

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN SINH TỔNG HỢP PHYTASE NGOẠI BÀO

Nguyễn Văn Giang*, Trần Thị Đào, Đinh Quang Hiếu,
Đặng Ngọc Bích, Trần Thị Cẩm Tú, Bùi Thị Hằng

Khoa Công nghệ sinh học - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Địa chỉ email tác giả liên lạc: nvgiang@hua.edu.vn

Ngày gửi bài: 15.05.2013 Ngày chấp nhận: 16.08.2013

TÓM TẮT

Phytase có tác dụng thủy phân acid phytic thành phospho và myo-inositol. Phytase tồn tại rộng rãi trong tự nhiên và có thể được tìm thấy trong mô thực vật, một số mô động vật và vi sinh vật. Trong đó, phytase từ vi sinh vật có tiềm năng lớn trong ứng dụng sản xuất ở quy mô công nghiệp. Việc bổ sung phytase vào thức ăn chăn nuôi làm giảm chi phí thức ăn bằng cách loại bỏ hoặc làm giảm sự cần thiết phải bổ sung phospho vô cơ và tăng phospho sinh học trong hệ tiêu hóa của động vật dạ dày đơn. Đất ở khu vực chuồng trại chăn nuôi lợn, gà thuộc trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội-Gia Lâm-Hà Nội được sử dụng làm nguồn phân lập vi khuẩn sinh phytase. Trên môi trường PSM, sáu chủng vi khuẩn có khả năng sinh phytase đã được phân lập. Chủng M₄ có khả năng sinh phytase ngoại bào mạnh nhất. Dựa trên các đặc điểm hình thái và hoá sinh, chủng M₄ bước đầu được xác định thuộc chi *Bacillus* spp.

Từ khóa: *Bacillus* spp., phytase, PSM.

Isolation and Screening of Extracellular Phytase Producing Bacteria**ABSTRACT**

Phytases are enzymes hydrolyzing phytic acid to release inorganic phosphate and myo-inositol. Phytase produced by microorganisms have potential industrial applications. The supplementation of animal feed with phytases reduces the cost of diets by removing or reducing the need for supplemental inorganic phosphate and increases the bioavailability of phosphorous in monogastric animals. In this study, soil close to pig and chicken farms at Ha Noi university of agriculture was used as a source material for isolating phytase producing bacteria. On PSM medium, six bacterial isolates having potential phytase production were isolated. Among these, M₄ isolate showed maximum phytase activity. M₄ isolate was biochemically characterized as *Bacillus* spp.

Keywords: *Bacillus* spp., phytase, PSM.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phytase có tác dụng thủy phân acid phytic (là dạng dự trữ phospho trong nhiều loại ngũ cốc, phần hoa, các loại đậu và hạt cây có dầu) tạo thành phospho và myo-inositol. Phytase phân bố rộng rãi trong tự nhiên và có thể được tìm thấy trong mô thực vật, một số mô động vật và vi sinh vật. Trong đó, phytase từ vi sinh vật có tiềm năng lớn trong ứng dụng sản xuất ở quy mô công nghiệp (Oh and In, 2009). Một số loài vi khuẩn sinh phytase đã được nghiên cứu như *Bacillus* sp. (Kim và cộng sự, 1998), *Escherichia*

coli (Choi et al., 2002), *Enterobacter* (Yoon et al., 1996), *Lactobacillus* (Angelis et al., 2003), *Klebsiella* (Greiner et al., 1997), *Pseudomonas* (In et al., 2004), *Citrobacter* (Kim et al., 2003).

Tỷ lệ phospho trong acid phytic/phospho tổng số của đậu tương là 60%, ở ngô là 72% và ở lúa mì là 77%. Các động vật dạ dày đơn chỉ tiêu hóa một phần nhỏ acid phytic, còn phần lớn bài tiết ra ngoài, gây ô nhiễm phosphophytate trong môi trường. Hơn nữa, acid phytic cũng được xem là chất kháng dinh dưỡng đối với K⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ và một số dạng phức hợp của protein (Phạm Thị Trân Châu, 2007). Vì vậy, việc bổ

sung phytase vào thức ăn chăn nuôi, một mặt làm tăng giá trị dinh dưỡng của thức ăn, giảm tác dụng kháng dinh dưỡng của acid phytic, mặt khác còn làm giảm ô nhiễm môi trường. Bên cạnh việc sử dụng như một chất phụ gia thức ăn, phytase còn có các ứng dụng trong y tế như phòng ngừa các biến chứng bệnh tiểu đường (Craxton et al., 1997), chống viêm và chống ung thư thông qua sự hình thành các phosphate myo-inositol (Maffucci et al., 2005). Hơn nữa, phytase cũng đóng vai trò quan trọng trong ngành công nghiệp giấy và bột giấy (Liu et al., 1998).

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về phytase và các ứng dụng của nó còn chưa nhiều, chưa đa dạng về đối tượng nghiên cứu. Do đó, vấn đề phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp phytase ngoại bào để bổ sung vào thức ăn chăn nuôi là rất cần thiết.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu đất xung quanh khu vực chăn nuôi lợn và gà của Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Lấy mẫu và xử lý mẫu đất

Mẫu đất thí nghiệm được lấy ở độ sâu 0-10cm xung quanh khu chuồng trại chăn nuôi lợn và gà bằng dụng cụ lấy mẫu chuyên dụng hình chữ T có chia vạch. Mẫu đất được đựng trong túi nilon sạch, dán nhãn, ghi tên mẫu, vị trí lấy mẫu, ngày lấy mẫu, người lấy mẫu. Mẫu đất được làm khô tự nhiên trong không khí, tránh ánh nắng trực tiếp. Đất sau khi phơi khô được nghiền nhỏ, rây qua sàng 2mm.

2.2.2. Phân lập vi khuẩn có khả năng sinh phytase ngoại bào

Môi trường sử dụng để phân lập vi khuẩn có khả năng sinh phytase ngoại bào là môi trường PSM (Phytase screening medium), chứa glucose 1,5%, natri phytate 0,1%, NH_4NO_3 0,2%, KCl 0,05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, MnSO_4 0,05%, FeSO_4 0,03%, agar 2%, pH= 7. Một gram bột đất

mịn được bổ sung vào bình tam giác ($V=250\text{ml}$) chứa 100ml nước cất đã được hấp khử trùng, lắc 200 vòng/phút trong 30 phút, được dung dịch đất có nồng độ 10^{-2} . Pha loãng dung dịch đất từ nồng độ 10^{-2} sang các nồng độ 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Dùng micropipette hút 50 μl dịch đất ở các độ pha loãng cấy trải trên các đĩa petri chứa sẵn môi trường PSM, ủ ở 37°C từ 3-5 ngày. Vi khuẩn có khả năng sinh phytase ngoại bào phân giải cơ chất phytate trong môi trường hình thành vòng sáng xung quanh khuẩn lạc đơn.

Hoạt tính phân giải phytate được xác định theo Stephen Joseph và Jisha (2008):

$$x (\%) = \frac{(D - d)}{D} \times 100$$

Trong đó: x: hoạt tính phân giải phytate (%), D: đường kính vòng phân giải (mm), d: đường kính khuẩn lạc (mm).

2.2.3. Đánh giá một số đặc điểm sinh học của các chủng phân lập được

Các chủng vi khuẩn phân lập được được đánh giá đặc điểm hình thái khuẩn lạc theo Idriss et al. (2002), các thử nghiệm hóa sinh được thực hiện theo Bergey (1957).

2.2.4. Xác định hoạt độ phytase của các chủng vi khuẩn phân lập

Hoạt độ phytase được xác định theo Kerovuo et al. (1998). Chủng vi khuẩn phân lập được nuôi trong ống nghiệm chứa 5ml môi trường PSM lỏng, lắc 200 vòng/phút, ở 37°C , sau 24h tiếp giống sang bình tam giác ($V=250\text{ml}$) chứa 100ml môi trường PSM lỏng sao cho OD_{600} trong bình nuôi đạt 0,05, lắc 200 vòng/phút, ở 37°C . Sau 3 ngày nuôi, dịch nuôi vi khuẩn được ly tâm 10000 vòng/phút, 5 phút, ở 4°C thu dịch trong. 0,1ml dịch trong được bổ sung vào ống nghiệm chứa 0,4ml natri phytate 1% được pha trong đệm Tris-HCl 0,1M pH=7, trộn đều, ủ 37°C , 30 phút. Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 0,5ml dung dịch TCA 5%. 1ml dung dịch thuốc thử phosphate (là hỗn hợp của dung dịch ammonium molipdat 1,5% pha trong dung dịch H_2SO_4 5,5% và dung dịch FeSO_4 5% theo tỷ

lệ 4:1) được bổ sung vào ống nghiệm, lắc đều, để ổn định 10 phút, so màu ở bước sóng 700nm. Ống đối chứng enzyme bị bất hoạt bằng cách bổ sung 0,5ml dung dịch TCA 5% trước khi bổ sung natri phytate. Cường độ màu tỷ lệ với hàm lượng phospho trong dung dịch. Nồng độ phospho được xác định thông qua đường chuẩn với chất chuẩn là K_2HPO_4 có nồng độ từ 0-500 μ M. 1 đơn vị hoạt độ (U) được định nghĩa là lượng enzyme xúc tác giải phóng 1 μ mol phospho vô cơ trong 1 phút ở điều kiện tối ưu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn sinh phytase ngoại bào

Vùng rễ của cây trồng nông nghiệp, đặc biệt là vùng rễ cây họ đậu là nguồn giàu vi khuẩn sinh phytase (Sasirekha et al., 2012). Hệ tiêu hóa của động vật dạ dày đơn như lợn và gia cầm không chứa vi khuẩn sinh phytase. Do đó, acid phytic không tiêu hóa được bài tiết ra ngoài theo phân. Vì vậy, đất ở khu vực chăn nuôi lợn và gia cầm thu hút một lượng lớn vi khuẩn sinh

phytase (Baharak Hosseinkhani et al., 2009). Từ mẫu đất ở trang trại chăn nuôi gia cầm, trên môi trường PSM, Baharak Hosseinkhani et al. (2009) đã phân lập được 4 mẫu vi khuẩn sinh phytase ngoại bào được ký hiệu lần lượt là S_1 , S_2 , S_3 và S_4 , trong đó, chủng S_1 sinh phytase ngoại bào mạnh nhất. Từ 4 mẫu đất ở các trang trại chăn nuôi gia cầm, trên môi trường dịch chiết cám mì được sử dụng làm nguồn cơ chất phytate, Sreedevi và Reddy (2013) đã phân lập được 8 mẫu vi khuẩn sinh phytase ngoại bào.

Mẫu đất được pha loãng đến nồng độ 10^{-4} , 10^{-5} . 50 μ l dịch pha loãng được cấy trải trên môi trường PSM. Sau khi ủ ở 37°C, 3 ngày, thu được 6 khuẩn lạc khác nhau (được gọi là chủng phân lập) có vòng phân giải trắng trong xung quanh khuẩn lạc, được ký hiệu là M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , M_5 , M_6 . 6 chủng vi khuẩn được cấy rìa trên môi trường LB đặc, ủ 37°C. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng phân lập sau 2 ngày nuôi cấy được mô tả ở bảng 1. Tế bào của các chủng vi khuẩn này đều có dạng hình que, xếp từng đôi hay riêng lẻ, trừ chủng M_2 có tế bào hình cầu, kết thành chuỗi.

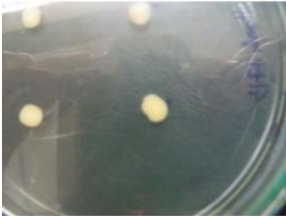
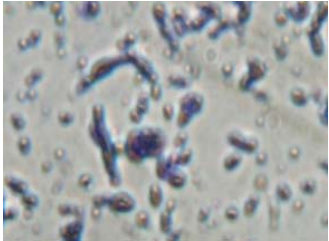
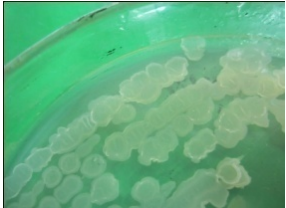
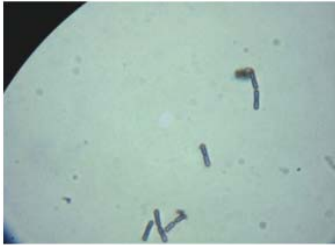


Hình 1. Khuẩn lạc M_4 trên môi trường PSM



Hình 2. Khuẩn lạc M_4 trên môi trường LB

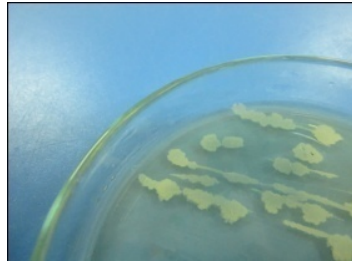
Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào các chủng vi khuẩn phân lập được

Chủng phân lập	Màu sắc khuẩn lạc	Hình thái khuẩn lạc	Hình ảnh khuẩn lạc	Gram	Hình dạng tế bào	Hình ảnh tế bào
M ₁	Cam nhạt	Tròn, bóng, bề mặt nhẵn		-	Trực khuẩn, tồn tại riêng lẻ	
M ₂	Nâu nhạt	Tròn, to, bề mặt hơi nhăn		+	Cầu khuẩn, tồn tại thành chuỗi	
M ₃	Trắng kem	Tương đối đều, bề mặt nhẵn, hơi nhầy, mép lượn sóng		+	Trực khuẩn, tồn tại riêng lẻ, từng đôi hoặc thành chuỗi	

M₄

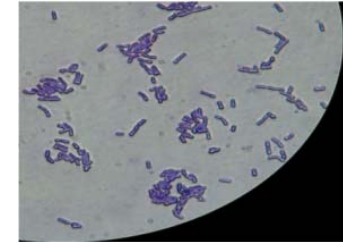
Xám

Không đều, bề mặt
nhẵn, khô, mép lượn
sóng



+

Trực khuẩn, tồn tại riêng rẽ,
từng đôi hoặc thành từng
đôi



M₅

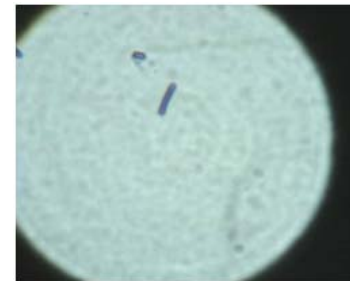
Trắng

Dạng sợi, bề mặt nhầy



+

Trực khuẩn, tồn tại riêng lẻ



M₆

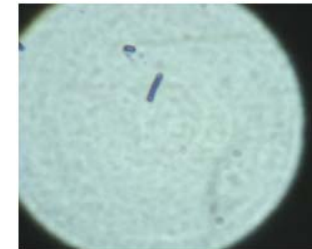
Da cam

To, đều, trơn, bóng,
nhẵn, lồi



+

Trực khuẩn, tồn tại riêng lẻ



3.2. Xác định hoạt độ phytase của các chủng phân lập

Tiến hành sàng lọc các chủng vi khuẩn phân lập có khả năng sinh phytase ngoại bào tốt nhất, chúng tôi đã chọn được chủng M₄ có hoạt tính phân giải phytate đạt 88,89%, cao hơn tất cả các chủng còn lại; tiếp đến là chủng M₃ có hoạt tính phân giải phytate đạt 80,77%. Hoạt độ phân giải phytate của chủng M₄ cao nhất, đạt 19 U/ml (Bảng 2).

Chủng vi khuẩn M₄ tiếp tục được lựa chọn để xác định các đặc điểm hóa sinh: khả năng sinh bào tử, khả năng phân giải tinh bột,

khả năng phân giải gelatin, metyl red, catalase (Bảng 3). Kết hợp các đặc điểm hình thái và hóa sinh, theo khóa phân loại Bergey (1957), chủng vi khuẩn M₄ thuộc chi *Bacillus* sp. Phytase từ các loài vi khuẩn *Bacillus* có tính chất sinh lý phù hợp trong hệ tiêu hóa động vật, có tính bền nhiệt cao, tính đặc hiệu cơ chất nghiêm ngặt (Oh et al. (2004). Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi, chủng M₄ chịu được nồng độ muối và dịch mật khá cao. Do vậy, phytase từ các loài *Bacillus* được coi là ứng cử viên lý tưởng cho hướng ứng dụng trong thức ăn chăn nuôi.

Bảng 2. Hoạt tính và hoạt độ thủy phân phytate của các chủng vi khuẩn phân lập được

Chủng vi khuẩn phân lập	Đường kính vòng phân giải (D, mm)	Đường kính khuẩn lạc (d, mm)	Hoạt tính (%)	Hoạt độ (U/ml)
M1	2,0	1,5	25,0	4,0
M2	2,5	2,0	20,0	1,5
M3	26	5,0	80,8	16,2
M4	27	3,0	88,9	18,7
M5	2,5	2,0	20,0	1,8
M6	8,0	2,0	75,0	11,3

Bảng 3. Một số đặc điểm hóa sinh của chủng vi khuẩn M₄

Đặc điểm hóa sinh	Kết quả	
Khả năng sinh bào tử	+	
Khả năng thủy phân tinh bột	+	
Khả năng sinh trưởng ở các nồng độ dịch mật khác nhau (%)	0-70	+
	80	-
Khả năng sinh trưởng ở nồng độ NaCl 6,5%	+	
Khả năng phân giải gelatin	+	
Methyl red	+	
Catalase	+	
Mẫu vi khuẩn phân lập dự kiến	<i>Bacillus</i> sp.	

4. KẾT LUẬN

Đã phân lập và xác định đặc điểm hình thái khuẩn lạc của 6 chủng vi khuẩn có khả năng sinh phytase ngoại bào, trong đó chủng vi khuẩn phân lập M₄ có khả năng sinh phytase ngoại bào mạnh nhất trên môi trường PSM với hoạt độ phytase đạt 19U/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Phạm Thị Trân Châu (2007). Công nghệ sinh học tập 3- Enzyme và ứng dụng. Nhà xuất bản Giáo dục.
- Angelis M.D, Gallo G, Corbo M.R, McSweeney P.L.H, Faccia M. (2003). Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. International Journal of Food Microbiology 87: 259-270.
- Baharak Hosseinkhani, Giti Emtiazi and Iraj Nahvi, (2007). Analysis of phytase producing bacteria (*Pseudomonas* sp.) from poultry faeces and optimization of this enzyme production. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (17): 4229-4232.
- Baharak Hosseinkhani, Giti Emtiazi, Iraj Nahvi (2009). Analysis of phytase producing bacteria (*Pseudomonas* sp.) from poultry faeces and optimization of this enzyme production. African Journal of Biotechnology 8 (17): 4229-4232.
- Choi W.C, Oh B.C, Kim H.K, Kang S.C, Oh T.K. (2002). Characterization and cloning of a phytase from *Escherichia coli* WC7. Korean Journal of Microbiology and Biotechnology 30: 1-7.
- Craxton A., Caffrey J. J., Burkhart W., Safrany S. T. & Shears S. B. (1997). Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase. Biochem. J., 328:75-81.
- Greiner R, Konietzny U, Jany K.D. (1993). Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. Archives of Biochemistry and Biophysics 303: 107-113.
- Idriss E. E., Makarewicz O., Farouk A, Rosner K., Greiner R., Bochow H., Richter T. and Idriss R.B. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. Microbiology, 148: 2097-2109.
- In N.J, Jang E.S, Kim Y.J, Oh N.S. (2004). Purification and properties of an extracellular acid phytase from *Pseudomonas fragi* Y9451. Journal of Microbiology and Biotechnology 14: 1004-1008.
- Kim Y.O, Kim H.K, Bae K.S, Yu J.H, Oh T.K. (1998). Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. Enzyme and Microbial Technology 22: 2-7.
- 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*. Biotechnology Letters 25: 1231-1234.
- Kerovuo J., Lauraeus M., Nurminen P., Kalkkinen N. and Apajalahti J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a Novel Phytase from *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2079-2085.
- Liu B. L., Rafiq A., Tzeng Y. M. & Rob (1998). The induction and characterization of phytase and beyond. Enzyme Microbiol. Technol., 22:415-424.
- Maffucci T., Piccolo E., Cumashi A., Lezzi M., Riley A. M., et al. (2005). Inhibition of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway by inositol pentakisphosphate results in antiangiogenic and antitumor effects. Cancer Res., 65: 8339-8349.
- Oh B.C., Choi W.C., Park S., Kim Y.O. and Oh T.K., (2004). Biochemical properties and substrate specificity of alkaline and histidine acid phytases. Applied Microbiology and Biotechnology, 63: 362-372.
- Oh N.S and In M.J. (2009). Phytate degradation by *Leuconostoc mesenteroides* KC51 cultivation in soymilk. African Journal of Biotechnology 8 (13): 3023-3026.
- Robbert et al. (1957). Bergey's manual of determinative bacteriology, 7th edition. The William and Wilkins company.
- Sasirekha.B., 2012. Optimization and partial purification of extracellular phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6. European Journal of Experimental Biology(1):95-104.
- Sreedevi S. and B.N. Reddy (2012). Isolation, screening and optimization of phytase production from newly isolated *Bacillus* sp.c43. IJPBS 2 (2):218-231.
- Stephen Joseph & Jisha M. S. (2008). Phosphate solubilisation efficiency. J. Agri. Environ. Sci., 4: 110-112.
- Yoon S.J, Choi Y.J, Min H.K, Cho K.K, Kim J.W., (1996). Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp.4 and enzymatic properties of phytase enzyme. Enzyme and Microbial Technology 18(6): 449-45.