

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP ENZYME PHYTASE TỪ CÁC CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus subtilis*

STUDY ON PHYTASE PRODUCTION FROM (*Bacillus subtilis*) STRAINS

Võ Đức Tuấn*, Nguyễn Thị Thanh Trúc, Lê Thị Ngọc Hân và
Trương Phước Thiên Hoàng

Viện Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường
trucnguyents@yahoo.com

ABSTRACT

31 strains of *B. subtilis* (02 Rd2 Ba, Ba rice 1, Bs11, Bs12, Bs13, Bs14, Bs21, Bs22, Bs23, Bs24, Bs31, Bs32, Bs33, Bs35, BsCP, BsDN, Ba 21, Ba 38, Ba 43, Ba 44, Ba 49, Ba 55, Ba 58, Ba 64, Ba 65, Ba 69, Ba 71, Ba 81, Ba 82 and Ba 85) in order to evaluate phytase enzyme synthesis (qualitative methods) with triplicates. Based on periphery zone of enzyme, seven bacteria strains produced the highest phytase activity (Bs 24, Ba 64, Ba 82, Ba 85, Ba 24, Ba 58 and Bs 14). After that, evaluation of the optimal conditions for phytase activity as the incubation time (24, 36, 48, 60 and 72 hours), temperature (30, 40, 50, 60 and 70°C) and pH (4, 0; 4.5; 5.0, 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5 and 8). The results show that the synthesis of phytase with optimal conditions such as incubation time (36h), temperature (40-60°C) and pH (5.0 to 6.5) in the solid substrate medium to produce highly phytase enzyme activity in seven *B. subtilis* strains; in which, the highest strain is *B. subtilis* Ba58 (0.35% Ca⁺²).

Key words: *Bacillus subtilis*, phytase, phosphorous

ĐẶT VẤN ĐỀ

Thức ăn có nguồn gốc protein thực vật được sử dụng là sự lựa chọn thay thế cho việc tốn kém và khan hiếm bột cá trong thức ăn thủy sản cũng như chăn nuôi. Tuy nhiên, mối quan tâm lớn với các thành phần thực vật là sự hiện diện của chất kháng dưỡng (phytate). Nó được tìm thấy trong hầu hết các thức ăn có nguồn gốc từ thực vật như gạo, lúa mạch, đậu tương, bông và mè, chiếm từ 60-90% tổng phosphor (P) là thành phần không hữu dụng cho cá (NRC, 1993; Lopez và *ctv.*, 2002). P còn lại được tồn tại dưới dạng phosphate vô cơ hòa tan và P tế bào.

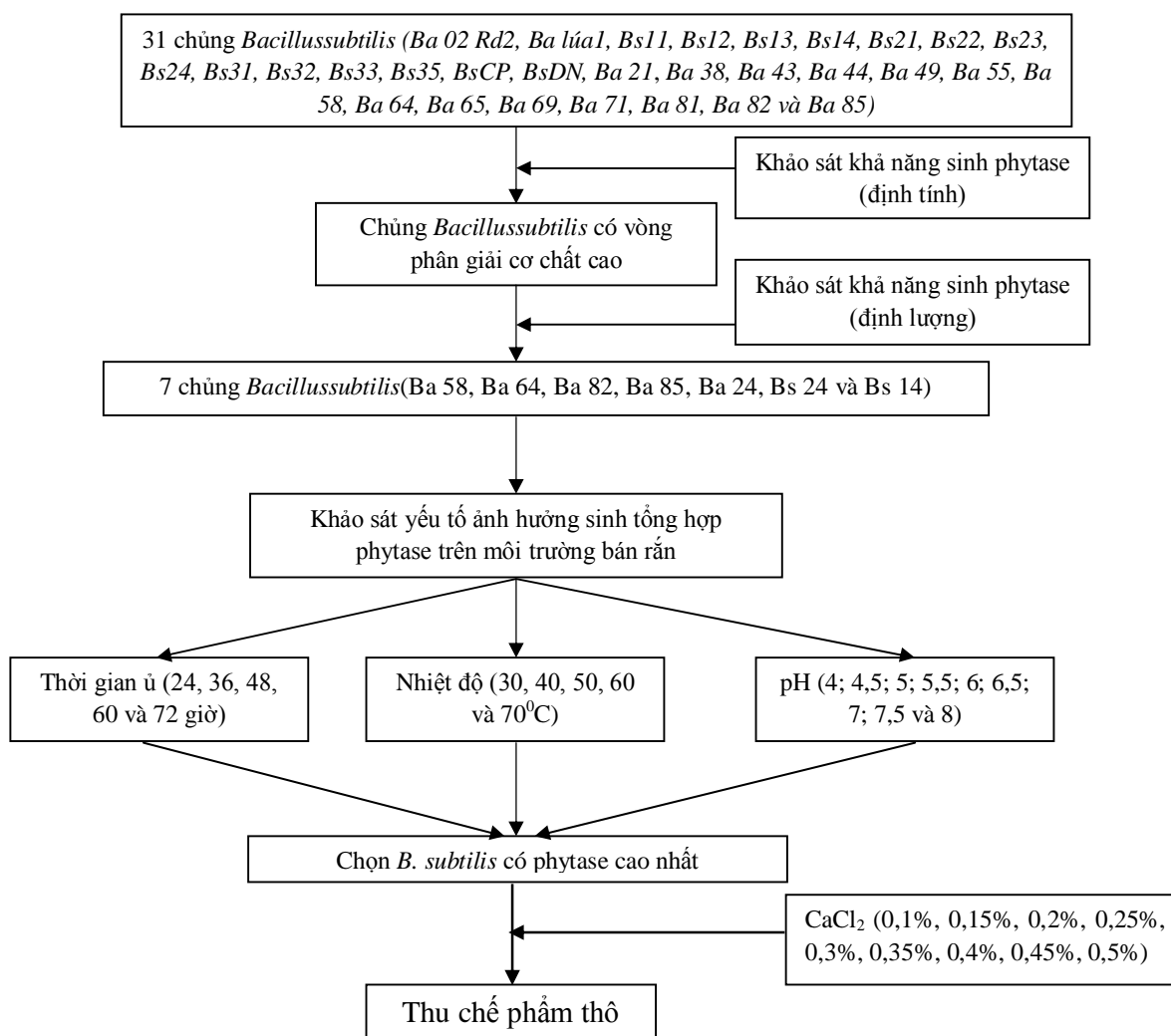
Phytase là enzym làm giảm hiệu lực tính kháng dưỡng của thức ăn có hàm lượng phytate cao. Phytase hiện diện trong tự nhiên, từ vi sinh vật, thực vật cũng như một số mô động vật. Chẳng hạn như phytase được phân lập từ thực vật (Reddy và *ctv.*, 1989), vi khuẩn (Rodriguez và *ctv.*, 1999) và nấm (Pasamontes và *ctv.*, 1997). Phytase có thể làm tăng hấp thụ P trong cơ thể vật nuôi thêm 60% và được dùng như là chất bổ sung bắt buộc cho thức ăn chăn nuôi ở châu Âu, Đông Nam Á, Hàn Quốc, Nhật, Đài Loan để giảm tác hại đến môi trường do P từ phân vật nuôi thải ra. Một số nghiên cứu về hiệu quả của phytase trong thủy sản đã được công bố ở một số quốc gia trên thế giới. Theo Furuya và *ctv.*, (2001), việc sử dụng phytase trong khẩu phần thức ăn nhằm tăng calcium và phosphor hữu dụng, cải thiện tốc độ tăng trưởng và tăng hiệu quả sử dụng thức ăn. Việc thực hiện hoạt tính phytase từ các vi sinh vật 1000UI/kg thức ăn mang lại kết quả trong việc tăng trưởng và sử dụng các chất khoáng tương tự với việc sử dụng các khẩu phần thức ăn từ thực vật bổ sung với phosphor vô cơ (Liebert và Portz, 2005).

Do đó, các sinh vật có khả năng tổng hợp phytate với hoạt lực cao đã trở thành mối quan tâm lớn đối với các nhà nghiên cứu nói chung và xây dựng thức ăn thủy sản nói riêng.

Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu: thu nhận enzyme phytase từ vi khuẩn *Bacillus subtilis*.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu nhận phytase từ *Bacillus subtilis*



Hoạt tính phytase được phân tích theo Fiske và Subbarow (1925). Một đơn vị (U) của phytase hoạt động được định nghĩa là lượng enzyme giải phóng 1mmol của Pi trong 1 phút từ sodium phytate ở 37⁰C, pH 5.

$$\text{Hoạt tính phytase} = \frac{A * V * L}{0,5 * m * t} \quad (\text{U/g})$$

Trong đó:

A: nồng độ phospho suy ra từ đường chuẩn (nmol)

V: thể tích dung dịch phospho trước khi cho thuốc thử (5ml)

L: độ pha loãng enzyme

0,5: thể tích enzyme cho vào phản ứng

m: khối lượng chế phẩm enzyme phân tích

t: thời gian phản ứng (phút)

Phân tích thống kê

Tất cả các số liệu thu thập được sau thí nghiệm được tính toán bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai một và hai yếu tố (one way và two way ANOVA) bằng phần mềm Stagraphic for Win. Sự khác biệt về các chỉ tiêu trong thí nghiệm giữa các nghiệm thức được so sánh bằng trắc nghiệm Tukey với mức ý nghĩa thống kê P ≤ 0,05.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân giải phytase

31 chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* được chọn và phân lập từ các nguồn gốc khác nhau trong môi trường nuôi cấy ở 37⁰C trong 36 giờ. Trong quá trình nuôi cấy, chủng vi khuẩn có khả năng sản sinh enzyme phytase thể hiện qua vòng phân giải (vòng trong suốt bao quanh khuẩn lạc). Vòng phân giải được hình thành nhờ vào khả năng hòa tan hợp chất phospho được bổ sung trong môi trường nuôi cấy. Dựa vào đường kính vòng phân giải đánh giá định tính khả năng phân giải cơ chất mạnh hay yếu của chủng vi sinh vật phân lập.

Bảng 3.1. Bảng theo dõi định tính vòng phân giải cơ chất

<i>B. subtilis</i>	Đường kính vòng phân giải phytase (D) cm ± SD	Đường kính khuẩn lạc (d) cm ± SD	D/d ± SD	<i>B. subtilis</i>	Đường kính vòng phân giải phytase (D) cm ± SD	Đường kính khuẩn lạc (d) cm ± SD	D/d ± SD
Ba 02 Rd	1,43 ± 0,05	0,2 ± 0,0	7,17 ⁱ ± 0,29	Ba 85	2,77 ± 0,05	0,3 ± 0,0	9,22 ^{kl} ± 0,19
Ba 1 lua	0,93 ± 0,12	0,3 ± 0,0	3,11 ^{bc} ± 0,38	Bs 11	1,13 ± 0,06	0,2 ± 0,0	5,67 ^{fg} ± 0,29
Ba 21	1,47 ± 0,06	0,3 ± 0,0	4,89 ^{de} ± 0,19	Bs 12	1,13 ± 0,06	0,2 ± 0,0	5,67 ^{fg} ± 0,29
Ba 24	2,87 ± 0,11	0,3 ± 0,0	9,56 ^{klm} ± 0,38	Bs 13	0,93 ± 0,06	0,2 ± 0,0	4,67 ^d ± 0,29
Ba 38	2,07 ± 0,11	0,3 ± 0,0	6,89 ^j ± 0,38	Bs 14	2,67 ± 0,06	0,2 ± 0,0	8,89 ^d ± 0,19
Ba 43	2,00 ± 0,20	0,3 ± 0,0	6,67 ^{hi} ± 0,67	Bs 21	0,87 ± 0,06	0,2 ± 0,0	4,33 ^d ± 0,29
Ba 44	1,87 ± 0,11	0,3 ± 0,0	6,22 ^{gh} ± 0,38	Bs 22	1,27 ± 0,06	0,2 ± 0,06	5,67 ^{fg} ± 1,44
Ba 49	1,20 ± 0,00	0,2 ± 0,0	6,00 ^{fg} ± 0,00	Bs 23	0,73 ± 0,06	0,2 ± 0,0	3,67 ^c ± 0,29
Ba 55	1,47 ± 0,05	0,3 ± 0,0	4,89 ^{de} ± 0,19	Bs 24	3,63 ± 0,12	0,4 ± 0,0	9,08 ^{jk} ± 0,29
Ba 58	3,40 ± 0,17	0,3 ± 0,0	11,33 ⁿ ± 0,58	Bs 31	0,53 ± 0,06	0,2 ± 0,0	2,67 ^b ± 0,29
Ba 64	2,97 ± 0,06	0,3 ± 0,0	9,89 ^m ± 0,19	Bs 32	1,13 ± 0,06	0,2 ± 0,0	5,67 ^{fg} ± 5,67
Ba 65	1,10 ± 0,00	0,2 ± 0,0	5,50 ^{ef} ± 0,00	Bs 33	1,13 ± 0,06	0,2 ± 0,0	5,67 ^{fg} ± 5,67
Ba 69	0,53 ± 0,06	0,2 ± 0,0	2,67 ^b ± 0,29	Bs 35	0,00 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,00 ^a ± 0,0
Ba 71	2,03 ± 0,06	0,3 ± 0,0	6,78 ^{hi} ± 0,19	Bs CP	0,50 ± 0,0	0,2 ± 0,0	2,50 ^b ± 0,0
Ba 81	1,40 ± 0,00	0,2 ± 0,0	7,00 ⁱ ± 0,00	Bs DN	1,43 ± 0,06	0,2 ± 0,0	7,17 ⁱ ± 0,29
Ba 82	2,93 ± 0,11	0,3 ± 0,0	9,78 ^{lm} ± 0,38				

Trong thí nghiệm, hầu như các chủng vi khuẩn đều có khả năng sản sinh enzyme phytase ngoại trừ *B. subtilis* Ba 35. Trong đó, 07 chủng *B. subtilis* Ba 58 (9,08 ± 0,29), Ba 64 (9,89 ± 0,19), Ba 82 (9,78 ± 0,38), Ba 24 (9,56 ± 0,38), Ba 85 (9,22 ± 0,19), Bs 24 (11,33 ± 0,58) và Bs 14 (8,89 ± 0,19) có đường kính vòng phân giải cơ chất cao nhất, sai khác rất có ý nghĩa so với các chủng vi khuẩn khác (P < 0,05) (Bảng 3.1).

Từ kết quả khảo sát phân lập các chủng vi khuẩn, ta tuyển chọn được 7 chủng có khả năng phân giải tốt nhất là Ba 58, Ba 64, Ba 82, Ba 85, Ba 24, Bs 24 và Bs 14 để tiếp tục tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Khảo sát thời gian sinh tổng hợp phytase từ chủng vi khuẩn

Kết quả cho thấy có sự sai khác rất ý nghĩa về hoạt tính enzyme phytase thu được từ các chủng vi khuẩn *B. subtilis* thay đổi theo thời gian ủ ở nhiệt độ nhất định 37⁰C. Tất cả 7 chủng vi khuẩn được tuyển chọn cho khả năng sản xuất phytase có hoạt tính cao nhất ở thời gian ủ là 36h. *B. subtilis* Ba 58 sản sinh phytase có hoạt tính cao nhất (328.20 ± 9,34 U/g) sau khi được ủ 36h ở 37⁰C ở cùng mật độ 10⁷CFU/mL; khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê với những chủng vi khuẩn còn lại (P<0.05) (Bảng 3.2). Sau thời gian ủ 48h, hoạt lực phytase được giảm dần khi gia tăng thời gian ủ đến 72h trong thí nghiệm.

Tương tự, tùy theo nhóm vi sinh vật cũng như vi khuẩn cũng tùy vào mỗi giống và loài ảnh hưởng đến năng suất và hoạt tính của phytase (Pandeyvàctv.,2001). Như vậy, nghiên cứu và sản xuất phytase từ vi sinh vật và điều kiện sinh tổng hợp phytase tốt nhất cũng như bảo quản hoạt tính phytase để thành một sản phẩm thương mại phải còn nhiều nghiên cứu nữa. Kết quả nghiên cứu này là tiền đề giúp cho những nghiên cứu tiếp theo để sinh phytase cao như áp

dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen giống như một số nghiên cứu từ vi sinh vật. Ở vi khuẩn *B. subtilis* tổng hợp phytase 9-15U/mg (Kerovuo và ctv., 1998; Greiner và ctv., 2007b); *B. subtilis* (natto) sản xuất 8,7 U phytase/mg (Shimizu, 1992), *Bacillus* sp. DS 11 đạt phytase khoảng 20 U.mg⁻¹ (Kim và ctv., 1998). Thêm vào đó, hoạt tính phytase trong nghiên cứu từ nấm *A. fumigatus* và *A. terreus* tương ứng là 23 và 198 U.mg⁻¹ (Wyss và ctv., 1999; Greiner và ctv., 2009) và loài *E. coli* sản xuất 50 - 811 U.mg⁻¹ (Konietzny và Greiner, 2002), 1210 U.mg⁻¹ đối với *Candida krusei* (Quan và ctv., 2002), 2344-3960 U.mg⁻¹ từ *Yersinia* spp. (Huang và ctv., 2008).

Bảng 3.2. Hoạt tính phytase (U/g) sản xuất từ các chủng *B. subtilis* ở thời gian ủ khác nhau

Chủng <i>B. subtilis</i>	Hoạt tính enzyme phytase (U/g) ± SD				
	24	36h	48h	60h	72h
Ba 58	179,53 ^c _x ± 3,91	328,20 ^e _y ± 9,34	269,70 ^d _z ± 2,69	184,50 ^b _y ± 5,20	139,17 ^a _y ± 6,51
Ba 64	189,00 ^b _{wx} ± 9,08	287,20 ^d _x ± 12,40	244,23 ^c _y ± 8,56	200,83 ^b _z ± 9,26	136,30 ^a _y ± 6,02
Ba 82	173,83 ^c _w ± 5,78	239,30 ^d _w ± 8,15	180,76 ^c _w ± 6,04	155,33 ^b _x ± 7,84	136,90 ^a _y ± 5,96
Ba 24	172,70 ^c _w ± 6,06	274,53 ^c _x ± 8,06	203,33 ^d _x ± 7,78	158,17 ^b _x ± 3,68	126,30 ^a _x ± 4,49
Ba 85	118,17 ^b _v ± 4,63	190,50 ^d _v ± 7,25	150,07 ^c _v ± 7,71	115,70 ^b _w ± 6,66	103,43 ^a _w ± 5,54
Bs 24	121,77 ^c _v ± 7,59	188,97 ^e _v ± 8,85	142,87 ^d _v ± 7,39	96,50 ^b _v ± 5,93	72,83 ^a _v ± 2,73
Bs14	91,50 ^b _u ± 7,45	143,10 ^d _u ± 4,59	118,30 ^c _u ± 5,17	83,70 ^b _u ± 5,00	57,83 ^a _u ± 4,59

Trong cùng một hàng, các giá trị trung bình có kí tự (a, b, c, d, e) có sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,05$); trong khi đó, trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự (u, v, w, x, y, z) có sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,05$).

Khảo sát độ bền của hoạt lực phytase ảnh hưởng theo nhiệt độ

Tính ổn định nhiệt độ enzyme là một vấn đề đặc biệt quan trọng. Ở các nhà máy, thức ăn viên thường được thực hiện ở nhiệt độ từ 60 đến 95°C. Phytase được tiếp xúc với nhiệt độ làm thức ăn viên cho một khoảng thời gian trong khoảng giây đến vài phút. Thêm vào đó, phytase được áp dụng phương pháp phun vào thức ăn viên hoặc bằng chất hóa học bao phủ của phytase nhằm hạn chế việc ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme, có thể duy trì trong quá trình bảo quản lâu dài hoặc vận chuyển ở nhiệt độ môi trường bên ngoài. Bên cạnh đó, tính ổn định enzyme dựa vào đặc tính của vi sinh vật. Hầu hết các phytase từ các thực vật sẽ bất hoạt ở nhiệt độ trên 70°C trong vòng vài phút, trong khi hầu hết các vi khuẩn tương ứng giữ lại đáng kể hoạt tính enzyme trong thời gian dài.

Bảng 3.3 Hoạt tính phytase (U/g) sản xuất từ các chủng *B. subtilis* ở nhiệt độ khác nhau

Chủng <i>B. subtilis</i>	Hoạt tính enzyme phytase (U/g) ± SD				
	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C
Ba 58	116,23 ^a _{wx} ± 6,92	337,67 ^c _z ± 26,35	338,50 ^c _x ± 37,81	325,47 ^c _z ± 25,66	183,87 ^b _y ± 16,99
Ba 64	122,67 ^a _x ± 12,22	266,73 ^d _y ± 11,32	277,30 ^d _w ± 9,35	200,83 ^c _x ± 9,26	136,30 ^a _x ± 6,02
Ba 82	173,83 ^b _z ± 5,78	239,30 ^c _x ± 8,15	256,97 ^c _w ± 25,52	154,10 ^b _w ± 15,25	51,63 ^a _w ± 9,78
Ba 24	115,57 ^a _{wx} ± 8,27	274,53 ^d _y ± 8,06	203,33 ^c _v ± 7,78	158,17 ^b _w ± 3,68	126,30 ^a _x ± 4,49
Ba 85	152,13 ^b _y ± 4,71	206,80 ^c _w ± 14,11	252,63 ^d _w ± 10,07	275,17 ^e _y ± 12,20	57,97 ^a _w ± 16,24
Bs 24	98,43 ^b _{wv} ± 14,42	192,73 ^c _w ± 10,37	254,20 ^d _w ± 11,31	267,10 ^d _y ± 11,31	64,90 ^a _w ± 6,25
Bs14	84,10 ^b _v ± 16,63	155,17 ^c _v ± 8,24	206,27 ^d _v ± 16,96	68,60 ^b _v ± 9,82	23,87 ^a _v ± 4,62

Trong cùng một hàng, các giá trị trung bình có kí tự (a, b, c, d, e) có sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,05$); trong khi đó, trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự (v, w, x, y, z) có sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,05$).

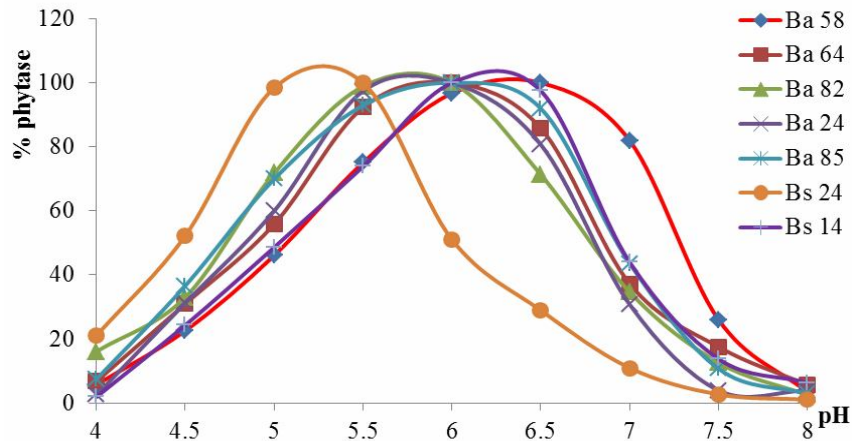
Kết quả thí nghiệm cho thấy, hoạt tính phytase được sản xuất chẳng những phụ thuộc vào giống, loài vi sinh vật mà còn có điều kiện bởi nhiệt độ. Trong thí nghiệm, nhiệt độ tối ưu cho tính bền của hoạt tính phytase ảnh hưởng bởi từng chủng vi khuẩn *B. subtilis* khác nhau dao động từ 40 đến 60°C (Bảng 3.3). Rõ ràng, chủng vi khuẩn *B. subtilis* Bs 58 thu nhận phytase có độ bền chịu nhiệt tốt nhất từ 40°C đến 60°C (333,87 ± 27,12 U/g); kế đến là *B. subtilis* Bs 24 bền ở nhiệt độ 50 – 60°C (260,65 ± 12,33U/g); *B. subtilis* Ba 64 và Ba 82 (tương ứng

272,02 ± 10,94 U/g và 248,13 ± 19,51 U/g) bền ở nhiệt độ 40 – 50⁰C; những chủng vi khuẩn còn lại có khả năng thu nhận phytase có độ bền ở nhiệt độ 50⁰C, ngoại trừ *B. subtilis* Ba 24 thấp nhất ở nhiệt độ 40⁰C. Sau khi gia tăng nhiệt độ đến 70⁰C, hoạt tính phytase hoàn toàn giảm đột ngột từ 11,6 đến 54,3%.

Hoạt tính phytase đạt cao nhất từ *B. subtilis* khoảng 9-15U/mg duy trì ở 55-60⁰C (Kerovuo và ctv., 1998; Greiner và ctv., 2007); *B. subtilis* MD2 phytase ở 67-73⁰C (Thi và ctv.,2010) và *Bacillus* sp. DS11 phytase ở 70⁰C (Kim và ctv.,1998). Tuy nhiên, nhiệt độ tối ưu cho hoạt lực phytase được khảo sát ở vi khuẩn *Klebsiella aerogenes* at 60-70⁰C (Tambe và ctv.,1994); nấm men *Schwanniomyces castelii* ở 77⁰C (Segueilha và ctv.,1992) và *Pichia* sp. ở 70-80⁰C (Nakamura, 2000). Các phytases chịu đựng nhiệt độ cao cho đến nay đã được phân lập từ *Pichia anomala* (Vohra và Satyanarayana, 2003), *S. castelii* (Segueilha và ctv., 1992), *A. fumigatus* (Pasamontes và ctv., 1997) và *Lactobacillus sanfranciscensis* (De Angelis và ctv., 2003). Phytase của *P. anomalacó* khả năng chịu đựng được 30 giờ ở 70⁰C. Hoạt tính enzyme từ *A. fumigatus* bị mất chỉ có 10% khi tiếp xúc trong ở 90⁰C trong 20 phút (Wyss và ctv., 1999). Tuy nhiên, sự ổn định của enzyme này phụ thuộc rất nhiều vào sự hiện diện của Ca⁺².

Khảo sát độ bền của hoạt lực phytase ảnh hưởng theo pH

Thí nghiệm chứng minh hoạt lực phytase phụ thuộc vào mỗi chủng *B. subtilis* mà có mức pH tối ưu khác nhau. Mức pH tối ưu cho độ bền hoạt tính phytase từ 5,5 đến 6,0 thu nhận từ chủng vi khuẩn *B. subtilis* Ba 64, Ba 82 và Ba 24 (92,3 đến 100% hoạt tính phytase); kể đến chủng *B. subtilis* Ba 58 và Bs 14 thu nhận phytase có độ bền ở pH 6,0 – 6,5; *B. subtilis* Bs 24 có khả năng sinh tổng hợp phytase ở pH 5,0 – 5,5; riêng *B. subtilis* Ba 85 tổng hợp phytase ngoại bào ở phổ pH rộng hơn từ 5,5 đến 6,5. Tất cả các chủng *B. subtilis* giảm độ bền hoạt lực phytase ở pH dưới 5,0 và lớn hơn 7,0 (Hình 3.1).



Hình 3.1 Ảnh hưởng pH đến hoạt tính phytase từ các chủng *B. subtilis*.

Giống *Bacillus* và *Enterobacter* cũng như một số thực vật, phytase có điều kiện pH tối ưu trong khoảng 4,0-6,0 (Konietzny và Greiner, 2002). Những nghiên cứu trước đây cho thấy pH tối ưu là 6,5 ở vi khuẩn *B. subtilis* N-77 (Shimizu, 1992), pH 6-7 từ *B. subtilis* MD2 (Thi và ctv., 2010), pH 7,0 từ *B. subtilis* VTT E-68013 (Kerovuo và ctv., 1998) và *Bacillus* sp. DS11 có khả năng sản sinh phytase cao nhất ở pH dao động từ 4,0 đến 8,0 (Kim và ctv., 1998). Ngoài ra, những vi sinh vật khác như *Selenomonas ruminantium* JY35, pH 4,0-5,5 (Yanke và ctv., 1999); *Klebsiella aerogenes* ở pH 4,5 và 5,2 (Tambe và ctv., 1994) và *Aspergillus* sp. ở pH 4,5 (Greiner và ctv., 2009).

Tóm lại, ở cùng môi trường bán rắn để sinh tổng hợp phytase với những điều kiện tối ưu như thời gian ủ (36h), nhiệt độ (40-60⁰C) và pH (5,0 – 6,5) cho kết quả enzyme phytase có hoạt tính cao ở 7 chủng vi khuẩn *B. subtilis*. Trong đó, chủng vi khuẩn đạt cao nhất là *B. subtilis* Ba 58. Ngoài ra, duy trì hoạt lực enzyme phytase ổn định có sự góp phần của ion Ca²⁺.

Khảo sát độ bền của hoạt lực phytase ảnh hưởng theo Ca^{2+}

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của ion Ca^{2+} đến khả năng sinh tổng hợp enzyme phytase của chủng Ba58. Ion kim loại Ca^{2+} đóng vai trò quan trọng đối với việc ổn định hoạt độ enzyme phytase của *Bacillus* (Kim và ctv., 1998). Kết quả từ Bảng 3.4 cho thấy, hoạt độ enzyme phytase cao nhất ở nồng độ ion Ca^{2+} được bổ sung là 0,35%, cụ thể là $365,33 \pm 4,34$ UI/g, kế tiếp là nồng độ 0,3% ($313,33 \pm 6,67$ UI/g) và 0,4% ($265,33 \pm 3,33$ UI/g). Kết quả xử lý thống kê cho thấy, hoạt độ enzyme phytase có sự khác biệt rất có ý nghĩa giữa các nồng độ ion Ca^{2+} khác nhau trong cùng thí nghiệm ($P < 0,01$).

Bảng 3.4. Kết quả biến thiên hoạt độ enzym phytase theo nồng độ Ca^{2+}

Nồng độ Ca^{2+} (%, w/w)	HD enzyme phytase (UI/g CT)	Nồng độ Ca^{2+} (%, w/w)	HD enzyme phytase (UI/g CT)
0,10	$104,67^1 \pm 2,33$	0,35	$365,33^a \pm 4,34$
0,15	$132,67^h \pm 1,00$	0,40	$265,33^c \pm 3,33$
0,20	$203,33^e \pm 5,67$	0,45	$183,33^f \pm 1,34$
0,25	$236,67^d \pm 9,00$	0,50	$148,67^s \pm 1,67$
0,30	$313,33^b \pm 6,67$		

Số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại \pm SD. Các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,01$)

Tùy vào đặc điểm sinh lý sinh hóa của mỗi loại vi sinh vật mà nhu cầu Ca^{2+} khác nhau. Kết quả thí nghiệm cho thấy sau khi hoạt độ phytase đạt cực đại ở nồng độ Ca^{2+} vào môi trường là 0,35%, nồng độ ion Ca^{2+} tăng dần thì hoạt độ phytase lại có xu hướng giảm, điều này có lẽ bởi nồng độ ion Ca^{2+} đã bão hòa và sẽ ức chế quá trình sinh tổng hợp enzyme của *Bacillus*.

KẾT LUẬN

Như vậy, kết quả thí nghiệm chứng minh hoạt tính phytase phụ thuộc vào mỗi chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* mà các điều kiện ảnh hưởng (nhiệt độ, pH, ion kim loại) thay đổi. Những yếu tố tối ưu nhằm thu nhận phytase cao như: (1) thời gian ủ là 36 giờ; (2) nhiệt độ dao động từ 40°C đến 60°C và pH tối ưu (từ 5,5 – 6,5) và 0,35% nồng độ ion Ca^{2+} ở vi khuẩn *B. subtilis* Ba 58.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adeola O. and Cowieson A.J., 2011. Board-invited review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve non ruminant animal production. *Journal of Animal Science*, in press.
- Cao L., Wang W., Yang C., Yang Y., Diana J., Yakupitiyage A., Luo Z. and Li D., 2007. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (4): 497–507.
- Fiske, C.H. and Subbarow Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66: 375-400.
- Greiner, R., Gomes da Silva, L. and Couri S., 2009. Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9. *Brazilian Journal of Microbiology*
- Greiner, R. and Farouk, A., 2007^a. Purification and characterisation of a bacterial phytase whose outstanding properties make it exceptionally useful as a feed supplement. *The Protein Journal* 26, 467–474.
- Greiner, R., Lim, B.L., Cheng, C. and Carlsson, N.G., 2007^b. Pathway of phytate dephosphorylation by β -propeller phytases of different origin. *Canadian Journal of Microbiology* 53, 488–495.
- Greiner R. and Konietzny U., 2006. Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology* 44: 125–140.

- Greiner R., Konietzny U. and Jany K.D., 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303: 107-113.
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkinen, N. and Apajalahti, J., 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2079–2085.
- Ketola G.H., 1994. Use enzyme in diets of trout to reduce environmental discharges of phosphorus. *Aquaculture* 94: 94–100.
- Kim, Y.-O., Kim, H.-K., Bae, K.-S., Yu, J.-H. and Oh, T.-K., 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 2–7.
- JanneKerovuo,MarkoLauraeus,PaiviNurmien,NisseKalkkinenand Juha Apajalahti, 1998. *Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from Bacillus subtilis*, Applied and Enviromental Microbiology, Vol.64, No.6, p2079-2085.
- Kumar V., Sinha A.K., Makkar H.P.S., Boeck G.D. and Becker K., 2011. Phytate and phytase in fish nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, in press.
- Shimizu, M. (1992) Purifi cation and characterization of a phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 56, 1266–1269.
- Tambe, S.M., Kaklij, G.S., Keklar, S.M. and Parekh, L.J. (1994) Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: evidence for unusually small active enzyme peptide. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77, 23–27.
- Tambe, S.M., Kaklij, G.S., Keklar, S.M. and Parekh, L.J. (1994) Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: evidence for unusually small active enzyme peptide. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77, 23–27.