

KHẢO SÁT MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY NẤM *Aspergillus fumigatus* ET3 ĐỂ TĂNG HIỆU SUẤT SẢN SINH PHYTASE

Nguyễn Văn Tính¹ và Nguyễn Thị Hà²

¹ Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Sư Phạm, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 01/08/2014

Ngày chấp nhận: 27/04/2015

Title:

Study of some culture conditions of *Aspergillus fumigatus* ET3 for high level of phytase production

Từ khóa:

Phytase ngoại bào, nấm *Aspergillus fumigatus*, phytate

Keywords:

Aspergillus fumigatus, extracellular phytase, phytate

ABSTRACT

Phytase is a group of enzymes that is able to release phosphorus from phytate so that it can be easily digested, so phytase is largely used in animal feed. *Aspergillus fumigatus* ET3 appeared to have high potential for phytase production. In this study, the growth conditions to improve the enzyme production of this new *A. fumigatus* ET3 were investigated. The result showed that wheat was a suitable substrate for biosynthesis of phytate from this fungus. Furthermore, optimum conditions for high phytase production from this species were pH 4, spore density about 10^8 /mL, incubation time of 2 days and incubation temperature of 35°C.

TÓM TẮT

Phytase là enzyme có khả năng giải phóng phosphorus từ phytate, khiến phosphorus trở nên dễ hấp thu nên được dùng phổ biến trong thức ăn gia súc. Trong nghiên cứu trước đó, chủng nấm *Aspergillus fumigatus* ET3 được xem có tiềm năng trong việc sản sinh enzyme phytase. Việc thiết lập được môi trường nuôi cấy thích hợp nhất để thu nhận hàm lượng phytase cao để hạ giá thành sản xuất enzyme từ chủng nấm mốc này là rất cần thiết. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng nấm mốc *Aspergillus fumigatus* ET3 với mật số bào tử chủng vào môi trường là 10^8 bào tử/mL, pH dung dịch khoáng bổ sung là 4 có khả năng sinh tổng hợp phytase cao nhất trên nguồn cơ chất là bột mì sau 2 ngày nuôi ở nhiệt độ môi trường là 35°C.

1 GIỚI THIỆU

Phytase là enzyme có khả năng phá vỡ các liên kết của phức hệ phytate không tiêu hoá được và giải phóng phosphorus, calcium và các chất dinh dưỡng khác (Debnath *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2007). Phytase giải phóng phosphorus bằng cách phân cắt liên kết của các gốc phosphate với inositol. Khi các liên kết này bị phá vỡ, các gốc phosphate cùng một số dưỡng chất khác như khoáng kim loại, amino acid, đạm và tinh bột ở dạng muối phytate khó hòa tan sẽ được giải phóng và trở nên dễ hấp thu. Đối với các loài động vật có cấu tạo dạ dày đơn giản như lợn, gia cầm, thỏ,

cá,... khả năng hấp thu phosphorus từ phytate rất thấp vì chúng thiếu phytase trong hệ tiêu hóa. Kết quả là một lượng lớn phytate trong thức ăn có nguồn gốc thực vật được thải ra trong phân, có thể làm ô nhiễm nghiêm trọng nguồn nước, đặc biệt là tầng nước mặt. Đồng thời lượng phosphorus này sẽ là nguồn dinh dưỡng cho vi khuẩn gây bệnh sống trong đất phát triển và phát tán trong nước gây ra hiện tượng phú dưỡng hóa (Mullaney *et al.*, 2000). Theo Nguyễn Thu Quyên *et al.* (2011) việc bổ sung phytase vào khẩu phần ăn cho gà Broiler có ảnh hưởng tích cực đến khả năng khoáng hóa xương cũng như cải thiện khả năng tiêu hóa

calcium, phosphorus của giống gà này. Ngoài ra, các dưỡng chất khác khi tạo phức với phytate cũng trở nên dễ tiêu hoá hơn, từ đó làm tăng giá trị dinh dưỡng của thức ăn và giảm ô nhiễm môi trường.

Việt Nam là một nước nông nghiệp có ngành chăn nuôi lớn nên nhu cầu về thức ăn gia súc rất cao. Do đó, việc bổ sung enzyme phytase vào thức ăn để giúp tiêu hóa tốt phytate là giải pháp hiệu quả cho các vấn đề trên. Các nghiên cứu gần đây cho thấy enzyme phytase từ *A. fumigatus* có nhiều đặc tính nổi trội phù hợp bổ sung vào thức ăn chăn nuôi như tính đặc hiệu với cơ chất rộng, pH tối ưu thấp ở 2,5 và 5,5, có khả năng hồi tính cao sau khi biến tính ở nhiệt độ cao (Pasamontes *et al.*, 1997; Wyss *et al.*, 1998). Thực tế, ở Việt Nam số lượng nghiên cứu về enzyme từ loài nấm mốc này còn hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp phytase của nấm *A. fumigatus* ET3 và thiết lập được môi trường nuôi cấy thích hợp nhất để thu nhận hàm lượng phytase cao.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Chủng nấm *A. fumigatus* ET3 được cung cấp từ phòng thí nghiệm Công nghệ Enzyme, viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

Nguồn cơ chất phytate: Bắp (giống N-1) (độ ẩm khoảng 14%), đậu nành (độ ẩm khoảng 14%) được mua ở chợ Xuân Khánh, bột mì nhãn hiệu Chia khóa đỏ (độ ẩm khoảng 14%) (Việt Nam).

Môi trường bán rắn (Arpana *et al.*, 2012) nuôi cấy *A. fumigatus* sinh tổng hợp phytase trong 1 túi nilon: 30 g cơ chất phytate, 15 g trấu, 25 mL dung dịch khoáng pH 5.5 với thành phần như sau: MgSO₄.7H₂O (0,1 g/L), KCl (0,5 g/L), FeSO₄ (0,01 g/L), MnSO₄ (0,01 g/L), NaCl (0,1 g/L), CaCl₂ (5 g/L). Sau khi đã cho dung dịch khoáng vào túi, đem khử trùng nhiệt ướt ở 121°C trong 20 phút.

Hóa chất dùng để xác định hoạt tính và định lượng protein: sodium phytate (C₆H₆Na₁₂O₂₄P₆H₂O) (Sigma), sulfuric acid (H₂SO₄), sodium acetate (Trung Quốc), L(+)-ascorbic acid (C₆H₈O₂) (Sigma). Dung dịch thuốc thử phosphate (ascorbic acid 2% (w/v) 5,28 g, dung dịch A 1 lít), Tricloro-acetic (TCA) 15% (Merck), thuốc thử Bradford (Sigma), ethanol, aceton.

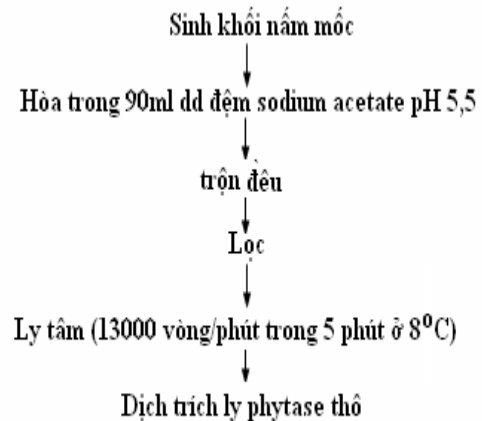
2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chuẩn bị mốc giống và môi trường nuôi cấy sinh tổng hợp phytase

A. fumigatus ET3 được nuôi trên đĩa petri với môi trường (potato-glucose agar) PGA, ủ ở nhiệt độ cao 45°C trong 2 ngày. Cho 10 mL nước cất vô trùng vào mỗi đĩa mốc giống sau đó hòa đều dịch bào tử, đếm mật số, chỉnh mật số bào tử phù hợp với từng thí nghiệm. Chùng 1 mL dung dịch bào tử nấm mốc vào túi nilon nhựa chứa 45 g môi trường bán rắn cơ bản đã khử trùng, bổ sung dung dịch khoáng với tỉ lệ 55,5% (w/w), ủ ở nhiệt độ khảo sát của các thí nghiệm. Sau đó thu sinh khối tươi sau từng thí nghiệm khảo sát.

2.2.2 Trích ly phytase thô từ sinh khối nấm mốc

Việc thu nhận phytase thô từ sinh khối nấm mốc được thực hiện theo quy trình như ở Hình 1.



Hình 1: Quy trình thu nhận phytase thô từ *A. fumigatus* ET3

2.2.3 Phương pháp xác định hoạt tính phytase theo phương pháp của Heinonen và Lahti (1981)

Lấy 30 µl dịch phytase thô cùng với 5 µl Ca²⁺ vào eppendorf. Ủ 20 phút ở 37°C. Sau đó cho 20 µl cơ chất vào mẫu thật (mẫu cần xác định hoạt tính) và 45 µl TCA 15% vào mẫu đối chứng. Tất cả các mẫu đều được ủ ở 55°C trong 60 phút. Cho tiếp tục 45 µl TCA vào mẫu thật và 20 µl cơ chất vào mẫu đối chứng. Bổ sung 1 mL nước cất vào mỗi ống eppendorf, rút hết toàn bộ dịch sau phản ứng trong ống cho vào mỗi ống nghiệm, cho tiếp 0,8 mL thuốc thử phosphate và 0,6 mL nước cất và ủ 30 phút.

Đo độ hấp thu ở bước sóng 880 nm. Từ đó, tính được lượng phosphate được giải phóng dựa vào đường chuẩn potassium phosphate.

Một đơn vị hoạt tính của phytase (U) được xác định như là 1 $\mu\text{mol P}$ vô cơ được giải phóng từ sodium phytate trong mỗi phút dưới điều kiện chuẩn (pH 5,5; nhiệt độ 55°C).

2.2.4 Khảo sát điều kiện môi trường nuôi cấy để nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp phytase của *A. fumigatus* ET3

Mục đích: Chọn được thời gian nuôi cấy, nguồn phytate, mật số bào tử, pH và nhiệt độ thích hợp bổ sung vào môi trường nuôi cấy để nấm mốc *A. fumigatus* ET3 sinh tổng hợp phytase cao nhất.

a. Khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy và cơ chất phytate

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu thừa số 2 nhân tố là thời gian nuôi được thay đổi với 5 mức độ: ngày 2, 3, 4, 5, 6 và 3 loại cơ chất là bột bắp, bột mì và bột đậu nành. TN 3 lần lặp lại. Gồm 15 nghiệm thức. Tổng cộng có 45 đơn vị thí nghiệm.

Nấm mốc được nuôi trên môi trường bán rắn với 3 loại cơ chất khác nhau, với mật số bào tử 10^9 bào tử/mL, pH môi trường 4, ở 45°C. Thu mẫu và xác định hoạt tính của phytase theo các thời gian khác nhau như đã bố trí.

b. Khảo sát sự ảnh hưởng của mật số bào tử

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố là mật số bào tử với các mức khác nhau: 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} (bào tử/mL).

Nấm mốc được nuôi trên môi trường bán rắn có các mật số bào tử khác nhau như đã bố trí và với thời gian nuôi, nguồn phytate thích hợp từ thí nghiệm trên. pH ban đầu môi trường nuôi là 4, ở 45°C.

c. Khảo sát sự ảnh hưởng của pH

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố là pH với các giá trị khác nhau: pH 2, 3, 4, 5, 6, 7.

Nấm mốc được nuôi trên môi trường bán rắn có các giá trị pH khác nhau như đã bố trí và nguồn phytate, thời gian nuôi cấy và mật số bào tử phù hợp được chọn từ các thí nghiệm trên, ở 45°C.

d. Khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố là nhiệt độ với các giá trị khác nhau: 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C và 60°C.

Nấm mốc được nuôi trên môi trường bán rắn có các giá trị nhiệt độ khác nhau như đã bố trí và thời gian nuôi, nguồn phytate, mật số bào tử, pH phù hợp được chọn từ các thí nghiệm trước.

e. Khảo sát sự ảnh hưởng tương tác của nhiệt độ và pH

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu thừa số với 2 nhân tố là nhiệt độ và pH của dung dịch khoáng từ các giá trị cao nhất của các thí nghiệm trước.

Các giá trị cao nhất về nhiệt độ và pH khác nhau như đã bố trí được nuôi trên môi trường bán rắn.

Chỉ tiêu đánh giá: Hoạt tính phytase (U/g cơ chất khô). Phytase thô được trích ly theo 2.2.2 và xác định hoạt tính theo Heinonen và Lahti (1981).

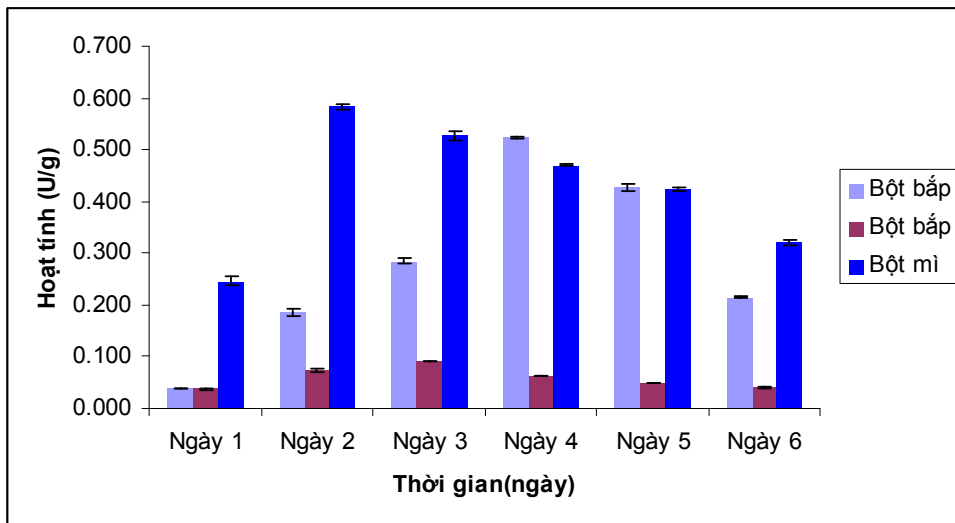
f. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Dùng phần mềm Microsoft Excel để nhập, xử lý số liệu và phần mềm thống kê Statgraphic XV 15.1 để phân tích ANOVA và so sánh các giá trị trung bình.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng tương tác của cơ chất và thời gian nuôi cấy lên hiệu quả sinh tổng hợp phytase

Dựa vào biểu đồ và kết quả xác định hoạt tính enzyme theo sinh khối nấm mốc thu nhận được theo thời gian và các nguồn phytate (Hình 2) cho thấy chủng *A. fumigatus* ET3 phát triển trên các cơ chất khác nhau thì có thời gian tối ưu và khả năng sinh hoạt tính cũng khác nhau.



Hình 2: Biểu đồ hoạt tính enzyme phytase của *A. fumigatus* ET3 theo thời gian và nguồn phytate bổ sung

Trên cơ chất đậu nành, chủng nấm này thể hiện hoạt tính tăng dần từ ngày thứ 2, cao nhất vào ngày thứ 3 và giảm dần từ ngày thứ 4 đến ngày thứ 6. Trong khi đó, với cơ chất là bột bắp, hoạt tính tăng mạnh hơn cũng từ ngày thứ hai và đạt cao nhất vào ngày thứ 4; sau đó giảm nhẹ ngày thứ 5 và giảm mạnh vào ngày thứ 6. Đặc biệt với cơ chất bột mì, chủng nấm này sinh hoạt tính cao nhất chỉ sau 2 ngày nuôi, sau đó hoạt tính liên tục giảm ở các ngày khảo sát còn lại. Sau ngày thứ nhất quá trình sinh tổng hợp enzyme mới bắt đầu diễn ra mạnh mẽ vì thời gian đó nấm mốc đã thích nghi với môi trường và bắt đầu diễn ra các phản ứng sinh hoá sử dụng chất dinh dưỡng của môi trường để sinh trưởng và phát triển. Trên các cơ chất này sau 5 ngày hoạt tính bắt đầu giảm mạnh do quá trình sinh tổng hợp enzyme gần kết thúc vì độ ẩm và các nguồn dinh dưỡng từ môi trường bắt đầu giảm mạnh. Kết quả thí nghiệm này khác với nghiên cứu của các tác giả như Trần Thị Tuyết (2004) trên nấm mốc *A. niger* NRRL – 363, Lý Phương Trúc (2009) trên *A. niger* ATCC 13497 và Purva Vats và Banerjee (2002) trên đối tượng là *A. niger* nuôi cấy ở 30°C thì thời gian sinh tổng hợp phytase cao nhất là 6 ngày. Điều này cho thấy chủng nấm mốc vừa phân lập có thời gian tối ưu khá ngắn khi được nuôi ở nhiệt độ cao (45°C) và đây là một ưu điểm của chủng *A. fumigatus* so với chủng *A. niger* khi được lựa chọn áp dụng vào sản xuất phytase vì nó rút ngắn thời gian sản xuất trong quy trình.

Nguồn cơ chất phytate là các yếu tố quan trọng để sản xuất enzyme phytase của vi sinh vật (Vohra and Satyanarayana, 2003). Các kết quả thu được thể hiện ở Hình 2 cho thấy khi trong môi trường

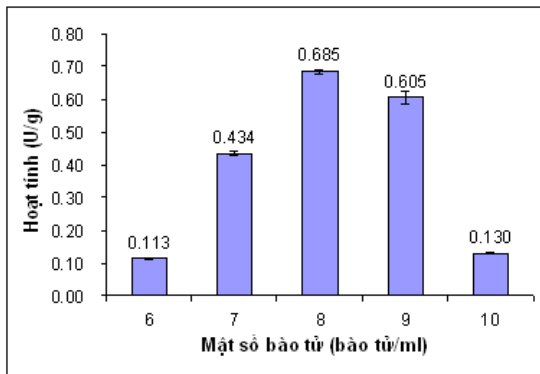
bán rắn với nguồn phytate là bột mì thì chủng nấm này sinh enzyme phytase cao nhất khác biệt có ý nghĩa ở mức độ 5% so với các nguồn phytate là bột bắp và bột đậu nành. Bột đậu nành có hoạt tính enzyme thấp nhất vì thành phần trong đậu nành giàu protein, nên ngoài sinh enzyme phytase chủng nấm này còn sinh enzyme protease (Wang *et al.*, 2005). Protease được biết đến là một enzyme có khả năng thủy phân protein, do đó enzyme này phân cắt phytase làm cho hoạt tính phytase giảm mạnh. Theo kết quả nghiên cứu của Shieh và Ware (1968) trên *A. niger* NRRL 3135, Vats và Banerjee (2002) trên đối tượng là *A. Niger* thì cơ chất phù hợp nhất là bột bắp. Như vậy, điều đó cho thấy được *A. niger* và chủng *A. fumigatus* vừa phân lập mỗi loài có một loại cơ chất phù hợp riêng.

Qua thí nghiệm này, thời gian nuôi cấy 2 ngày và nguồn phytate là bột mì được xem là tối ưu để chủng *A. fumigatus* ET3 sinh tổng hợp phytase cao nhất và được chọn để áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2 Ảnh hưởng của mật số bào tử lên hiệu quả sinh tổng hợp phytase

Dựa vào biểu đồ ở Hình 3 cho thấy hoạt tính phytase bắt đầu tăng dần từ mật số 10^6 bào tử/mL với 0,113 (U/g), sau đó tăng lên khoảng 4 lần khi nuôi ở mật số 10^7 bào tử/mL. Hoạt tính thu được cao nhất với 0,688 (U/g) ở mật số 10^8 bào tử/mL, bắt đầu giảm nhẹ ở 10^9 bào tử/mL và giảm mạnh ở mật số 10^{10} bào tử/mL với lượng hoạt tính gần bằng với mật số 10^6 bào tử/mL. Kết quả trên cho thấy rằng ở mật số 10^6 bào tử/mL do lượng bào tử quá thấp nên làm giảm hiệu suất sinh tổng hợp

enzyme (Wodzinski và Ullah, 1996; Vohra *et al.*, 2003). Khi mật số bào tử nấm mốc quá cao môi trường nuôi cấy không cung cấp đủ dinh dưỡng để nấm mốc sinh trưởng vì vậy lượng phytase sinh ra môi trường thấp.

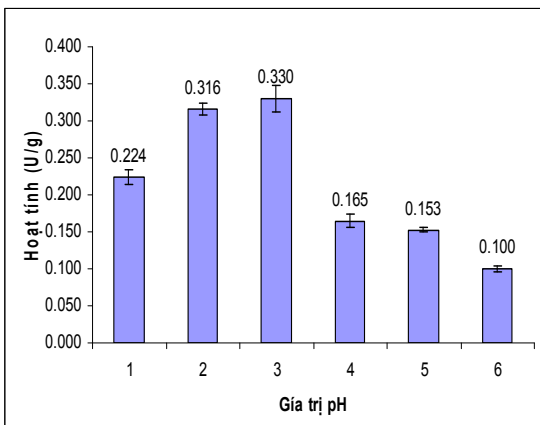


Hình 3: Biểu đồ hoạt tính enzyme phytase của chủng *A. fumigatus* ET3 theo mật số bào tử

Tóm lại, mật số 10^8 bào tử/mL là phù hợp để chủng *A. fumigatus* ET3 sinh nhiều hoạt tính nhất, do đó mật số này được sử dụng cho các thí nghiệm sau.

3.3 Ảnh hưởng của pH môi trường đến hiệu quả sinh tổng hợp phytase

Một nghiên cứu của Vohra and Satyanarayana (2003) về môi trường nuôi cấy vi sinh vật sản xuất phytase thì pH, nhiệt độ, oxygen hòa tan và áp suất là những thông số vật lý quan trọng nhất ảnh hưởng sâu sắc đến sự sinh trưởng của sinh vật và sinh tổng hợp các chất.



Hình 4: Biểu đồ hoạt tính enzyme phytase của *A. fumigatus* ET3 theo pH môi trường

Qua kết quả thống kê và biểu đồ hoạt tính

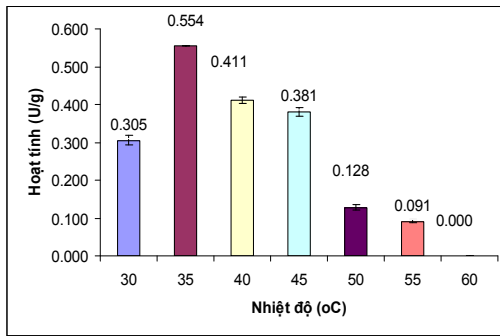
enzyme phytase theo pH môi trường ở Hình 4 cho thấy lượng phytase sinh ra cao nhất khi pH của dung dịch khoáng bổ sung vào là pH 4, ở mức độ thấp hơn là pH 3. Hoạt tính giảm mạnh ở các giá trị pH khảo sát còn lại (pH 5, pH 6 và pH 7). Giá trị pH môi trường có ý nghĩa lớn đối với quá trình sinh tổng hợp phytase. Điều ngạc nhiên là chủng nấm này có khả năng sinh tổng hợp phytase cao ở vùng pH từ 2 đến 5 khác với vùng giá trị pH tối ưu của hầu hết các vi khuẩn và nấm mốc trong khoảng 5 – 7 (Vohra và Satyanarayana, 2003). Có thể thấy rằng vùng pH tối ưu của chủng nấm mốc vừa phân lập gần giống với kết quả nghiên cứu về pH tối ưu trên *A. fumigatus* phytase của Zhang *et al.* (2007) là pH 2,5 và pH 5,5. Điều đó có nghĩa là ở các giá trị pH đó, enzyme hoạt động mạnh nhất cắt cơ chất phytate cung cấp một lượng lớn dinh dưỡng (phosphate) giúp nấm sinh trưởng mạnh mẽ, kết quả là hàm lượng phytase cao.

pH 4 là pH tối ưu để *A. fumigatus* ET3 sinh phytase, do đó nó được sử dụng ở thí nghiệm tiếp theo. Ngoài ra, ở khoảng pH từ 2 đến 5, chủng nấm mốc vừa phân lập có khả năng sinh phytase cao nhất nên vùng pH này được chọn để khảo sát sự ảnh hưởng tương tác của pH và nhiệt độ lên khả năng sinh phytase của *A. fumigatus* ET3.

3.4 Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên hiệu quả sinh tổng hợp phytase

Dựa vào kết quả đo hoạt tính (Hình 5) và kết quả thống kê cho thấy chủng nấm mốc này có khả năng sinh hoạt tính cao nhất ở 35°C; hoạt tính giảm dần ở 40°C và 45°C và bắt đầu giảm mạnh ở 50°C và 55°C. Đặc biệt ở 60°C hoạt tính phytase nó không còn nữa. Mặc dù, *A. fumigatus* được biết đến là loài nấm chịu nhiệt tuy nhiên ở nhiệt độ quá cao quá trình sinh trưởng và phát triển của *A. fumigatus* bị ảnh hưởng vì độ ẩm của môi trường thấp làm ảnh hưởng đến quá trình sinh hóa để sinh phytase.

Theo các nghiên cứu (Park, and Reardon, 1996; Berka *et al.*, 1998) nhiệt độ tối ưu để sản xuất enzyme phytase của hầu hết các vi sinh vật nằm ở cùng nhiệt độ từ 25°C đến 37°C, vì ở nhiệt độ này loài nấm này sinh trưởng và phát triển mạnh nhất nên sản sinh lượng phytase nhiều nhất. Như vậy, kết quả về nhiệt độ tối ưu của *A. fumigatus* để sinh phytase phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả trên.



Hình 5: Biểu đồ hoạt tính enzyme phytase của *A. fumigatus* ET3 theo nhiệt độ môi trường

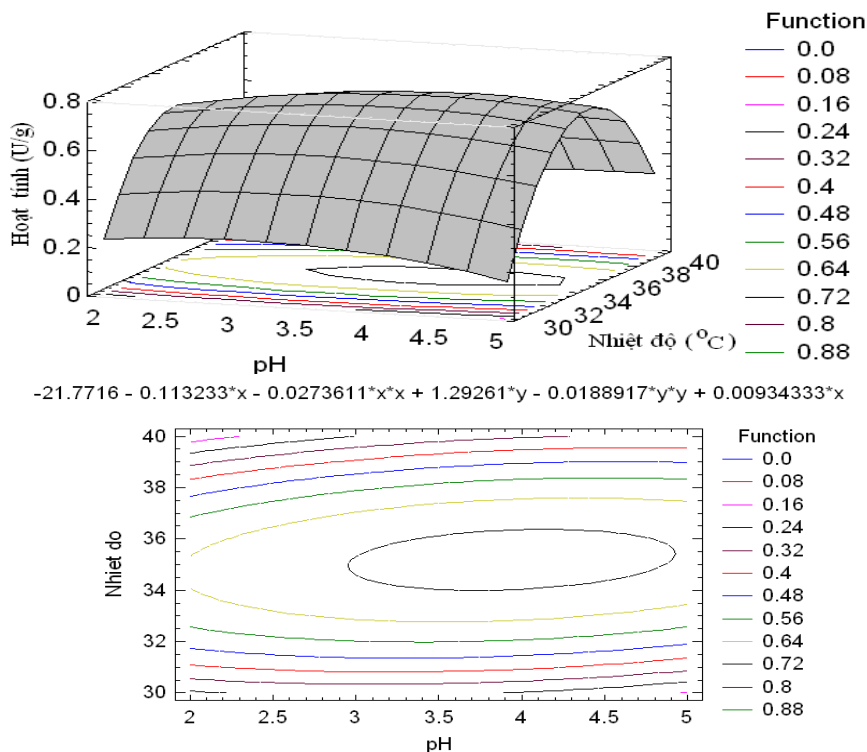
Vì ở khoảng nhiệt độ từ 30°C đến 40°C, chủng nấm mốc *A. fumigatus* ET3 có khả năng sinh phytase tối ưu nhất nên vùng nhiệt độ này được chọn để khảo sát sự ảnh hưởng tương tác của pH và nhiệt độ lên khả năng sinh phytase.

3.5 Ảnh hưởng tương tác của pH và nhiệt độ lên hiệu quả sinh tổng hợp phytase

Các nghiệm thức tương tác được thiết lập với 4

giá trị pH (2, 3, 4, 5) và 3 giá trị nhiệt độ (30°C, 35°C, 40°C) từ thí nghiệm 4.3.3 và 4.3.4 để chọn ra được điều kiện nuôi cấy tốt nhất sinh phytase. *A. fumigatus* ET3 được nuôi trên môi trường bán rắn cơ bản với mật số bào 10⁸ bào tử/mL trên cơ chất bột mì. Phytase thô được thu hoạch sau 2 ngày nuôi. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại, tổng cộng có 12 nghiệm thức và 36 đơn vị thí nghiệm.

Mô hình mặt lưới là công cụ hữu dụng cho việc dự đoán và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy để sản xuất enzyme phytase cao nhất. Biểu đồ đường viền là hình ảnh của phương trình hồi quy để tìm giá trị tối ưu của các biến một cách hiệu quả. Mỗi đường cong đồng mức đại diện cho một số không xác định khi kết hợp kiểm tra 2 biến với số khác ở mức độ tương ứng bằng 0. Vùng giá trị dự đoán cực đại được thể hiện bởi mặt lưới giới hạn trong hình elip được nhỏ nhất là vùng tối ưu. Những đường elip có được khi các biến độc lập có sự tương tác hoàn toàn (Muralidhar *et al.*, 2001).



Hình 6: Hoạt tính enzyme phytase của *A. fumigatus* ET3 theo pH và nhiệt độ môi trường

Các giá trị thu được sau khi phân tích hồi quy với R-squared = 92.2626 %, R-squared (adjusted for d.f.) = 90.9735 % là khá cao thể hiện mô hình thu được có ý nghĩa (Akhazarova and Kefarov,

1982; Khuri and Cornell, 1987) và phù hợp cho mô hình so sánh với các số liệu khác nhau của các biến độc lập.

Với kết quả thu được (Hình 6) cho thấy vùng pH từ 3-5 là vùng pH tối ưu để nuôi cấy *A. fumigatus* ET3 sản sinh phytase ở 35°C và pH 4 là lựa chọn tốt nhất, phù hợp với pH tự nhiên của dung dịch khoáng bò sung.

4 KẾT LUẬN

Qua các thí nghiệm khảo sát về các điều kiện nuôi cấy, chủng nấm mốc này sinh phytase cao nhất với mật số bào tử chủng vào môi trường nuôi cấy khoảng 10⁸ bào tử/mL sau 2 ngày nuôi cấy, trên cơ chất là bột mì, pH của dung dịch khoáng bò sung là pH 4 ù trong 35°C.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin gửi lời cảm ơn đến Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện vật chất cho thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chang, Y.C., H.F. Tsai, M. Karos, and K.J. Kwon-Chung. 2004. THTA, a thermotolerance gene of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*, 41: 888-896.
2. Cheryan, M. 1980. Phytic acid interactions in food systems. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 13: 297.
3. Cooney, D.G., and R. Emerson. 1964. *Thermophilic Fungi*. An Account of their Biology, Activities and Classification. W.H. Freeman, San Francisco, CA.
4. Fredlund, K., M. Isaksson, L. Rossander-Hulthén, A. Almgren and A. S. Sandberg. 2006. Absorption of zinc and retention of calcium: Dose-dependent inhibition by phytate. *Journal of Trace elements in Medicine and Biology*, 20(1): 49-57.
5. Fresenius, G. 1863. *Beitrag zur Mykology*. Frankfurt a.M., Bronner, pp 81-82.
6. Haines, J. 1995. *Aspergillus* in compost: straw man or fatal flaw. *Biocycle*, 6:32-35.
7. Heinonen, J. K. and R. J. Lahti. 1981. A New and Convenient Calorimetric Determination of Inorganic Orthophosphate and Its Application to the Assay of Inorganic Pyrophosphatase. *Analytical Biochemistry*, 113:313-317.
8. Hill, J.E., D. Kysela, M. Elimelech. 2007. Isolation and assessment of phytate-hydrolysing bacteria from the DelMarVa

- Peninsula. *Environmental Microbiology*, 9(12): 3100-3107.
9. Holm, P. B., K. N. Kristiansen and H. B. Pedersen. 2002. Transgenic approaches in commonly consumed cereals to improve iron and zinc content and bioavailability. *Journal of Nutrition*, 132(3): 514S-516S.
10. Jahnke, R. A. 2000. The Phosphorus Cycle. In R. C. Michael Jacobson. *Earth System Science*, pp. 360-376.
11. Khuri, A. I. and J. A. Cornell. 1987. *Response surfaces: design and analysis*. New York: John Wiley and Sons, 291-334
12. Liu, BL, CH Jong and YM Tzeng. 1999. Effect of immobilization on pH and thermal stability of *Aspergillus ficuum* phytase. *Enzyme Micro Technol*, 25: 517-521
13. Lopez, H. W., F. Leenhardt, C. Coudray and C. Rémésy. 2002. Minerals and phytic acid interactions: Is it a real problem for human nutrition. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 727-739.
14. Maheshwari, R., G. Bharadwaj, and M. K. Bhat. 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64: 461-488.
15. Muralidhar, R. V., R. R. Chirumamila, R. Marchant and P. Nigam. 2001. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochemistry Engineering*, 9:17-23.
16. Nelson, T. S. 1967. The utilization of phytate phosphorus by poultry. A review. *Poultry Sci*, 46:862-869.
17. Park, K. M. and K. F. Reardon. 1996. Medium optimization for recombinant protein production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 18:737-740.
18. Parry, R., 1998. Agricultural phosphorous and water quality. *J. Environ. Qual.*, 27: 258-261 Raper, K.B, D.I Fennell. The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1965.
19. Pasamontes, L., M. Haiker, M. Wyss, M. Tessier and A.P.G.M. Loon. 1997. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1696-1700.

20. Sharpley, A.N.T.C. Chapra, R. Wedepohl, J.T. Sims, T.C. Daniel and K.R. Reddy, 1994. Managing agricultural phosphorous for protection of surface waters: Issues and options. *J. Environ. Qual.*, 23: 437-451.
21. Shieh, T.R. and J.H. Ware. 1968. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Applied Microbiology*, 16:1348-1351.
22. Shimizu, M. 1993. Purification and characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. *Biosci Biotech Biochem*, 57(8): 1364-1365.
23. Ullah, A.H.J. 1998. Production rapid purification and catalytic characterization of axcellular phytase from *Aspergillus ficuum*. *Prep Biochem*, 18:443-458.
24. Vats P. and Banerjee U.C. 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.
25. Vohra, A. and T. Satanarayana. 2003. Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23:29–60.
26. Volfova, O., J. Dcorakova, A. Hanzlikova and A. Jandera. 1994. Phytase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol*, 39(6): 481-484.
27. Wang, S. L., Y. H. Chen, C. L. Wang, Y. H. Yen and M. K Chern. 2005. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 660–665.