

## THÔNG TIN VỀ LUẬN VĂN THẠC SĨ

1. Họ và tên học viên: Phan Thị Thu Mai
2. Giới tính: Nữ
3. Ngày sinh: 12/06/1987
4. Nơi sinh: Tp Nam Định
5. Quyết định công nhận học viên số: 3568/QĐ-KHTN-CTSV, ngày 31/12/2009
6. Các thay đổi trong quá trình đào tạo:
7. Tên đề tài luận văn: “Phân lập tuyển chọn vi sinh vật sinh enzyme phytase”
8. Chuyên ngành: Vi sinh vật
9. Mã số: 60 42 40
10. Cán bộ hướng dẫn khoa học: TS Đào Thị Lương, Viện Vi sinh vật và công nghệ sinh học- Đại học Quốc gia Hà Nội.
11. Tóm tắt các kết quả của luận văn:

- Từ 3 bộ giống phân lập được từ Sapa (274 chủng), Ba Vì (34 chủng) và Phú Quốc (38 chủng), sàng lọc được 91 chủng chịu nhiệt có khả năng sinh trưởng được ở 40°C. Các chủng này được sàng lọc khả năng sinh enzyme phytase trên môi trường PSM và khả năng bền nhiệt của phytase đã chọn được chủng SP1901 có hoạt tính phytase cao và bền ở 60°C (3,9 U/g và hoạt tính phytase giữ được 90% sau 30 phút xử lý ở 60°C). Môi trường lên men dịch thể kích thích sinh phytase cũng được nghiên cứu tuy nhiên hoạt tính phytase rất thấp (0,68 U/g) và việc sử dụng cơ chất tinh khiết đắt tiền nên chúng tôi không lựa chọn lên men dịch thể để sản xuất phytase.

- Chủng SP 1901 được định danh là loài *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* dựa trên phân tích trình tự ADNr 16S và trình tự kết nối của 6 gen *gyrA*, *rpoB*, *purH*, *polC*, *groEL*, 16S rRNA.

- Điều kiện nhân giống thích hợp của chủng SP1901: môi trường thạch thường ở 40°C, pH 5,98, điều kiện hiếu khí sau 16-24h nuôi cấy.

- Điều kiện lên men xộp thích hợp của chủng SP1901 cho hoạt tính phytase cao nhất: cơ chất là ngô vỡ (đạt 4,68 U/g), độ ẩm là 50%, tỷ lệ cấy giống phù hợp nhất là từ 10-20% và sau 84h nuôi cấy, nguồn cacbon là lactose, glycerol, sucro, CMC và nguồn nitơ là ure có ảnh hưởng dương tính đến hoạt tính phytase. Các nguồn nitơ là amonisu phosphate và peptone có ảnh hưởng âm tính đến hoạt tính phytase. Ion  $Ca^{2+}$  có vai trò rất quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp phytase. Nồng độ  $Ca^{2+}$  bổ sung thích hợp là từ 0,2-0,8%.

- Thu hồi enzyme cũng được tiến hành bằng các loại dung dịch chiết khác nhau: Triton X100 1%, NaCl 50mM, SDS 1 %, Tween 20 1%, Tris HCl pH 7, nước cất, nước máy trong đó SDS1% và nước máy cho hiệu quả chiết xuất cao nhất (5,74 và 5,54 U/g). Phytase bị mất hoạt tính hoàn toàn ở tất cả các phân đoạn khi rửa bằng amoniumsulfate, với cồn và acetone, phytase rửa nhiều nhất ở nồng độ 70%.

- Đặc tính enzyme phytase của chủng SP1901: phytase của chủng bền ở 60°C (giữ được 90% hoạt tính sau 30 phút xử lý ở 60°C), hoạt động tối ưu ở pH 5,6-7,2 và 50°C. Sự có mặt của Ca<sup>2+</sup> và Cu<sup>2+</sup> làm tăng nhẹ hoạt tính phytase và sự có mặt EDTA từ 2 mM trở lên làm ức chế hoàn toàn hoạt tính phytase. Ca<sup>2+</sup> làm tăng độ bền nhiệt của phytase ở 60°C và 70°C. Khả năng bền nhiệt của phytase trên cơ chất sấy khô tăng đáng kể. Phytase của chủng SP1901 bền với enzyme tiêu hóa trypsin 0,1 mg/ml pH 8 và mẫn cảm với pepsine 10 mg/ml pH 3.

12. Khả năng ứng dụng trong thực tiễn: chủng vi khuẩn nghiên cứu là vi khuẩn an toàn có thể bổ sung trực tiếp vào thức ăn chăn nuôi cung cấp phytase và là nguồn probiotic.

13. Những hướng nghiên cứu tiếp theo: tinh sạch enzyme để sản xuất enzyme dưới dạng các chế phẩm thương mại, tìm kiếm các khả năng sinh các loại enzyme khác nhau của chủng nghiên cứu.

14. Các công trình đã công bố có liên quan đến luận văn:

- Bài báo “Tối ưu hóa điều kiện lên men xộp thích hợp cho khả năng sinh phytase bền nhiệt của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. SP1901”, tạp chí Di truyền học và ứng dụng, số 8 năm 2012.

- Poster “Production and characterization of thermostable phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* SP1901 isolated from Hoang Lien National Park soil”. Hội thảo khoa học quốc tế *The Young Scientist Seminar 2012*, ngày 4-5/10/2012

Ngày 12 tháng 12 năm 2012

**Học viên**

**Phan Thị Thu Mai**

## INFORMATION ON MASTER'THESIS

1. Full name: Phan Thi Thu Mai
2. Sex: Female
3. Date of birth: 12/06/1987
4. Place of birth: Nam Dinh City
5. Admission decision number: 3568/QĐ-KHTN-CTSV Dated: 31/12/2009
6. Changes in academic process:
7. Official thesis title: "Isolation, selection phytase-producing microbe"
8. Major: Microbiology
9. Code: 60 42 40
10. Supervisors: Doctor Dao Thi Luong, Institute of Microbiology & Biotechnology-Vietnam National University , Hanoi
11. Summary of the finding of the thesis:
  - From total 3 collections of bacteria isolated in Sa Pa (274 strains), Ba Vi (34 strains), Phu Quoc (38 strains), we screened 91 thermophilic bacteria strains which can grow at 40°C. These strains were screened on PSM and tested thermostability then we selected SP1901 strain which have high phytase activity and quite thermostable at 60°C (remain 90% phytase activity at 60°C/30 minutes). Submerge fermentation which stimulated phytase synthesis, was tested but phytase activity is very low and these media use pure chemical (Sodium phytate- Sigma) is very expensive, so that we didn't choose submerge fermentation for the next study.
  - SP1901 strain was identified as *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* based on six genes *gyrA*, *rpoB*, *purH*, *polC*, *groEL* and 16S rRNA.
  - Optimal culture conditions: normal agar media, temperature 40°C, pH 5.98, aerobic and the highest biomass reached after 16-24h.
  - Optimal solid state fermentation conditions for the highest phytase activity: potential substrate: broken corn (reach 4.68U/g), moisture level: 50%, inoculum size: 10-20% and 84h of incubation time. Cacbon source: lactose, glycerol, sucro, CMC and nitrogen source: ure had positive affects on phytase activity. Amonisunphate and peptone had negative affects on phytase activity. Ca<sup>2+</sup> plays an important role in phytase synthesis, especially at concentration from 0.2-0.8%.
  - Enzyme recovery was carried out with different buffer such as: Triton X100 1%, NaCl 50mM, SDS 1 %, Tween 20 1%, Tris HCl pH 7, distilled water and tap water. Among

them, SDS 1% and tap water gave the highest recovery effect. Phytase lost all activity after precipitate with ammonium sulphate. Phytase activity remain partially activity after precipitate with acohol and acetone 70%.

- Crude phytase characterization: phytase is stable after 30 minutes treated at 60°C (remains about 90% activity), optimal pH 5.6-7.2 and 50°C. The presence of Ca<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> increase slightly phytase activity and EDTA at 2mM represses entired phytase activity. Thermostability of phytase in dried substrate increases aignificantly. Phytase of SP1901 is stable with trypsin 1mg/ml pH 8 and quite sensitive with pepsine 10mg/ml pH 3.

12. Practical applicability: strain SP1901 can be added in feed as phytase-providing source and probiotic source (strain SP1901 is GRAS)

13. Further research directions: purification phytase from SP1901 in order to manufacture commercial enzyme, screening other enzymes produced by strain SP1901.

14. Thesis-related publications:

- Paper “Optimization solid-state fermentation conditions for thermostable phytase production in *Bacillus* sp. SP1901 strain”, Genetics and Application Magazine (Viet Nam), No 8, 2012.

- Poster “Production and characterization of thermostable phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* SP19.1 isolated from Hoang Lien National Park soil”. The Young Scientist Seminar 2012, *Hanoi Meeting, October 4 -5<sup>th</sup>, 2012.*

Date: 12/12/2012

**Student**

**Phan Thi Thu Mai**