

# TUYỂN CHỌN CÁC DÒNG VI KHUẨN *PSEUDOMONAS STUTZERI* TỔNG HỢP ENZYME PHYTASE

Nguyễn Thị Hồng Xuyên<sup>1</sup>

Nguyễn Xuân Hồng<sup>1</sup>, Đoàn Phương Linh<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

**Title:** Selecting *Pseudomonas stutzeri* strains that synthesized phytase enzyme

**Từ khóa:** Enzyme phytase, môi trường bán rắn, nhiệt độ tối ưu, *Pseudomonas stutzeri*, pH tối ưu.

**Keywords:** Enzyme phytase, semi-solid medium, optimal temperature, *Pseudomonas stutzeri*, optimal pH.

### Lịch sử bài báo

Ngày nhận bài: 11/8/2022

Ngày nhận kết quả bình duyệt: 25/10/2022

Ngày chấp nhận đăng bài: 15/11/2022

**Tác giả:** Trường Đại học Kỹ Thuật – Công Nghệ Cần Thơ

**Email:** ntxuyen@ctu.edu.vn

Đề tài nhằm nghiên cứu khả năng hòa tan lân hữu cơ của 225 dòng *Pseudomonas stutzeri* được phân lập từ các ao nuôi tôm và cá tra ở 8 tỉnh Đồng Bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL), trong đó có 52 dòng hòa tan được lân hữu cơ và dòng có khả năng sản sinh phytase cao nhất là N1a. Điều kiện tối ưu cho vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* N1a sinh enzyme phytase cao nhất là môi trường bán rắn với cơ chất bột bắp ở pH 7.5, nhiệt độ 30 - 40°C, thời gian nuôi cấy là 3 ngày. Bổ sung glucose và sucrose với hàm lượng mỗi chất 0,5% làm tăng sản lượng phytase. Malt extract 1% là nguồn nitơ tối ưu cho sinh tổng hợp phytase của *Pseudomonas stutzeri*. Khảo sát ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên hoạt tính của phytase thô thu nhận được từ sinh khối vi khuẩn tươi cho thấy nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của enzyme phytase là 45°C và pH tối ưu là 5.5. Enzyme phytase khá bền ở nhiệt độ -4°C và ổn định hoạt tính trong dung dịch pH 5.5 trong 24 giờ.

## ABSTRACT

This study aimed at studying the ability to solubilize organic phosphorus of 225 *Pseudomonas stutzeri* bacteria strains, which were collected from shrimp and catfish ponds in 8 provinces of the Mekong Delta. Among 225 isolated bacteria, 52 were found to be able to solubilize organic phosphorus, and *Pseudomonas stutzeri* N1a bacterium has the highest ability to produce phytase. The optimal condition for *Pseudomonas stutzeri* N1a to produce the highest phytase enzyme was the semi-solid medium with the cornstarch substrate at pH 7.5 and the temperature of 30 - 40°C after 3 days of incubation. The addition of glucose and sucrose with a concentration of 0,5% each increased the phytase yield. Malt extract of 1% was also a good nitrogen source for phytase biosynthesis. Investigating the effects of pH and temperature on the activity of crude phytase, obtained from *Pseudomonas stutzeri* biomass, showed that the optimal temperature and pH for phytase enzyme activity were 45°C and 5.5, respectively. This enzyme phytase was stable in the solution at a pH of 5.5 at -4°C within 24 hours.

## 1. Giới thiệu

### 1.1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, các nhà khoa học đã và đang nỗ lực tìm cách làm giảm ô

nhễm từ các chất thải ra trong chăn nuôi. Trong quá trình nghiên cứu, các nhà khoa học đã xác định được rằng cần cải thiện khả năng sử dụng các dưỡng chất trong khẩu

phần của vật nuôi để hạn chế tối đa lượng phân thải ra. Trước đây, do ít quan tâm đến lượng chất dinh dưỡng bị thải ra ngoài nên hậu quả của việc cho ăn quá nhiều chất dinh dưỡng, nhằm tối đa hóa năng suất đã dẫn đến là lượng chất thải ra quá nhiều qua phân và nước tiểu (chủ yếu là hàm lượng protein, phospho và calci). Qua nhiều nghiên cứu cho thấy việc bổ sung enzyme tỏ ra có hiệu quả trong việc cải thiện các hạn chế trên.

Acid phytic (myo - inositol 1,2,3,4,5,6 - hexakis dihydrogen phosphate) và muối của acid phytic được gọi là phytate. Phytate là một nhóm các hợp chất phospho hữu cơ được tìm thấy rộng rãi trong tự nhiên, đặc biệt là trong cây họ đậu, ngũ cốc và hạt có dầu (Reddy et al., 1982). Acid phytic là một thành phần của thức ăn chăn nuôi, không được tiêu hóa bởi động vật dạ dày đơn (Mittal et al., 2011). Phytase là enzyme chính chịu trách nhiệm cho sự thủy phân của acid phytic và muối phytate. Ngoài ra, phytase làm giảm lượng phospho thải vào môi trường và những vấn đề từ kết quả của hiện tượng phú dưỡng. Bổ sung phytase vào khẩu phần ăn của động vật dạ dày đơn, làm giảm bài tiết phosphate trong phân lên đến 50% (Greiner & Konietzny, 2006). Trong thập kỷ qua, đã có rất nhiều nghiên cứu về phytase được tổng hợp từ vi sinh vật và việc tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy cũng như tối ưu hóa các điều kiện tổng hợp enzyme phytase với mục đích tăng sản lượng.

Phytase có mặt rộng rãi trong thực vật, mô động vật và vi sinh vật kể cả con người. Mặc dù việc sản xuất phytase

thương mại đều chủ yếu tập trung ở nấm *Aspergillus*, những nghiên cứu đã đề nghị rằng phytase của vi khuẩn có thể thay thế enzyme phytase từ nấm bởi vì mật số cao và có nét riêng biệt, độ bền với sự thủy phân protein cao và hiệu quả xúc tác tốt nhất. Phytase thì có mặt rộng rãi trong nhiều loại vi khuẩn khác nhau như: *Bacillus*, *Enterobacteria*, *Pseudomonas* và vi khuẩn kỵ khí ở dạ cỏ động vật nhai lại (Jorquera et al., 2008).

Những thành viên của giống *Pseudomonas* chứa nhiều loại phytase khác nhau như Cphy, HAP và BPP. *Pseudomonas* có quá trình trao đổi chất linh hoạt với nhiều loại dưỡng chất khác nhau, một vài loài có thể sử dụng trên 100 nguồn năng lượng và carbon khác nhau. Sự trao đổi chất đa dạng này đòi hỏi phải có sự hiện diện của nhiều loại phytase trong một vài loài *Pseudomonas*. (Jorquera et al., 2008).

Với những lợi ích nêu trên, nhiều nghiên cứu phytase đã được thực hiện trên các đối tượng khác nhau như: thực vật (hạt ngũ cốc và đậu), động vật và vi sinh vật. Trong đề tài này tôi chọn vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* làm đối tượng thí nghiệm vì vi khuẩn này phân bố rộng và có nhiều công dụng.

## 1.2. Mục tiêu

Tuyển chọn các dòng *P. stutzeri* tổng hợp enzyme phytase cao.

Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp phytase của vi khuẩn *P. Stutzeri*.

Xác định điều kiện hoạt động và bảo quản enzyme phytase thích hợp như nhiệt độ, pH.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên liệu

Chọn 225 dòng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* (*P. stutzeri*) phân lập từ ao nuôi cá tra và ao nuôi tôm ở các tỉnh An Giang, Vĩnh Long, Cần Thơ, Bạc Liêu, Tiền Giang, Kiên Giang, Bến Tre, Đồng Tháp, các dòng vi khuẩn đã được phân lập tại phòng thí nghiệm Vi Sinh Vật, Viện Nghiên Cứu và Phát Triển Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2. Hóa chất

Một số hóa chất dùng để xác định hoạt tính và định lượng protein: Sodium phytate ( $C_6H_6Na_{12}O_{24}P_6H_2O$ ) (Sigma), Acid sulfuric ( $H_2SO_4$ ), Muối sodium acetate 0,05 M pH 4,8, 0,05 M Tris-HCl pH 7,5, Tricloro- acetic 15% (TCA), Thuốc thử Bradford, Ethanol (-20°C), Aceton, L(+)- ascorbic acid ( $C_6H_8O_2$ ).

*Môi trường thử khả năng hòa tan lân hữu cơ* (Chunshan et al., 2001).

Một số hóa chất dùng để xác định hoạt tính và định lượng protein: Sodium phytate ( $C_6H_6Na_{12}O_{24}P_6H_2O$ ) (Sigma), Acid sulfuric ( $H_2SO_4$ ), Muối sodium acetate 0,05 M pH 4,8, 0,05 M Tris - HCl pH 7,5, Tricloro - acetic 15% (TCA), Thuốc thử Bradford, Ethanol (-20°C), Aceton, L(+)- ascorbic acid ( $C_6H_8O_2$ ).

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

*2.3.1. Khảo sát khả năng hòa tan lân hữu cơ của các dòng vi khuẩn P. stutzeri.*

*Thí nghiệm 1: Khảo sát khả năng hòa tan lân hữu cơ (Sodium phytate) của các dòng vi khuẩn P. Stutzeri.*

*Mục đích:* Tuyển chọn một số dòng có khả năng hòa tan lân hữu cơ mạnh.

*Bố trí:* Thí nghiệm 1 nhân tố là 225 dòng vi khuẩn đã phân lập ở phòng thí nghiệm vi sinh, thí nghiệm với 3 lần lặp lại.

*Tiến hành thí nghiệm:* Chuẩn bị môi trường đĩa để thử khả năng hòa tan lân hữu cơ có bổ sung phytate. Cấy các dòng vi khuẩn khảo sát lên đĩa, lặp lại 3 lần ở 3 đĩa. Nuôi ủ 72 giờ tiến hành quan sát, đo đường kính của halo (vùng trong) và đường kính của khuẩn lạc. Chọn ra 3 dòng mạnh nhất để làm thí nghiệm kế tiếp.

*Chỉ tiêu đánh giá:* Tỷ lệ đường kính của halo/đường kính của khuẩn lạc (Hariprasad & Niranjana, 2008).

*2.3.2. Khảo sát các điều kiện nuôi cấy thích hợp để vi khuẩn tổng hợp enzyme phytase cao nhất.*

*Thí nghiệm 2: Khảo sát nhiệt độ và pH môi trường thích hợp cho vi khuẩn P. stutzeri tổng hợp enzyme phytase cao nhất.*

*Mục đích:* Xác định nhiệt độ và pH của môi trường nuôi cấy để vi khuẩn tổng hợp enzyme phytase cao nhất

*Bố trí:* Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên với 2 nhân tố là nhiệt độ: 30, 35, 40°C và pH: 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

*Tiến hành thí nghiệm:* Tuyển chọn từ 52 dòng vi khuẩn có khả năng hoàn tan lân, chọn 3 dòng có khả năng hòa tan lân mạnh nhất. Tiến hành nuôi cấy trong môi trường tối thiểu (minimal) dạng lỏng, sau 3 ngày thu sinh khối. Pha môi trường hòa tan lân hữu cơ, hiệu chỉnh pH môi trường như đã bố trí. Cấy 3 dòng vi khuẩn đã chọn lên đĩa bằng cách hút 10  $\mu$ L dịch lỏng chứa sinh khối vi khuẩn, nhỏ lên đĩa đã đổ sẵn môi trường (lặp lại 3 lần trên 3 đĩa). Sau đó, ủ ở các nhiệt độ 30°C, 35°C, 40°C. Tiến hành đo

đường kính của halo và đường kính của khuẩn lạc sau 3 ngày nuôi cấy. Chọn 1 dòng trong 3 dòng có khả năng hòa tan lân cao nhất ở các nhiệt độ và pH bố trí.

*Chỉ tiêu đánh giá:* Tỷ lệ đường kính của halo/khuẩn lạc (Hariprasad & Niranjana, 2008).

*Thí nghiệm 3: Khảo sát thời gian nuôi cấy thích hợp để vi khuẩn P. stutzeri sinh tổng hợp phytase cao nhất.*

*Mục đích:* Xác định thời gian nuôi cấy để vi khuẩn *P. stutzeri* sinh tổng hợp phytase cao nhất.

*Bố trí:* Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 1 nhân tố là thời gian từ 0 đến 7 ngày. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

*Tiến hành thí nghiệm:* Chọn một dòng vi khuẩn có khả năng tạo halo cao nhất trong 3 dòng đã chọn ở thí nghiệm 2. Nuôi trong môi trường hòa tan lân (Chunshan et al., 2001). Hiệu chỉnh pH và nhiệt độ như thí nghiệm 2. Thu mẫu theo từng ngày như bố trí, ly trích enzyme và xác định hoạt tính của phytase theo phương pháp Heinonen & Lahti (1981).

*Chỉ tiêu đánh giá:* Hoạt tính của phytase (U/g sinh khối tươi).

*2.3.3. Khảo sát các nguồn dinh dưỡng thích hợp để vi khuẩn tổng hợp enzyme phytase cao nhất.*

*Thí nghiệm 4: Khảo sát nguồn phytate và môi trường nuôi cấy thích hợp để vi khuẩn P. stutzeri sinh tổng hợp phytase cao nhất.*

*Mục đích:* Chọn được nguồn phytate và môi trường thích hợp để vi khuẩn *P. stutzeri* tổng hợp phytase cao nhất.

*Bố trí:* Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 2 nhân tố là nguồn phytate: sodium phytate, bột bắp, bột mì, bột đậu trên 2 loại môi trường: lỏng và rắn (riêng sodium phytate chỉ sử dụng trên môi trường lỏng). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

*Tiến hành thí nghiệm:* Dòng vi khuẩn được chọn ở thí nghiệm 2 được nuôi trong hai loại môi trường với thể tích cấy mẫu bằng nhau (2 mL) và lượng phytate bổ sung vào như nhau trong cả hai môi trường: Môi trường bán rắn (90 g chất khô) được chuẩn bị với thành phần cơ bản trấu : nguồn phytate theo tỷ lệ 1:2 (w/w). Bổ sung 42 mL khoáng, thêm nước cất sao cho môi trường đạt ẩm độ 60% (Tuyết, 2004). Các điều kiện nuôi cấy (nhiệt độ, pH và thời gian) được chọn ở thí nghiệm 2,3. Tiến hành thu mẫu, ly trích, xác định hoạt tính của phytase theo phương pháp Heinonen & Lahti (1981).

*Chỉ tiêu đánh giá:* Hoạt tính của phytase (U/mg protein).

*Thí nghiệm 5: Khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon thích hợp.*

*Mục đích:* Chọn được nguồn carbon thích hợp để vi khuẩn tổng hợp phytase cao nhất.

*Bố trí:* Thí nghiệm 1 nhân tố là các nguồn carbon như sau: 1% Glucose, Maltose, Sucrose, Fructose, Manitol và 0,5% Glucose + Sucrose. Thí nghiệm với 3 lần lặp lại và 1 mẫu đối chứng (môi trường không bổ sung nguồn carbon).

*Tiến hành thí nghiệm:* Dòng vi khuẩn đã chọn được nuôi trong môi trường với các điều kiện tối ưu đã chọn ở các thí nghiệm trước. Thay đổi nguồn carbon trong môi trường như đã bố trí. Tiến hành

thu mẫu, ly trích và xác định hoạt tính phytase theo phương pháp Heinonen & Lahti (1981).

*Chỉ tiêu đánh giá:* Hoạt tính của phytase (U/g sinh khối tươi).

*Thí nghiệm 6: Khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ thích hợp*

*Mục đích:* Chọn được nguồn nitơ thích hợp để vi khuẩn tổng hợp phytase cao nhất.

*Bố trí:* Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 1 nhân tố là nguồn nitơ: 0,1% Glycine, Malt extract, Yeast extract và Amonium sulfate, 0,05% Malt extract + 0,05% Amonium sulfate, 3 lần lặp lại và mẫu ĐC (môi trường không bổ sung nguồn nitơ).

*Tiến hành thí nghiệm:* Dòng vi khuẩn *P. stutzeri* được nuôi trong môi trường bán rắn với các điều kiện đã chọn ở các thí nghiệm trước, chỉ thay đổi nguồn nitơ như đã bố trí. Sau đó tiến hành thu mẫu, ly trích và xác định hoạt tính của phytase theo phương pháp Heinonen & Lahti (1981).

*Chỉ tiêu đánh giá:* Hoạt tính phytase (U/g sinh khối tươi).

*2.3.4. Khảo sát nhiệt độ và pH tối ưu của phytase thô được thu nhận từ vi khuẩn P. stutzeri.*

*Thí nghiệm 7: Khảo sát nhiệt độ ủ tối ưu của enzyme phytase thô được ly trích từ vi khuẩn.*

*Mục đích:* Chọn được nhiệt độ ủ tối ưu cho hoạt động của enzyme phytase thô thu nhận từ vi khuẩn

*Bố trí:* Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên với 1 nhân tố là nhiệt độ ủ: 30°C, 35°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

*Tiến hành thí nghiệm:* Dịch trích enzyme thô được ly trích từ vi khuẩn được nuôi trong môi trường với các điều kiện tối ưu đã chọn ở các thí nghiệm trước, đem ủ 10 phút ở các nhiệt độ như bố trí. Tiến hành xác định hoạt tính theo phương pháp Heinonen & Lahti (1981).

*Chỉ tiêu đánh giá:* Hoạt tính của phytase (U/mg prot).

*Thí nghiệm 8: Khảo sát pH tối ưu của enzyme phytase thô từ vi khuẩn P. Stutzeri.*

*Mục đích:* Xác định pH tối ưu của phytase thô.

*Bố trí:* Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 1 nhân tố là pH: 2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5; 10,5. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

*Tiến hành thí nghiệm:* Enzyme phytase thô được ly trích và rửa bằng acetone theo tỷ lệ 1:3, ly tâm và thu lấy enzyme thô, để khô trong bình hút ẩm, sau đó hòa tan trong các dung dịch đệm có pH như bố trí, ủ 24 giờ. Tiến hành xác định hoạt tính của phytase theo phương pháp Heinonen & Lahti (1981).

*Chỉ tiêu đánh giá:* Hoạt tính của phytase (U/mg prot).

### 2.3.5. Phương pháp phân tích

#### ✓ Phương pháp đo đường kính halo

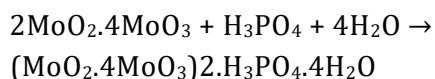
Vi khuẩn sau khi được nuôi trong môi trường bán rắn với các điều kiện tối ưu đã chọn, tiến hành dùng thước chia vạch đo đường kính halo và đường kính khuẩn lạc. Tỷ lệ đường kính của halo/đường kính của khuẩn lạc được xác định dựa vào công thức của Pikovskaya (Hariprasad & Niranjana, 2008).

Đường kính của khuẩn lạc + halo (cm) /  
Đường kính của khuẩn lạc (cm)

### ✓ Phương pháp xác định hoạt tính enzyme phytase

Vi khuẩn sau khi được nuôi trong môi trường bán rắn, sau đó đem ly trích bằng cách rửa trong acetone với tỷ lệ 1:4, ủ ở 20°C 4 giờ. Sau đó, lắc đều và ổn định trong đá khoảng 2 giờ, ly tâm 7000 vòng/phút ở 4°C trong 20 phút. Loại bỏ dịch trong, thu phần kết tủa, làm khô trong bình hút ẩm. Hòa tan enzyme trong dung dịch đệm NaAc 0,05M, pH 5,5 và xác định hoạt tính theo phương pháp Heinonen & Lahti (1981) như sau:

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 880 nm.

#### 2.3.6. Phương pháp xử lý thống kê

Số liệu trong nghiên cứu được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel 2010, phân tích one - way Anova, two - way Anova và kiểm định Fisher bằng phần mềm thống kê Minitab 17.

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Kết quả khảo sát khả năng hòa tan lân hữu cơ của các dòng vi khuẩn *P. stutzeri*.

Thí nghiệm khảo sát 225 dòng *P. Stutzeri* phân lập từ ao nuôi cá tra và ao

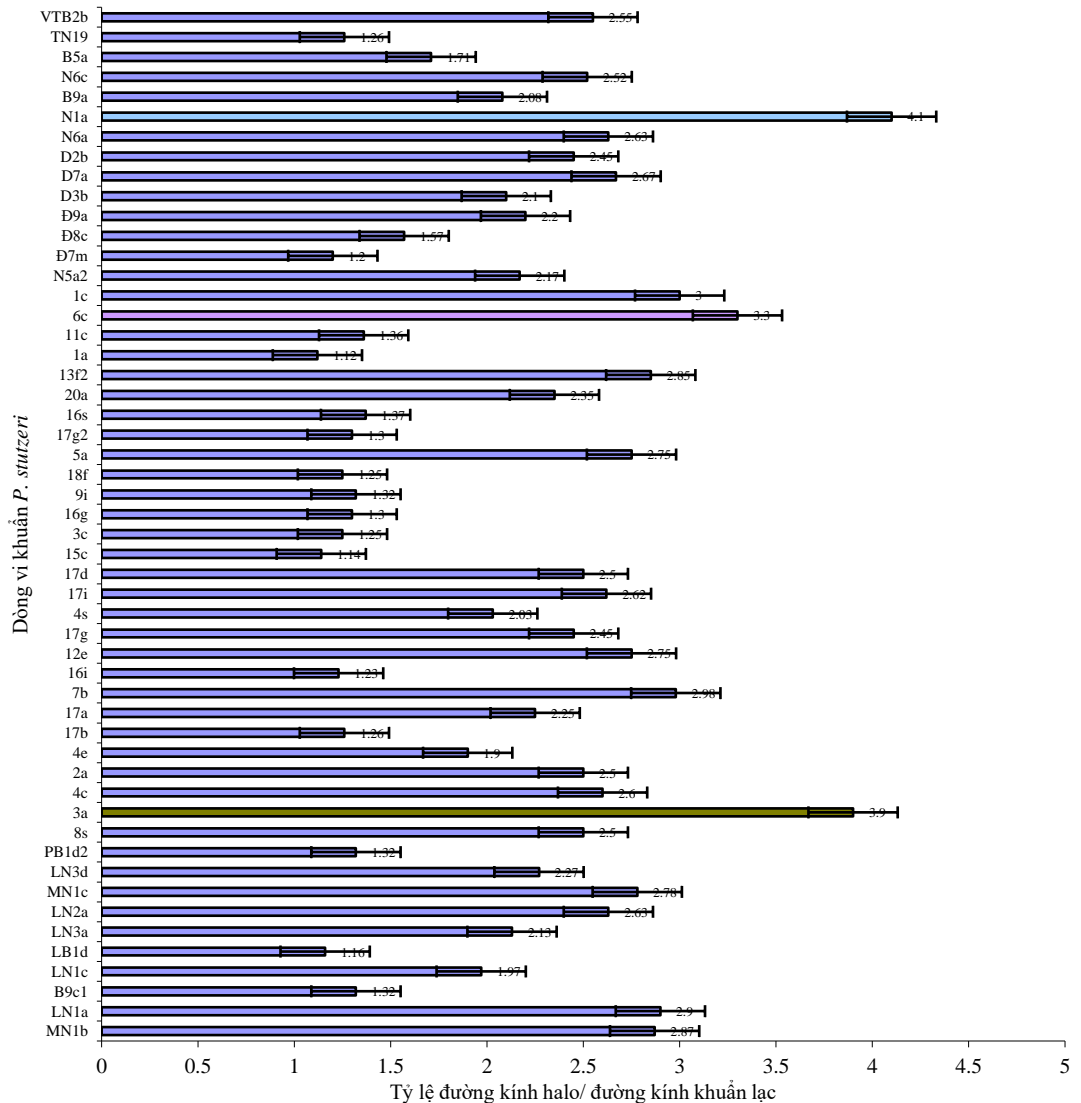
nuôi tôm ở 8 tỉnh ĐBSCL cho thấy có 52 dòng *P. Stutzeri* có khả năng hòa tan sodium phytate sau khi ủ ở 30°C trong 72 giờ (Bảng 1).

Theo hình 1 chọn được 3 dòng N1a, 3a, 6c với tỉ lệ đường kính halo cao nhất so với các dòng còn lại. Trong đó dòng N1a và 3a tạo đường kính halo lớn nhất (vùng trong). Kết quả có thể giải thích là do vi khuẩn *P. Stutzeri* sản xuất phytase ngoại bào, phân giải sodium phytate trong môi trường. Dòng N1a có khả năng sinh phytase cao nên đường kính của dòng này cao nhất. Như vậy mỗi dòng sẽ có khả năng sinh phytase khác nhau.

Kết quả này tương đương với kết quả của Hosseinkhani et al., (2007) cho rằng vi khuẩn *Pseudomonas sp.* có khả năng tạo halo trên môi trường thạch với đường kính halo khoảng 4,1 cm sau khi ủ ở 28°C 72 giờ.

**Bảng 1.** Kết quả đánh giá khả năng hòa tan lân hữu cơ của các dòng vi khuẩn *P. stutzeri*

Stt	Nguồn mẫu	Vị Trí	Số dòng test khả năng hòa tan lân hữu cơ	Số dòng khả năng hòa tan lân hữu cơ
1	An Giang	Ao Cá Tra	21	10
2	Bến Tre	Ao Cá Tra	63	28
3	Cần Thơ	Ao Cá Tra	23	1
4	Đồng Tháp	Ao Cá Tra	17	3
5	Kiên Giang	Ao Cá Tra	6	0
6	Tiền Giang	Ao Cá Tra	17	3
7	Vĩnh Long	Ao Cá Tra	16	5
8	Bạc Liêu	Ao Tôm	62	2
Tổng Cộng			225	52



**Hình 1.** Tỷ lệ đường kính halo/đường kính khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn *P. stutzeri*

**3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng nhiệt độ và pH môi trường lên khả năng tổng hợp enzyme phytase của các dòng vi khuẩn *P. stutzeri***

Kết quả bảng 2 cho thấy dòng 3a có đường kính halo lớn nhất ở nhiệt độ 30°C và pH 7,5, nhưng nhỏ hơn đường kính halo của N1a ở cùng nhiệt độ và pH. Đường kính halo của hai dòng trên giảm dần khi tăng nhiệt độ và pH. Dòng 6c tạo halo có đường kính nhỏ ở nhiệt độ 35°C và pH 7,5.

Kết quả trên phù hợp với báo cáo của Lalucat et al., (2006), các dòng vi khuẩn *Pseudomonas* có thể tạo halo ở nhiệt độ 30°C, pH trung tính 6,5 - 7,5. Theo kết quả của Hosseinkhani et al., (2007) thì nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn *Pseudomonas sp.* tổng hợp phytase là 28°C và pH là 6,5. Qua thí nghiệm này dòng vi khuẩn N1a được chọn nuôi cấy tiếp tục để thu nhận enzyme phytase thô cho các thí nghiệm tiếp theo.

**Bảng 2.** Trung bình tỉ lệ đường kính halo / khuẩn lạc khi nuôi vi khuẩn *P. stutzeri* trên môi trường thạch với nhiệt độ ủ và pH môi trường khác nhau

Mẫu	Trung bình tỉ lệ đường kính halo / khuẩn lạc					Nhiệt độ (°C)
	pH					
	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	
<b>3a</b>	0 <sup>bgt</sup>	0 <sup>bft</sup>	0 <sup>bet</sup>	5 <sup>bdt</sup>	0 <sup>bht</sup>	<b>30</b>
<b>N1a</b>	3,17 <sup>agt</sup>	4,5 <sup>aft</sup>	2,25 <sup>aet</sup>	6,38 <sup>adt</sup>	0 <sup>aht</sup>	
<b>6c</b>	0 <sup>cgt</sup>	0 <sup>cft</sup>	0 <sup>cet</sup>	0 <sup>cdt</sup>	0 <sup>cht</sup>	
<b>3a</b>	0 <sup>bgt</sup>	0 <sup>bft</sup>	3 <sup>bet</sup>	4,17 <sup>bdt</sup>	0 <sup>bht</sup>	<b>35</b>
<b>N1a</b>	2 <sup>agt</sup>	2,88 <sup>aft</sup>	2,38 <sup>aet</sup>	4,83 <sup>adt</sup>	0 <sup>aht</sup>	
<b>6c</b>	0 <sup>cgt</sup>	0 <sup>cft</sup>	0 <sup>cet</sup>	1,38 <sup>cdt</sup>	0 <sup>cht</sup>	
<b>3a</b>	0 <sup>bgt</sup>	0 <sup>bft</sup>	4,83 <sup>bet</sup>	4,17 <sup>bdt</sup>	0 <sup>bht</sup>	<b>40</b>
<b>N1a</b>	0 <sup>agt</sup>	4,17 <sup>aft</sup>	3,83 <sup>aet</sup>	4,5 <sup>adt</sup>	0 <sup>aht</sup>	
<b>6c</b>	0 <sup>cgt</sup>	0 <sup>cft</sup>	0 <sup>cet</sup>	0 <sup>cdt</sup>	0 <sup>cht</sup>	

Ghi chú: Các số liệu trong bảng là kết quả của 3 lần lặp lại, các số liệu có mẫu tự đi kèm giống nhau khác biệt không ý nghĩa ở mức độ ý nghĩa 0,05 theo thống kê two – way Anova.



a) 30°C, 7,5      b) 35°C, 7,5      c) 40°C, 7,5

**Hình 2.** Halo của 3 dòng 3a, N1a, 6c khi ủ ở nhiệt độ 30, 35, 40°C, pH 7,5

### 3.3. Kết quả khảo sát thời gian nuôi cấy thích hợp để vi khuẩn *P. stutzeri* tổng hợp enzyme phytase cao nhất

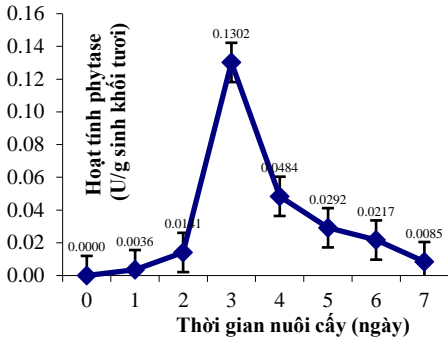
Kết quả (hình 3) cho thấy ở ngày thứ nhất vi khuẩn đã bắt đầu tổng hợp phytase tuy nhiên hoạt tính còn rất thấp do vi khuẩn mới dần thích nghi với môi trường, tổng hợp các enzyme cần cho sự phân giải phytate và các dưỡng chất nên hoạt tính chưa cao. Hoạt tính tăng dần vào ngày 3 cao nhất (0,1302 U/g sinh khối tươi), sau đó giảm nhanh do vi khuẩn đã thủy phân hết phytate trong môi trường. Hoạt tính phytase không còn ở ngày thứ 7 vì lượng

phytate trong môi trường đã được vi khuẩn phân giải hết. Như vậy thời gian thích hợp nhất để N1a tổng hợp phytase là 3 ngày.

Kết quả tương tự với công bố của Hosseinkhani et al. (2007) trên dòng vi khuẩn *Pseudomonas sp* khi ủ ở 28°C, pH 6,5 và Yoon et al. (1995) trên *Enterobacter sp*. Tuy nhiên theo kết quả của Tuyết (2004) trên *Aspergillus niger* NRRL-363 và El - Gindy et al. (2009) *Malbranchea sulfurea* và *A. niveus* sinh tổng hợp phytase tăng dần từ ngày thứ 4, đạt tối ưu vào ngày thứ 6 sau đó giảm dần, theo Casey và Walsh (2003) trên đối tượng *A. awamorii* ATCC 11382 hoạt



tính phytase cao nhất vào ngày 6 và 8 là 0,11 U/mL và 0,85 U/mL. Như vậy các dòng vi khuẩn khác nhau có thời gian sinh tổng hợp phytase khác nhau.



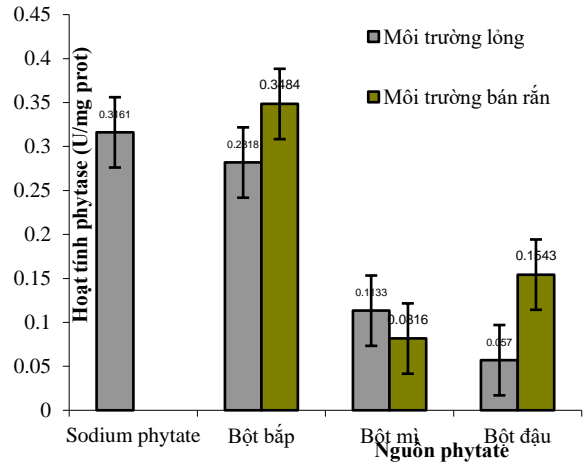
**Hình 3.** Hoạt tính phytase của vi khuẩn N1a theo thời gian nuôi cấy

**3.4. Kết quả khảo sát nguồn phytate thích hợp để vi khuẩn *P. stutzeri* tổng hợp enzyme phytase cao nhất**

Theo hình 4 cho thấy trong môi trường bán rắn với nguồn phytate là bột bắp, dòng N1a sinh enzyme phytase cao nhất. Trong môi trường lỏng nguồn cơ chất là sodium phytate, vi khuẩn có hoạt tính phytase cao hơn so với các nguồn phytate còn lại, nhưng hoạt tính không cao so với nguồn phytate là bột bắp trong môi trường bán rắn. Như vậy bột bắp trong môi trường bán rắn được xem là nguồn phytate tốt nhất cho vi khuẩn tổng hợp phytase do vi khuẩn dễ sử dụng và hấp thu. Hơn nữa do vi khuẩn hiếu khí nên trong môi trường bán rắn có bề mặt thoáng tạo điều kiện cho vi khuẩn phát triển tốt hơn môi trường lỏng dẫn đến khả năng tổng hợp phytase cũng tốt hơn.

Kết quả tương tự với kết quả của Shieh & Ware (1968) trên đối tượng là *A. niger* NRRL 3135, Vats & Banerjee (2002) trên đối tượng là *A. niger*. Theo Tuyết (2004) trên *A. niger* thì nguồn phytate được chọn là

bột mì. Hariprasad & Niranjana (2008) bột đậu được xem là nguồn phytate khi nuôi các dòng vi khuẩn nốt rễ trong môi trường lỏng.

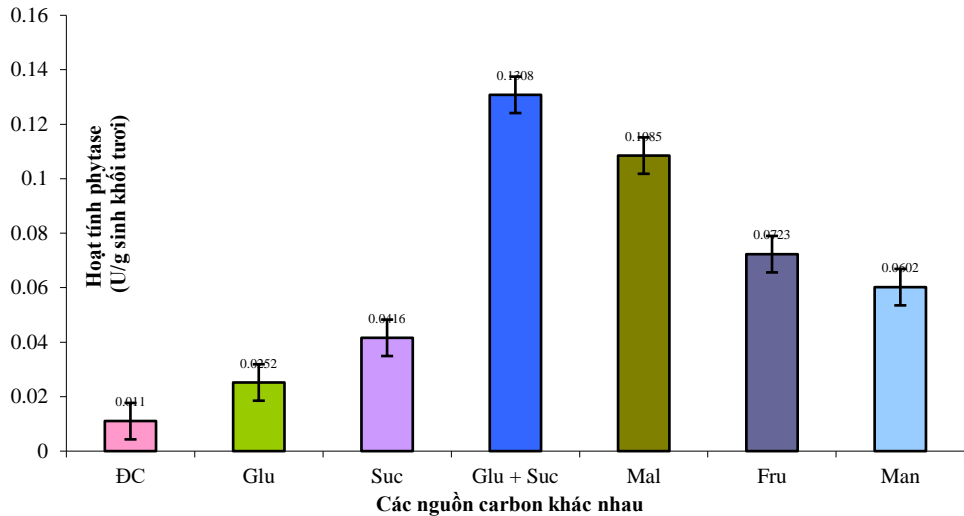


**Hình 4.** Hoạt tính phytase của dòng N1a trong môi trường bán rắn và lỏng với các nguồn phytate khác nhau

**3.5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon và nồng độ carbon đến khả năng tổng hợp phytase từ vi khuẩn *P. stutzeri***

Theo hình 5 cho thấy tỉ lệ glucose : sucrose (1:1) cho khả năng sinh phytase cao nhất với hoạt tính khoảng 0,1308 U/g sinh khối tươi khi bổ sung với nồng độ 0,5%, cao gấp 11,8 lần so với mẫu đối chứng (môi trường không có bổ sung nguồn carbon), sự kết hợp cùng lúc hai nguồn carbon glucose và sucrose đã thúc đẩy hoạt động của vi khuẩn *P. stutzeri*, từ đó làm tăng khả năng tổng hợp phytase.

Kết quả này phù hợp với kết quả của Hosseinkhani et al. (2007) cũng trên đối tượng là *Pseudomonas sp.*, Hariprasad & Niranjana (2008) trên vi khuẩn nốt rễ. Tuy nhiên theo Vats & Banerjee (2002) trên đối tượng là *A. niger* thì glucose được xem là nguồn carbon tốt nhất.

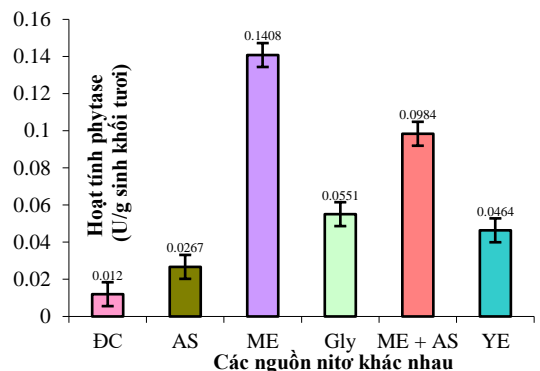


**Hình 5.** Hoạt tính phytase của vi khuẩn N1a với các nguồn carbon khác nhau trên môi trường bán rắn. *Ghi chú:* ĐC: Đối chứng; Glu: Glucose; Suc: Sucrose; Glu + Suc: Glucose + Sucrose; Mal: Maltose; Fru: Fructose; Man: Manitol.

### 3.6. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ và nồng độ nitơ đến khả năng sinh phytase của vi khuẩn *P. stutzeri*.

Hình 6 cho thấy nguồn nitơ thích hợp nhất cho sinh tổng hợp phytase là Malt extract (0,1408 U/g sinh khối tươi) khi bổ sung với nồng độ 0,1%, cao gấp 11,6 lần so với đối chứng (môi trường không bổ sung nguồn nitơ), khác biệt có ý nghĩa với các nguồn còn lại. Điều này có thể giải thích do Malt extract là nguồn cung cấp nitơ dồi dào giúp vi khuẩn tăng trưởng mạnh hơn, tổng hợp phytase nhiều hơn.

Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Hosseinkhani et al. (2007) trên đối tượng là *Pseudomonas sp* và El - Gindy et al. (2009) trên đối tượng *A. niveus*, và *Malbranchea sulfurea* thì nguồn nitơ là yeast extract. Theo Tuyết (2004) thì nguồn nitơ thích hợp cho *A. Niger* NRRL-363 là Amon citrate. Singh & Satyanarayana (2008) trên *Sporotrichum thermophile* thì Ammonium sulfate được sử dụng làm nguồn nitơ.



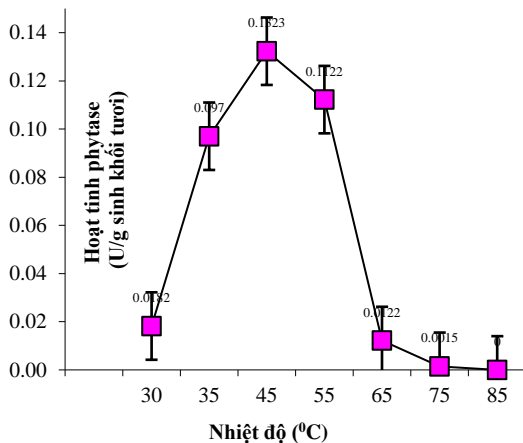
**Hình 6.** Hoạt tính phytase của N1a khi nuôi trong môi trường với các nguồn nitơ khác nhau

*Ghi chú:* ĐC: Đối chứng; AS: Amonium sulfate; ME: Malt extract; Gly: Glycine; ME + AS: Malt extract + Amonium sulfate ; YE: Yeast extract.

### 3.7. Kết quả khảo sát nhiệt độ tối ưu của enzyme phytase thô.

Kết quả ở hình 7 cho thấy phytase từ *P. stutzeri* hoạt động mạnh ở nhiệt độ tương đối cao 45°C với hoạt tính 0,1323 U/g sinh khối tươi. Nhiệt độ này cũng trong khoảng

nhệt độ tối ưu của hầu hết phytase ở vi khuẩn (25 – 70°C) (Tuyết, 2004), trừ *Bacillus* có nhiệt độ cao hơn 70°C. Tuy nhiên cũng có một số dòng *Bacillus subtilis* có enzyme phytase có hoạt tính ở nhiệt độ thấp hơn khoảng 55°C (Kerovuo et al., 1998). Nhiệt độ cao hơn 55°C hoạt tính enzyme giảm rõ rệt và mất hoạt tính hoàn toàn ở 85°C. Nhiệt độ tối ưu của *P. stutzeri* thấp hơn so với *Enterobacter* sp có nhiệt độ tối ưu khoảng 50 - 60°C, *B. Subtilis* N-77 là 60°C và nấm là 58°C (Kim et al., 2002).

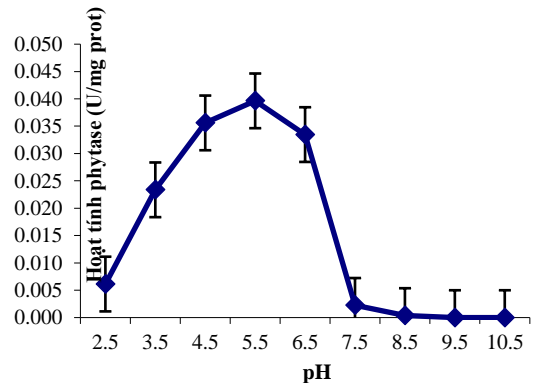


**Hình 7.** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính phytase thô của dòng N1a

### 3.8. Kết quả khảo sát pH tối ưu của enzyme phytase thô từ vi khuẩn *P. Stutzeri*.

Kết quả hình 8 cho thấy phytase thô từ vi khuẩn *P. stutzeri* hoạt động mạnh nhất ở giá trị pH 5,5 (0,04 U/mg prot) và hoạt tính giảm dần ở các giá trị pH cao hơn, mất hoàn toàn hoạt tính ở pH 9,5 và 10,5. Trong khi đó, phytase từ các dòng vi khuẩn khác có khoảng pH tối ưu 6,5 - 7,5, ở *Bacillus* pH tối ưu của phytase là 7 (Kim et al., 2003), riêng ở *Enterobacter* sp. phytase có pH tối ưu là 7,0 - 7,5 (Yoon et al., 1995).

Theo kết quả ở hình 8, nhận thấy phytase từ vi khuẩn có thể chịu được khoảng pH khá rộng từ 2,5-5,5 với hoạt tính giảm khoảng 20% so với trước khi ủ, pH 5,5 cao nhất với hoạt tính còn lại khoảng 88%, giảm 12% hoạt tính so với trước khi ủ 24 giờ, tuy nhiên ở khoảng pH 6,5 giảm hoạt tính đáng kể và mất hoàn toàn hoạt tính ở pH kiềm. pH hoạt động 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. Vì vậy có thể bổ sung phytase vào thức ăn gia súc cho hiệu quả cao (Casey và Walsh, 2002). Howson & Davis (1983) cho rằng khoảng pH bền của phytase là từ 1,8 - 8,0. Kết quả này gần như phù hợp với kết quả của Kim et al. (2003) phytase từ *B. subtilis* có khoảng pH bền là từ 4,0 - 8,0.



**Hình 8.** Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính phytase thô của dòng N1a

## 4. Kết luận

Nghiên cứu đã khảo sát tổng số 225 dòng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri*, tìm ra được 52 dòng có khả năng hòa tan lân hữu cơ (sodium phytate) trên môi trường thạch, trong đó dòng N1a có khả năng hòa tan lân hữu cơ mạnh nhất trên môi trường có bổ sung cơ chất phytate. Nghiên cứu bước đầu

đã khảo sát được các điều kiện môi trường nuôi cấy thích hợp nhất để giúp vi khuẩn có thể tổng hợp được phytase cao nhất. Mặc khác, nghiên cứu cũng đã khảo sát được các điều kiện tối ưu cho hoạt động của phytase như nhiệt độ và pH tối ưu.

Với các kết quả nghiên cứu trên, hoạt tính thu hồi enzyme phytase từ vi khuẩn *P. Stutzeri* tương đối cao, rất thích hợp để bổ sung vào thức ăn chăn nuôi gia súc, giúp cho vật nuôi có thể hấp thu phospho tối đa, giảm

thiếu lượng chất thải từ quá trình chăn nuôi gia súc. Bên cạnh đó, enzyme phytase hiện nay được ly trích từ các nguồn khác như thực vật, động vật có giá thành rất cao. Đề tài bước đầu cung cấp cơ sở nghiên cứu để tiến hành tinh sạch phytase từ vi sinh vật, cung cấp nguồn phytase rẽ tiền hơn, từ đó mở ra hướng ứng dụng bổ sung phytase từ vi sinh vật vào khẩu phần ăn của vật nuôi, mang lại hiệu quả kinh tế cao và giảm ô nhiễm chất thải chăn nuôi.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Tuyết, T. T. (2004). *Thu nhận và khảo sát enzyme phytase của nấm Aspergillus niger NRRL – 363 trong môi trường lên men bán rắn* (Luận văn Thạc sĩ). Đại học Khoa học Tự nhiên.
- Casey, A., & Walsh, G. (2002). Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresource Technology*, 86 (2), 183 - 188. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00145-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00145-1)
- Chunshan, Q., Linghua, Z., Yunji, W., & Yoshiyuki, O. (2001). Production of phytase inslow phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (2), 154 - 160. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80217-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80217-6)
- El - Gindy, A. A., Ibrahim, Z. M., Ali, U. F., & El - Mahdy, O. M. (2009). Extracellular phytase production by solid - state cultures of *Malbranchea sulfurea* and *Aspergillus Niveus* on cost - effective medium. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5 (1), 42 - 62.
- Greiner, R., Konietzny, U. (2006). Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 125 - 140.
- Hariprasad, P., & Niranjana, S. R. (2008). Isolation and characterization of phosphate solubilizing *rhizobacteria* to improve plant health of tomato. *Plant and Soil*, 361 (1), 13 - 24. DOI:10.1007/s11104-008-9754-6
- Heinonen, J. K., & Lahti, R. J. (1981). A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analytical Biochemistry*, 113 (2), 313 - 317. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90082-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90082-8)
- Hosseinkhani, B., Emtiazi, G., & Nahvi, I. (2007). Analysis of phytase producing

- bacteria *Pseudomonas* sp. from poultry faeces and optimization of this enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 8 (17), 4229 - 4232.
- Howson, S. J., & Davis, R. P. (1983). Production of phytate - hydrolyzing enzyme by some fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 5, 377-382. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(83\)90012-1](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(83)90012-1)
- Jorquera, M., Martinex, O., Maruyama, F., Marschner, P., & Mora, M. L. (2008). Current and future biotechnological application of bacterial phytase and phytase - producing bacteria. *Microbes Invironment*, 23, 182 - 191.
- Kerovuoto, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen N., & Apajalahti, J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2079 - 2085.
- Kim, H. W., Kim, Y. O., Lee, J. H., Kim, K. K., & Kim, Y. J. (2003). Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnol Lett*, 25, 1231 - 1234.
- Lalucat, J., Bannasar, A., Bosch, R., García, V. E., & Palleroni, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 70 (2), 510 - 547.
- Liu, B. L., Rafiq, A., Tzeng, Y. M., & Rob, A. (1998). The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme and microbial technology*, 22, 415 - 424.
- Mittal. A., Singh, G., Goyal, V., Yadav, A., Aneja, K., R., Gautam, S., K., Aggarwal, N., K. (2011). Isolation and biochemical characterization of acidothermophilic extracellular phytase producing bacterial strain for potential application in poultry feed. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 4, 273- 282.
- Murphy, J., & Riley, J., P. (1962). A Modified Single Solution Method for the Determination of Phosphate in Natural Waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31 - 36. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Reddy, N., R., Sathe, S., K., Salunkhe, D., K. (1982). Phytates in legumes and cereals. *Advanced in Food Research*, 28, 1 – 9. Doi: 10.1016/s0065-2628(08)60110-x
- Shieh, T. R., & Ware, J. H. (1968). Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Applied Microbiology*, 16, 1348 - 1351.
- Singh, B. & Satyanerayana, T. (2008). Phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and its potential applications. *Bioresource Technology*, 99, 2824 - 2830.
- Vats, P., & Banerjee, U. C. (2002). Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* var teigham obtained from rotten wood – logs. *Proceed Biochemistry*, 38, 211 - 217.
- Yoon, S. J., Choi, Y. J., Min, H. K., Cho, K. K., Kim, J. W., Lee, S. C. & Jung, Y. H. (1995). Isolation and identification of phytase – producing bacterium *Enterobacter* sp. and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 449 - 454