

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG VÀ CÁC ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY BÈ MẶT TẠO SINH KHỐI CHỨA ENZYME PHYTASE CÓ HOẠT LỰC CAO TỪ *ASPERGILUS NIGER* YD

STUDY ON MEDIA COMPOSITION AND CONDITIONS OF SALE SOLID FERMENTATION SYNTHESIZE HIGH ACTIVITY PHYTASE FROM *ASPERGILUS NIGER* YD

Phạm Duy Hải*, Nguyễn Văn Nguyên, Trần Văn Khanh
Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản II
Email: haipd.ria2@mard.gov.vn

ABSTRACT

Phytase supplementation has been found to increase not only the growth rate of onogastric animals but also the efficiency of phosphate utilization in feeds, which significantly reduces phosphorus excretion and the chances of environmental pollution. Thus, the objectives of this study were to optimize medium composition and conditions of fermentation semi-solid state for extracellular phytase by *Aspergillus niger* YD with the aim to increase yields to make it economical as a commercial product. With the experimental results achieved, medium composition include: corn starch (73%) and soybean meal (24.44%); and fermentation conditions optimum such as: temperature is 37°C, fermentation time is 5 days and relative humidity of media is 70%. With these parameters in both surveys, along and other parameters has been studied before, the extracellular phytase activity of fermentation was 917.40 ± 13.48 U/g.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, với cách tiếp cận hiện đại, việc ứng dụng công nghệ sinh học để nâng cao chất lượng, hiệu quả sản phẩm, chất lượng môi trường trong nuôi trồng thủy sản là hướng đi chủ đạo, mang tính khoa học và có ý nghĩa rất lớn đến việc phát triển bền vững. Công nghệ enzyme được xem như là phương án thích hợp, tham gia vào việc giải quyết, nâng cao hiệu quả thức ăn và giảm thiểu ô nhiễm môi trường từ hoạt động nuôi thủy sản. Nhiều nghiên cứu về vai trò của enzyme tiêu hóa như lipase, protease, amylase và phytase bổ sung vào thức ăn vật nuôi thủy sản. Đặc biệt trong các enzyme trên, phytase là enzyme ít được nghiên cứu nhất mặc dù rất quan trọng. Phytase là một enzym có thể giải phóng phytate được đính phosphor (P) để sử dụng trong đường tiêu hóa của vật nuôi dạ dày đơn. Bổ sung phytase vào thức ăn vật nuôi có thể làm giảm nhu cầu cung cấp P vô cơ và giảm thấp sự bài tiết P vào trong phân, từ đó hạn chế được ô nhiễm P vào trong đất và trong nước ngầm. Như vậy, sử dụng Phytase giúp bảo vệ môi trường, nâng cao hiệu quả kinh tế trong phát triển chăn nuôi, nuôi trồng thủy sản. Trần N.T. Kim & Lê T. Hùng (2007) đã khảo sát ảnh hưởng của phytase lên tăng trưởng và hiệu quả sử dụng thức ăn của cá basa. Tuy nhiên nghiên cứu chưa xác định được hiệu quả kinh tế và và liều lượng tối ưu khi sử dụng phytase. Từ các nghiên cứu trên và các nghiên cứu tại nước ngoài một số đặc tính của phytase đã được nghiên cứu tỉ mỉ hơn. pH tối ưu của phytase dao động từ 2,2-8. Hầu hết các phytase từ vi sinh vật, điển hình phytase có nguồn gốc từ nấm có pH tối ưu ở khoảng 4,5-5,6. Đặc biệt, khác với hầu hết phytase từ nấm, phytase từ *A.fumigatus* có dải pH tối ưu từ 4,0-7,3 (còn giữ được ít nhất 80% hoạt tính). Một vài phytase từ vi khuẩn, đặc biệt từ các loài *Bacillus* có pH tối ưu từ 6,5-7,5... Nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của các phytase dao động từ 45-75°C. Các nghiên cứu tạo sản phẩm thương mại đã hướng đến sản xuất các sản phẩm có tính chịu nhiệt cao hơn. Tuy nhiên, hoạt độ giảm và thời gian chịu nhiệt cần được khống chế. Cheng & Hardy (2002) cho rằng phytase vi sinh vật có khả năng làm tăng cường sử dụng phospho hữu dụng trong nguyên liệu bã nành, cùng với quan điểm này, tuy nhiên Gatlin, Barrows (2006) cho rằng phytase rất dễ bị mất tác dụng dưới điều kiện nhiệt độ cao của quá trình ép đùn và vì vậy cần chú ý xử lý vấn đề này khi đưa vào thức ăn cho cá.

Ngoài ra, với kết quả bước đầu nghiên cứu tạo qui trình sản xuất phytase từ *Aspergillus niger* (*Asp.niger*) từ đề tài cấp Bộ NN&PTNT: “*Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học giàu enzyme để bổ sung, nâng cao hiệu quả sử dụng thức ăn nuôi cá Tra (Pangasianodon hypophthalmus)*” do TS. Nguyễn Văn Nguyễn làm chủ nhiệm được nghiệm thu vào 2009, nhóm thực hiện tiến hành hoàn thiện một số thành phần môi trường và điều kiện lên men bán rắn với công suất 80 - 100kg/mê nhằm nâng cao hoạt độ phytase hơn nữa để tạo ra hỗn hợp chế phẩm đa enzyme bổ sung vào thức ăn nuôi thủy sản.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng *Aspergillus niger* (*Asp.niger*)

Chủng *Asp.niger* nuôi cấy trên môi trường PDA ở 37°C, sau 120 giờ thu bào tử bằng cách bổ sung thêm nước có chứa 0,1% Tween 80, pha loãng đạt 2×10^7 bào tử/ml.

Thành phần hỗn hợp dung dịch khoáng (dùng bổ sung cho 1 kg môi trường lên men) bao gồm: KCl (2,5g); pepton (0,9g); MgSO₄·7H₂O (7,5g); KH₂PO₄ (5,0g); CaCl₂ (10,0g).

Thành phần nguyên liệu dùng làm môi trường lên men bán rắn: Cám gạo, bột khoai mì, bột đậu nành đã được trích ly dầu, bột gạo và bột bắp dùng trong nghiên cứu khảo sát thành phần môi trường dinh dưỡng lên men bán rắn với chủng *A.niger* để sinh tổng hợp phytase.

Phương pháp nghiên cứu

Dựa trên một phần kết quả nghiên cứu của đề tài “*Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học giàu enzyme để bổ sung, nâng cao hiệu quả sử dụng thức ăn nuôi cá Tra (Pangasianodon hypophthalmus)*” do TS. Nguyễn Văn Nguyễn làm chủ nhiệm được nghiệm thu vào 2009, nhóm thực hiện tiếp tục nghiên cứu hoàn thiện môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy để thu được hoạt độ enzyme phytase cao nhất và ứng dụng quy trình nuôi cấy với qui mô 80-100 kg/mê.

Thí nghiệm 1 (TN1): Khảo sát và lựa chọn môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp phytase

Trong phần khảo sát thành phần dinh dưỡng môi trường lên men bán rắn tập trung vào khảo sát nguồn cung cấp carbon, đồng thời những thành phần nguyên liệu đó có thể làm chất cảm ứng sinh tổng hợp phytase từ *Asp.niger*. Với 5 loại cơ chất được khảo sát: bột bắp, bột khoai mì, cám gạo, bột gạo và bột đậu nành. Quá trình lên men bán rắn thực hiện trong thời gian nuôi cấy 5 ngày, nhiệt độ 30°C, độ ẩm môi trường 60% và thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Thí nghiệm 2 (TN2): Khảo sát và lựa chọn tỷ lệ hỗn hợp thành phần dinh dưỡng ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp phytase

Khi ta có kết quả khảo sát thành phần cơ chất và chọn lựa được thành phần hỗn hợp cơ chất làm môi trường lên men, ta tiếp tục thực hiện khảo sát các tỷ lệ hỗn hợp để chọn lựa ra tỷ lệ thích hợp nhất làm nguồn cơ chất. Điều kiện lên men giống như ở TN1, tuy nhiên số lần lặp lại là 5 lần.

Thí nghiệm 3 (TN3): Khảo sát các nhiệt độ và thời gian lên men ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp phytase

Khi đã xác định được thành phần môi trường lên men bao gồm: nguồn carbon, nguồn nitơ và môi trường khoáng với kết quả khảo sát ở mục TN 1 và TN 2, nhóm thực hiện tiếp tục khảo sát điều kiện lên men với thời gian lên men từ 2 – 7 ngày và nhiệt độ lên men từ 30 – 45°C.

Thí nghiệm 4: Khảo sát và lựa chọn độ ẩm môi trường lên men sinh phytase

Khi đã có kết quả khảo sát ở các thí nghiệm trên thì tiếp tục khảo sát độ ẩm từ 55% đến 75% của môi trường lên men, vì điều kiện này ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh tổng hợp phytase từ chủng *Asp.niger*.

Phương pháp phân tích

Phương pháp phân tích hoạt độ phytase: Theo TCVN 8678:2011 (ISO 30024:2009).

Màu sắc, mùi vị	:	Theo TCVN 1532-1993
Độ ẩm	:	Theo TCVN 4329 – 2007
<i>Salmonella</i>	:	Theo TCVN 4829-2001
Độ tổ Aflatoxin	:	LC/MS/MS
Côn trùng sống	:	Theo TCVN 1540-86
Xác định tổng nấm men, nấm mốc	:	Theo TCVN 5750:1993.

Ngoài ra, để xác định độ ẩm nhanh bằng cân đo độ ẩm hồng ngoại MX-50 - Nhật Bản.

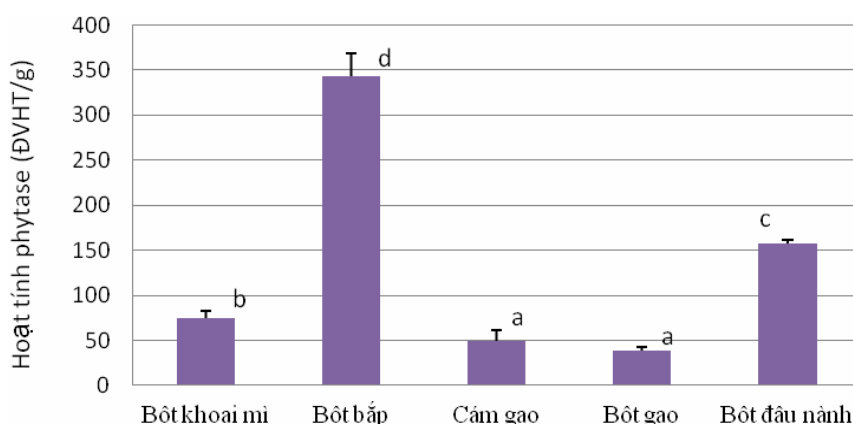
Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 15.0 và Excel 2007 để đánh giá sự khác nhau giữa các nghiệm thức ($p < 0,05$).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme phytase

Khảo sát ở 5 nguồn cơ chất (TN1) là bột bắp, bột khoai mì, cám gạo, bột gạo và bột đậu nành. Sau 5 ngày lấy mẫu xác định hoạt tính enzyme, mỗi mẫu thí nghiệm lặp lại 3 lần, hoạt tính trung bình được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng nguồn dưỡng chất đến hoạt độ phytase

Từ kết quả thí nghiệm cho thấy các nguồn cơ chất như đều được chủng *Asp.niger* sử dụng: bột khoai mì, cám gạo, bột gạo nhưng cho hoạt tính enzyme không cao chỉ trong khoảng 38 – 74 (ĐVHT/g), trong đó thì cám gạo và bột gạo không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Riêng bột bắp cho hoạt tính enzyme cao hơn hẳn đến $343,54 \pm 40,94$ (ĐVHT/g) và bột đậu nành ($157,42 \pm 4,28$ ĐVHT/g). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Trần Thị Tuyết và cộng sự (2005), đối với chủng *Asp.niger* NRRL-363, phương pháp lên men bề mặt, khảo sát ba nguồn cơ chất khác nhau: cám gạo, bột mì, bột đậu nành và bột bắp. Kết quả là bột đậu nành và bột bắp đã cho thấy hoạt tính phytase cao nhất. Theo Ebune và cộng sự (1995) đã nghiên cứu sản xuất phytase của chủng *Asp.ficum* trên môi trường rắn có chứa bột cải dầu là chất cảm ứng. Kết quả cho thấy khi bổ sung bột cải dầu 5,2% đã làm tăng sản lượng phytase.

Qua kết quả thí nghiệm cho thấy nguồn cung cấp nguồn dưỡng chất cũng như là chất cảm ứng từ bột bắp và bột đậu nành đã cho hoạt tính enzyme cao hơn hẳn, do đó dự án chọn hỗn hợp

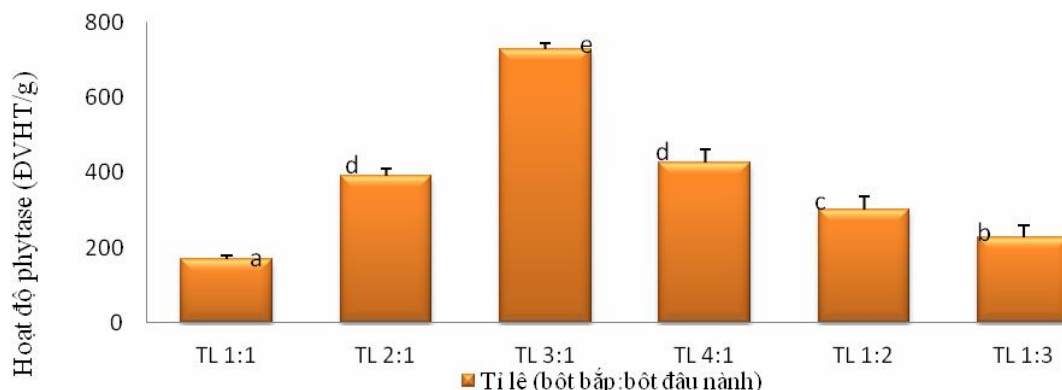
bột bắp và bột đậu nành làm nguồn cơ chất tối ưu để thu nhận enzyme phytase từ chủng *Asp.niger* đang khảo sát làm các nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả lựa chọn tỷ lệ hỗn hợp thành phần dinh dưỡng

Với phần khảo sát trên *TNI* đã lựa chọn ra hỗn hợp dinh dưỡng là bột bắp và bột đậu nành làm nguồn dinh dưỡng cung cấp nguồn carbon và một phần nguồn nitơ (vì nguồn cung cấp nitơ chính cho nghiên cứu là này peptone), đồng thời cũng làm chất cảm ứng để sinh tổng hợp phytase trong môi trường lên men bán rắn với độ ẩm ban đầu là 60%. Khảo sát gồm 5 tỷ lệ thành phần hỗn hợp khác nhau và kết quả được thể hiện ở hình 3 như sau: tỷ lệ 1:1 sinh ra phytase thấp nhất ($169,12 \pm 9,17$ ĐVHT/g), tuy nhiên với tỷ lệ bột bắp : bột đậu nành là 3:1 có khả năng sinh enzyme phytase từ chủng *Asp.niger* cao nhất ($727,38 \pm 17,97$ ĐVHT/g), còn các tỷ lệ khác thì hoạt độ phytase nằm trong khoảng $225 \div 427$ ĐVHT/g. Đối với nghiên cứu của Vats và cộng sự (2004) cho rằng chủng nấm *Asp.niger var teigham* thì nguồn cacbon thích hợp nhất để sản xuất phytase lại là glucose kết hợp với tinh bột (2%).

Với kết quả nghiên cứu này, dự án đã chọn môi trường dinh dưỡng cho lên men bán rắn với chủng *Asp.niger* là hỗn hợp gồm: tỷ lệ bột bắp : bột đậu nành là 3:1, thành phần peptone và môi trường khoáng có thành phần phosphor để tăng khả năng sinh tổng hợp phytase.

+ Bột bắp	:	73,32%
+ Bột đậu nành	:	24,44%
+ Thành phần peptone và khoáng	:	2,24%



Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ hỗn hợp (bột bắp:bột đậu nành) đến hoạt độ phytase

Các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp phytase

Thời gian và nhiệt độ lên men bán rắn với chủng *Asp.niger*

Thời gian lên men: Kết quả ảnh hưởng của thời gian đến sinh tổng hợp hoạt độ enzyme phytase được thể hiện trong bảng 1.

Theo kết quả khảo sát ở bảng 1 cho thấy mặc dù ở các môi trường có nhiệt độ nuôi cấy khác nhau thì thời gian cho hoạt tính enzyme phytase cao nhất đều là vào ngày thứ 5. Hoạt tính cao nhất khi nuôi cấy ở 30°C, 37°C, 40°C và 45°C lần lượt là $368,56 \pm 17,52$; $742,56 \pm 25,01$; $561,35 \pm 24,86$ và $465,41 \pm 36,34$ (ĐVHT/g). Theo Trần Thị Tuyết và cộng sự (2004) đối với chủng *Asp.niger* NRRL 363 khi nuôi cấy để sản xuất phytase bằng phương pháp lên men bề mặt trên môi trường cám mì thì thời gian đạt giá trị phytase cao nhất là 5 ngày và sau 8 ngày thì enzyme bị phân hủy hoàn toàn. Trong khi đó đối với chủng *Asp.niger* NCIM 563 năng suất phytase đạt mức 79,4 UI/g cao nhất lại ở ngày thứ 7. Đối với hầu hết phytase, sản lượng enzyme thu được có liên quan đến sự tăng sinh khối và sự giảm của axit phytic (Chelius và Wodzinski, 1994).

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến sinh tổng hợp phytase

Nhiệt độ (°C)	Thời gian nuôi cấy (ngày)					
	2	3	4	5	6	7
	Hoạt độ phytase (ĐVHT/g)					
30	59,63 ^b ± 8,08	145,86 ^a ± 7,76	287,14 ^b ± 15,09	368,56^a ± 17,52	385,23 ^a ± 25,02	365,42 ^a ± 17,33
37	86,41^c ± 6,61	289,42^c ± 6,18	521,38^c ± 36,11	742,56^d ± 25,01	721,32^c ± 15,95	729,14^c ± 28,35
40	55,64 ^b ± 6,60	187,42 ^b ± 9,74	268,38 ^{ab} ± 9,49	561,35^c ± 24,86	601,23 ^b ± 23,90	589,28 ^b ± 33,58
45	42,38 ^a ± 8,24	197,32 ^b ± 2,60	246,84 ^a ± 11,80	465,41^b ± 36,34	412,38 ^a ± 24,62	382,42 ^a ± 18,40

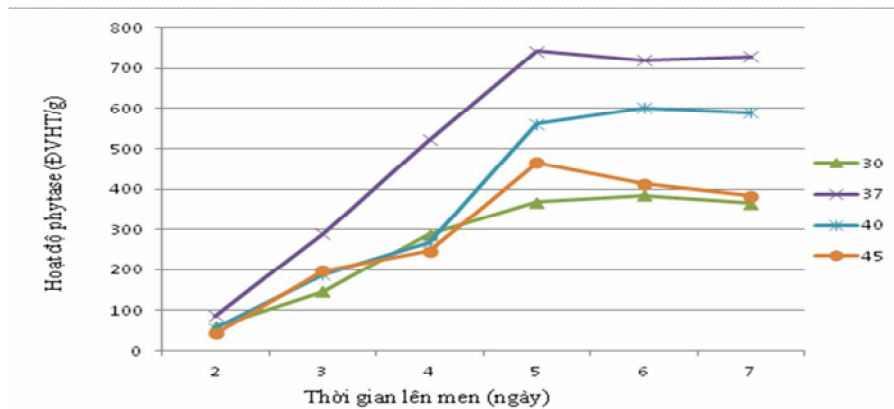
(Ghi chú: Các giá trị với mẫu tự khác nhau trong cùng một cột là khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$). Số liệu thể hiện là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, số lần lặp lại là 5)

Đối với chủng *Asp.niger* YD đang khảo sát, theo kết quả nghiên cứu thời gian cho hoạt tính enzyme cao nhất là ngày thứ 5, kết quả khảo sát là phù hợp với nghiên cứu trước cũng trên đối tượng là chủng *Asp.niger* này (được tiến hành ở phòng thí nghiệm Vi sinh công nghệ Dược), thời gian cho hoạt tính enzyme cao nhất cũng là 5 ngày.

So với các nghiên cứu trước ở các chủng *Asp.niger* khác thì thời gian cho hoạt tính cao nhất dài hơn khoảng ngày thứ 6 hoặc ngày thứ 7, sự khác biệt này là do với những chủng *Asp.niger* khác nhau thì khả năng sản sinh enzyme sẽ khác nhau, hơn nữa thời gian nuôi cấy còn phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy và các điều kiện khác như nhiệt độ, pH môi trường, v.v...

Như vậy, từ kết quả nghiên cứu, chọn ngày thứ 5 là ngày cho hoạt tính enzyme cao nhất để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Nhiệt độ lên men: Kết quả ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến sinh tổng hợp hoạt độ enzyme phytase được thể hiện ở hình 3.

**Hình 3. Kết quả ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh tổng hợp phytase**

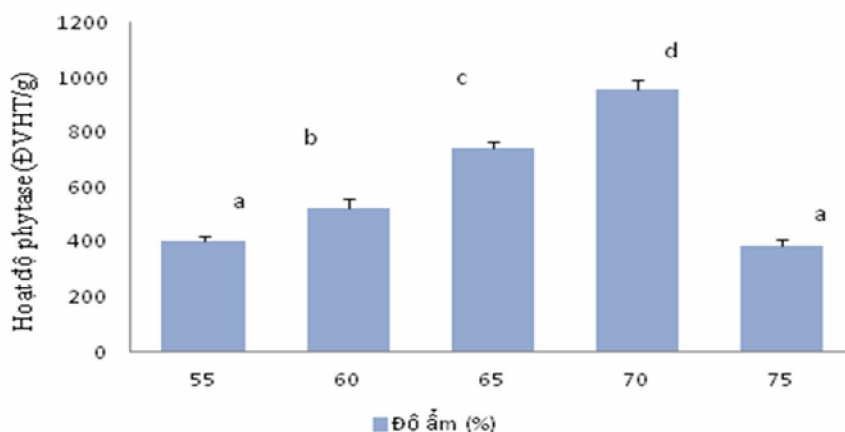
Hầu hết các VSV dùng trong sản xuất enzyme phytase là các VSV ưa nhiệt trung bình ngoại trừ các nấm ưa nhiệt như *T.lamiginosus*, *T.thermophilus*, *S.thermophile* (Wodzinski và Ullah, 1996). Nhiệt độ tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp phytase đối với hầu hết các vi sinh vật nằm trong khoảng từ 25 – 37°C (Narahara và cộng sự, 1982). Từ hai kết quả trên cho thấy ở nhiệt độ 37°C và thời gian lên men thích hợp để sinh tổng hợp enzyme phytase có hoạt tính cao nhất từ chủng *Asp.niger* là sau 5 ngày. Đối với chủng *Asp.niger* YD đang khảo sát thì nhiệt độ nuôi cấy tối ưu để thu nhận enzyme phytase là 37°C, kết quả này khá hợp lý vì nhiệt độ này nằm trong khoảng nhiệt độ tối ưu của các chủng vi sinh vật sản sinh phytase. Hơn nữa chủng *Asp.niger* YD đã được hoạt hóa ở 37°C, khi nuôi cấy ở cùng nhiệt độ này thì chúng có điều kiện thuận lợi để sinh trưởng và sinh enzyme.

Do đó, từ kết quả thí nghiệm có thể kết luận rằng nhiệt độ tối ưu nuôi cấy chủng *Asp.niger* đang khảo sát để thu nhận enzyme phytase là 37°C và chọn 37°C làm nhiệt độ nuôi cấy để tiến

hành các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả tương tác giữa 2 yếu tố nhiệt độ và thời gian lên men bán rắn với hỗn hợp (bột bắp + bột đậu nành) thấy rằng tại nhiệt độ 37⁰C và thời gian lên men 5 ngày với chủng *Asp.niger* YD khảo sát sinh tổng hợp phytase cao nhất: **742,56 ± 25,01 (ĐVHT/g)**.

Kết quả khảo sát độ ẩm của môi trường lên men đến sinh tổng hợp phytase

Kết quả khảo sát được thể hiện ở hình 4, khi khảo sát 5 dãy độ ẩm từ 55 ÷ 75% thấy rằng độ ẩm thấp hoặc quá cao (55 hoặc 75%) thì khả năng sinh tổng hợp phytase thấp có thể do điều kiện môi trường như thế đã ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của nấm mốc. Các tác giả của những nghiên cứu trước cho rằng độ ẩm môi trường lên men bán rắn đối với nấm mốc từ 60 – 70%, do đó kết quả khảo sát của dự án là phù hợp, khi hoạt độ phytase đạt mức 525 ÷ 954 ĐVHT/g. Tại độ ẩm 70% thì khả năng sinh tổng hợp phytase là cao nhất (**954,39 ± 34,94 ĐVHT/g**). Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường lên men đến hoạt độ phytase được thể hiện ở hình 5. Đối với lên men bán rắn, điều kiện quan trọng nhất vẫn là kiểm soát độ ẩm của cơ chất. Nếu độ ẩm đó phù hợp thì hệ sợi của nấm mốc sẽ phát triển nhanh chóng và sinh tổng hợp các sản phẩm mạnh (Pandey, Soccol và Mitchell, 2000). Còn độ ẩm nếu cao hơn độ ẩm tối ưu sẽ làm giảm sự xốp của môi trường, giảm sự vận chuyển oxy và tăng cường hình thành sợi nấm khí sinh. Tương tự như vậy, độ ẩm thấp hơn độ ẩm tối ưu dẫn đến làm giảm sự hoà tan của các chất dinh dưỡng trong cơ chất rắn.



Hình 4. Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường lên men đến hoạt độ phytase

Từ kết quả khảo sát về thành phần môi trường và điều kiện lên men bán rắn ở các mục trên dự án đã tiến hành lên men thực nghiệm với công suất là 80kg/m², kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả nghiên cứu thực nghiệm

Số lần lặp lại	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
Hoạt độ phytase (ĐVHT/g)	925,46	898,41	928,34	917,40 ± 13,48

Với kết quả này số so với số liệu khảo sát tại phòng thí nghiệm với công suất 2kg/m² thì đạt 96%, hiệu suất khi lên men thực nghiệm dạng pilot như thế là chấp nhận được.

KẾT LUẬN

Từ các thí nghiệm khảo sát về sự ảnh hưởng của môi trường và điều kiện lên men bề mặt sinh tổng hợp phytase từ *Asp.niger* này, đồng thời kết hợp kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Nguyễn và cộng sự (2009) đã xây dựng được quy trình lên men sinh tổng hợp phytase dạng pilot có công suất 80-100kg/m².

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al-Asheh S., Duvnjak Z. (1994), “The effect of surfactants on the phytase production and the reduction of the phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* during solid-state fermentation process”, *Biotechnol. Lett.* 1692, pp. 183-188.
- Cao L., Wang W., Yang C., Yang Y., Diana J., Yakupitiyage A., Luo Z. & Li D., 2007. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme And Microbial Technology* 40 (4): 497–507.
- Chi H., Tiller G.E., Dasouki M.J. (1999), “Multiple inositol polyphosphate phosphatase: evolution as a distinct group within the histidine phosphatase family and chromosomal localization of the human and mouse genes to chromosomes 10q23 and 19”, *Genomics* 56, pp. 324-336.
- Debnath D., Pal A.K. & Sahu N.P., 2005. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth and nutrient digestibility of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings. *Aquacult. Res.* 36: 180–187.
- Dharmasthiti S., Chalermponpaisarn S., Kiatiyajarn M., Chanpokapaiboon A., Klongsithidej Y., Techawiparut J. (2005), “Phytase production from *Pseudomonas putida* harbouring *Escherichia coli* appA”, *Process. Biochemist.* 40, pp. 789-793.
- Dvorakova J. (1998), “Phytase : Source, Preparation and Exploitation”, *Folia Microbiol.* 43, pp. 323-338.
- Ebune A., Al-Asheh S., Duvnjak Z. (1995), “Production of phytase during solid-state fermentation using *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 in canola meal”, *Biores. Technol.* 53, pp. 7-12.
- Gargova S., Sariyska M. (2003). *Effect of culture conditions on the biosynthesis of aspergillus niger phytase and acid phosphates.* *Enzyme and microbial technology* 32, pp.231-235.
- Han, Y. W., Gallagher, D. J. & Wilfred, A. G. (1987), Phytase production by *Aspergillus ficuum* on semi-solid substrate. *J. Ind. Microbiol.*, 2, 195-200.20
- Hardy, R.W., 2000, New developments in aquatic feed ingredients, and potential of enzyme supplements. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M.,
- Hidayat B. J., Eriksen N. T., Wiebe M. G. (2006). *Acid phosphatase production by aspergillus niger m402a in continuous flow culture.* *Fems microbiol lett* 254, pp. 324-331.
- Kim D. S., godber J. S., Kim H. R. (1999). *Culture condition for a new phytase- producing fungus.* *Biotechnology letters* 21, pp. 1077-1081.
- Konietzny U., Greiner R. (2002). *Molecular and catalytic properties of phytase-degrading enzymes (phytase).* *International journal of food science and technology* 37, pp. 791-812.
- Kumar V., Sinha A.K.,MakkarH.P.S., De BoeckG., BeckerK 2011. Phytate and phytase in fish nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.*
- Li X., Chi Z., Liu Z., Yan K., Li H. 2008. Phytase prodby a marine yeast *Kodamea ohmeri* BG3. *A Biochemistry and Biotechnology* 149 (2): 183–193.
- Liu B. L., Jong C. H., Tzeng Y. M. (1999). *Effect of immonbilization on ph and thermal stability of aspergillus ficuum phytase.* *Enzyme and microbial technology* 25, 517-521.
- Nakamura Y., Kukuvara H., Sano K. (2000), “Secreted phytase activities of yeast”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(4), pp. 841-844.
- Narahara H., Kodama Y., Yoshida T., Pichangkura S., Ueda R., Taguchi H. (1982), “Growth and enzyme production in a solid state fermentation culture of *Aspergillus oryzae*”, *J. Ferment Technol.* 60, pp. 311-319.
- Nwanna L.C., Fagbenro O.A. & Adeyo A.O., 2005. Effects of different treatments of dietary soybean meal and phytase on the growth and mineral deposition in African catfish *Clarias gariepinus*. *Journal Of Animal And Veterinary Advance* 4: 980-987.
- Nguyễn Văn Nguyễn, Phạm Duy Hải và cộng sự (2009), “*Nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học giàu enzyme bổ sung nâng cao hiệu quả sử dụng thức ăn nuôi cá tra*”, Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản II.

- Pandey A., Soccol C.R., Mitchell D.A. (2000a), "New developments in solid state fermentation. I- bioprocesses and products", *Process. Biochemist.* 35, pp. 1153-1169.
- Pandey A., Szakacs G., Soccol C.R., Rodriguez-Leon J.A., Soccol A.T. (2001), "Production, purification and properties of microbial phytases", *Bioresource Technol.* 7, pp. 203-214.
- Papagianni M., Nokes S.E., Filer K. (2001), "Submerged and solid state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance", *Food Technol. Biotechnol.* 39(4), pp. 319-326.
- Phromkunthong W. and Gabaudan J., 2006. Used of microbial phytase to replace inorganic phosphorus in sex-reversed red tilapia: 1 dose response. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 28 (4): 731-743.
- Tran Thi Tuyet, Nguyen Duy Long, Hoang Quoc Khanh (2005), "Production of phytase by *Aspergillus niger* NRRL 363", *Proceedings of Vietnam-Korea international symposium on Biotechnology and Bio-system engineering*, pp, 39-43.
- Uhlir H. (1998). *Industrial enzymes and their application*. A wiley interscience publication, pp. 192-193.
- Van Weerd J.H., Khalaf K.H., Aartsen E.J. & Tijssen P.A., 1999. Balance trials with African catfish *Clarias gariepinus* fed phytase-treated soybean meal-based diets. *Aquaculture Nutrition* 5: 135–142.
- Vats P., Banerjee U.C. (2004). *Production studies and catalytic properties of phytases*. *Enzyme and microbial technology* 35, pp. 3-14.
- Vats P., Sahoo D.K., Banerjee. (2004), "Production of phytase (myo-Inositolhexakisphosphate Phosphohydrolase) by *Aspergillus niger* van Teighem in Laboratory-Scale fermenter", *Biotechnol. Prog.* 20, pp. 737-743.
- Wodzinski R.J., Ullah A.H.J. (1996), "Phytase", *Adv. Appl. Microbiol.* 42, pp. 263-303.
- Vohra A., Satyanarayana T. (2002 a), "Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*", *Process Biochem.* 37, pp. 999-1004.
- Vohra A., Satyanarayana T. (2003), "Phytases : Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications", *Cri. Res. Biotechnol.* 23 (1), pp. 29-60.
- Volfova O., Dvorakova J., Hanzlikova A., Jandera A. (1994), "Phytase from *Aspergillus niger*", *Folia Microbiol.* 39, pp. 481-484.