, 45.000, 31.000, 21.500, 14.400, 6.500 Daltons. Band 2: mẫu đối chứng (control). Band 3: dịch chiết enzym thô của *A.oryzae* chứa các protein có trọng lượng phân tử là 97.400, 89.200 và 58.000 Daltons. Band 4: dịch chiết enzym thô của *A.MR2* chứa các protein có trọng lượng phân tử là 97.400, 89.200 và 58.000 Daltons. Band 5: dịch chiết enzym thô của *A.niger* NRRL-363 chứa các protein có trọng lượng phân tử là 116.250, 97.400, 89.200 và 58.000 Daltons. Phytase từ các chủng *A.niger* có hai loại là PhyA và PhyB. PhyA có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng 66-128 kDa. PhyB có trọng lượng phân tử khoảng 58-65 kDa [2]. Phytase từ các chủng *A.oryzae* cũng cho hai loại phytase là PhyA và PhyB. PhyA có trọng lượng phân tử khoảng 65-120 kDa. PhyB có trọng lượng phân tử khoảng 58 kDa [19]. Qua kết quả phân tích enzym phytase sinh tổng hợp từ các chủng *A.niger* NRRL-363, *A.oryzae*, *A.MR2* trên gel polyacrylamide bằng phương pháp SDS - PAGE, các band protein xuất hiện tương đối rõ trong vùng kích thước của phytase so với kết quả nghiên cứu trước [2,19].

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Tuyết (2003). Thu nhận và khảo sát enzym phytase của nấm *Aspergillus niger* NRRL-363 trong môi trường lên men bán rắn. Khóa luận Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP HCM, 5-27.
2. Mullaney E. J. and Ullah A. H. J. (2003). The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312, 197-184.

3. Barbara, George Szakacs, Ashok Pandey, Sabu Abdulhameed, James C. Linden, và Robert P. Tengerdy (2003). Production of phytase by *mucor racemosus* in solid-state fermentation. *Biotechnol Prog.* 19 (2), 312 -319.
4. Wodzinski R. J. and Ullah A. H. J. (1996). Phytase. *Advances in Applied Microbiology*, vol 42, 263-298.
5. Lei X. G. and Porres J. M. (2003). Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters*, 25 (21), 1787-1794.
6. Oh B. C., Choi W.-C., Park S., Kim Y.-O., Oh T.-K. (2004). Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Appl Microbiol Biotechnology* , 63 (4), 362-372.
7. Zimmermann B., Lantzsch H.-J., Langbein U. and Drochner W. (2002). Determination of Phytase activity in cereal grains by direct incubation, *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 86 (9-10), 374-352.
8. Bogar B., Szakacs G., Linden J. C., Pandey A. and Tengerdy R. P. (2003). Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 30 (3), 183-189.
9. Casey A. and Walsh G. (2003). Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresour Technol*, 86 (2), 183-188.
10. Vohra A. and Satyanarayana T. (2003). Phytases: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23 (1), 29-60.
11. Kerovuo J. (2000). A Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization and Production of the Enzyme, 1-66.
12. McKee T. and McKee J. R. (1999). An Introduction to Chemical Biology. *Biochemistry*, vol 2.
13. Daniel M. Bollag, Michael D. Rozycki và Stuart J. Edelstein (1996). *Protein Methods*. Wiley, Chichester.
14. Nagashima T., Tange T., and Anazawa H. (1999). Dephosphorylation of Phytate by Using the *Aspergillus niger* Phytase with a High Affinity for Phytate. *Appl Environ Microbiol*, 65 (10), 4682-4684.
15. Budy J. Hidayat, Niels T. Eriksen and Marilyn G. Wiebe (2006). Acid phosphatase production by *Aspergillus niger* N402A in continuous flow culture. *Federation of European Microbiological Societies Microbial Lett* , vol 254, 324-321.
16. Chantasartasamee K, Duangnetre Israngkul Na Ayuthaya, Sunthum Intarareugsom, Saovane Dhamsthit (2004). Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. *Process Biochemistry*, 1-5.
17. Shieh T. R. and Ware J. H. (1968). Survey of microorganisms for production of extracellular phytase. *Applied Microbiology*, 16 (9), 1348-1351.
18. Howson S. J. and Davis R. P. (1983). Production of Phytase – hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme Microbiol Technol.*, 5, 377-382.

19. Fujita J., Seiko Shigeta, Yu-Ichi Yamane, hisashi Fukuda, Yasuzo Kizaki, Saburo Wakabayashi, and Kazuhisa Ono (2003). Production of two phytase from *Aspergillus oryzae* during industrial Koji making. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95 (5), 460-464.
20. Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, Rémy R, Fimbel R, Oesterhelt G, Lehmann M, and Van Loon A. P. G. M. (1999). Biochemical Characterization of fungal phytases (myo-Inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties, 65 (2), 367-373.

SUMMARY

Isolation and investigation of phytase from *Aspergillus* in solid-state fermentation

Nguyen Duy Long, Nguyen Thi My Hanh, Hoang Quoc Khanh
Institute of Tropical Biology

Phytases are acid phosphatase enzymes have been found as a supplement to increase not only the growth rate of monogastric animals but also the efficiency of phosphate utilization in feeds, which significantly reduces phosphorus excretion effect to environmental pollutants. In this study, phytases are extracted from *Aspergillus* species are isolated from original raw material of fermented glutinous rice. Three species A.MCR2, A.MR2, A.MR5 are found with a high positive of phytase activity. The effects of pH and temperature conditionals are researched and compared with others species of *Aspergillus* genus. Phytases are also assayed on polyacrylamide gel by SDS-PAGE method and the results appearing with 65 kDa and 58 kDa respective to phyA and phyB from A.MR2.