

PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN (*PHYA*) MÃ HÓA PHYTASE THÀNH THỰC TỪ MỘT SỐ CHỦNG *ASPERGILLUS NIGER*

Ngô Thanh Xuân^{1,2,3}, Mai Thị Hằng², Nguyễn Phương Linh^{1,2}, Đinh Thị Mỹ Hằng¹, Vũ Nguyễn Thành¹

¹Viện Công nghiệp Thực phẩm

²Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

³Trường Cao đẳng Công đồng Lào Cai

TÓM TẮT

Phytase (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) là enzyme thủy phân acid phytic được tổng hợp bởi thực vật và vi sinh vật. Phytase từ *Aspergillus niger* hoạt động ở pH thấp và đang được ứng dụng phổ biến trong thức ăn chăn nuôi. Trong nghiên cứu này, phân đoạn mã hóa protein thành thực của phytase (*phyA*) từ genome của 10 chủng *A. niger* được tách dòng và 9 trong số đó được giải trình tự. Phân đoạn khảo sát có độ dài 1344 bp, mã hóa cho 448 amino acid. Trong phân đoạn này, trình tự nucleotide giữa các chủng có độ tương đồng 99,7% - 92,1 với từ 3 đến 106 nucleotide khác biệt. Phân tích trình tự amino acid suy diễn từ trình tự nucleotide cho thấy, phytase của các chủng *A. niger* khảo sát có thể không bền nhiệt. Phytase từ các chủng CNTP 5150, CNTP 5149, CNTP 5033 và CNTP 5091 có ưu điểm hoạt động ở pH thấp và hoạt tính đặc hiệu với acid phytic cao. Dựa theo độ tương đồng, các phytase khảo sát có thể được xếp vào 4 nhóm phytase đã công bố cho *A. niger*. Trình tự gen mã hóa *phyA* của các chủng *A. niger* khảo sát được đăng ký trên GenBank với các mã số HM369362, HM369363, HM369364, HM369365, HM369366, HM369368 và HM369369 tương ứng với các chủng *A. niger* CNTP 5150, CNTP 5148, CNTP 5149, CNTP 5032, CNTP 5033, CNTP 5090 và CNTP 5091

Từ khóa: *Aspergillus niger*, gene *phyA*, phân tích trình tự, phytase thành thực

MỞ ĐẦU

Phytase là enzyme phân giải acid phytic acid (*myo*-inositol hexophosphate), một dạng dự trữ phosphor chủ yếu của các cây họ đậu, cây ngũ cốc và cây cho hạt lấy dầu, đồng thời giải phóng phosphor vô cơ (Kerovuo, 2000; Vohra, Satyanarayana, 2003). Động vật dạ dày đơn như gia cầm, lợn, cá không có khả năng sản sinh phytase trong đường tiêu hóa. Việc bổ sung phytase vào thức ăn chăn nuôi sẽ giúp động vật hấp thu được phosphor ngay trong chính thành phần của thức ăn, giảm chi phí bổ sung phosphor vô cơ, đồng thời giúp vật nuôi tăng trọng và tránh nguy cơ gây ô nhiễm môi trường (Cromwell *et al.*, 1993). Ngoài ứng dụng trong chăn nuôi phytase còn được ứng dụng trong công nghiệp giấy, sản xuất được phẩm, cải tạo đất trồng và thực phẩm dành cho người (Kerovuo, 2000; Vohra, Satyanarayana, 2003). Ở Việt Nam hiện nay phytase hầu hết được nhập khẩu, vì vậy sản xuất phytase trong nước đang là mục tiêu của nhiều nghiên cứu.

Nguồn phytase từ vi sinh vật có những tiềm năng ứng dụng to lớn. Đặc biệt phytase từ *A. niger*

hoạt động ở pH thấp thường được sản xuất, ứng dụng cho chăn nuôi (Al Asheh, Duvnjak, 1994; Berka *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 1999; Shimizu, 1993; Xiong *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Ở nước ta, việc tách dòng và giải trình tự gen mã hóa phytase mới được thực hiện ở *Bacillus subtilis* (Đỗ Thị Ngọc Huyền, 2007, Nguyễn Văn Việt, 2008). Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên chúng tôi phân lập gen *phyA* thành thực từ *A. niger* để tạo chủng tái tổ hợp, sản xuất phytase giá thành thấp thay thế cho phytase nhập ngoại.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật và plasmid

Mười chủng nấm mốc được tiếp nhận từ Bộ Sưu tập giống của Viện Công nghiệp Thực phẩm (9) và Bộ Sưu tập giống của Bộ môn Công nghệ sinh học - Vi sinh, trường Đại học Sư phạm Hà Nội (1) (Bảng 1). *E. coli* DH5 α và vector pPICZ α (Invitrogen) và pTZ57R/T (T7A) (Fermentas) được sử dụng để nhân dòng gen mã hóa phytase thành thực.

Bảng 1. Mười chủng *A. niger* sử dụng để nhân dòng *phyA* thành thực.

Tên trong Bộ sưu tập	Tên gốc	Phân loại sơ bộ	Nguồn gốc
CNTP 5032	599	<i>A. niger</i>	Viện Công nghiệp thực phẩm
CNTP 5033	1920F	<i>A. niger</i>	Viện Công nghiệp thực phẩm
CNTP 5034	770	<i>A. niger</i>	Viện Công nghiệp thực phẩm
CNTP 5037	1923F2	<i>A. niger</i>	Viện Công nghiệp thực phẩm
CNTP 5089	JCM 1922	<i>A. niger</i>	Nhật Bản
CNTP 5090	JCM 1925	<i>A. niger</i>	Nhật Bản
CNTP 5091	JCM 2261	<i>A. niger</i>	Nhật Bản
CNTP 5148	C5P	<i>A. niger</i>	Viện Công nghiệp thực phẩm
CNTP 5149	V80	<i>A. niger</i>	Viện Công nghiệp thực phẩm
CNTP 5150	XP	<i>A. niger</i>	Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Tách chiết DNA genome và plasmid

Genome từ *A. niger* được tách chiết và tinh sạch bằng kit QIAEX II (Qiagen, Mỹ). Nấm mốc được nuôi cấy trên môi trường malt agar (1% malt extract; 1% glucose; 2% agar) trong 3-5 ngày ở 30°C. Bào tử được thu bằng 2 ml dung dịch chứa 0,1% Tween 80. Sau đó, 0,5 ml dịch bào tử được chuyển vào bình tam giác chứa 10 ml YM (0,3% malt extract; 0,3% yeast extract; 0,5% peptone; 1% glucose) và nuôi lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong 8 - 16 h. Sau đó 1 ml mầm bào tử được chuyển vào ống Eppendorf 1,5 ml và ly tâm 1 phút với 12000 vòng/phút. Sinh khối được rửa bằng nước cất thanh trùng và bổ sung 0,75 ml 2x SSC (0,3 M NaCl; 30 mM CH₃COONa; pH 7), trộn đều rồi ủ 20 phút ở 99°C. Toàn bộ dịch và tế bào được chuyển sang ống Eppendorf mới và ly tâm 1 phút ở 12000 vòng/phút, loại bỏ dịch phía trên. Sinh khối được rửa bằng nước cất, sau đó bổ sung 100 µl phenol/chloroform, 100 µl hạt thủy tinh và 100 µl nước. Sinh khối được đông hóa trên máy phá tế bào Biospec (Anh) ở chế độ tối đa trong 2 phút. Hỗn hợp được ly tâm 10 phút ở 12000 vòng/phút. Dịch nổi phía trên được dùng làm khuôn cho PCR. Plasmid DNA được tách chiết bằng NucleoSpin[®] Plasmid extraction kit (Macherey-Nagel, Germany).

PCR

Gen (1344 bp) mã hóa *phyA* thành thực được khuếch đại bằng PCR sử dụng môi PhyAF (5'-GCT GAA TTC CTG GCA GTC CCC GCC TCG AGA-3') và PhyAR (5'-TGT TCT AGA GCA AAA CAC TCC GCC CAA TCA CC-3') được thiết kế theo trình tự *phyA* (GenBank: Z16414). PCR (50 µl: 1 µl DNA khuôn; 0,2 mM dNTP, 1 pmol mỗi môi; 1,25

mM MgCl₂, 1x đệm *Taq* polymerase và 2 U *Taq* polymerase) được thực hiện trên máy GeneAmp PCR System 9700 (Mỹ) với chế độ nhiệt: 94°C/3'; 30x (94°C/40", 52°C/1', 72°C/1'); 72°C/7'. Sản phẩm PCR được điện di trên gel 0,8% agarose

Biến nạp bằng sốc nhiệt

Tế bào khả biến được lấy ra từ -75°C, làm tan 15 phút trên đá. Sau đó, mỗi ống tế bào khả biến được bổ sung 10-100 ng DNA, đảo nhẹ nhàng để DNA phân bố đều trong dịch tế bào khả biến, để 30 phút trên đá. Mẫu được gây shock 90 giây ở 42°C, sau đó đặt 2 phút trên đá. Dịch biến nạp được bổ sung 1 ml LB (0,5% yeast extract; 1% tryptone; 1% NaCl; pH 7) và lắc 60 phút ở 37°C, 100 ml dịch tế bào được cấy trải trên đĩa thạch LB bổ sung 100 mg/l ampicillin, ủ qua đêm ở 37°C. Các thể biến nạp dương tính được chạy PCR-khuẩn lạc bằng cách lấy đầu tip chấm khuẩn lạc, chuyển vào ống PCR làm khuôn. Chế độ nhiệt như nhân gen *phyA*, bổ sung 95°C/10' trước phản ứng (Sambrook, Russell, 2001).

Xác định trình tự gen

Trình tự DNA được giải theo nguyên lý Sanger sử dụng kit AmpliTaq (Amersham) theo hướng dẫn của hãng với các môi tương ứng trên máy đọc trình tự model 377 (Applied Biosystem). Các chuỗi DNA được so sánh với các trình tự trên GenBank <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> bằng phần mềm BioEdit 5.0.6 và so sánh bằng ClustalX 2.0. Trình tự amino acid được suy đoán dựa trên bảng mã cho *A. niger* sử dụng phần mềm Vector NTI 9.0. Cây tiến hóa được biên thj bằng phần mềm TreeExplorer 2.12.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân dòng *phyA* thành thực từ *A. niger*

DNA genome của 10 chủng *Aspergillus* tinh sạch được sử dụng làm khuôn cho PCR. Sản phẩm PCR (đoạn *phyA*) cho một băng DNA sáng sắc nét ứng với 1,4 kb, tương đương với kích thước của đoạn *phyA* thành thực cần khuếch đại theo tính toán lý thuyết (1344 bp) (Hình 1). Sản phẩm PCR được gắn vào

vector tách dòng pPICZαA (CNTP 5033, CNTP 5037, CNTP 5091, CNTP 5150) và pTZ57R/T (CNTP 5032, CNTP 5034, CNTP 5089, CNTP 5090, CNTP 5148, CNTP 5149) và biến nạp vào *E. coli* DHSα. Gen *phyA* từ 9 chủng *A. niger* khác nhau từ chủng CNTP 5034 được tách dòng thành công. Các thể biến nạp *E. coli* dương tính chứa plasmid mang gen *phyA* được kiểm tra bằng PCR-colony, nuôi cấy và tách chiết plasmid để giải trình tự DNA.



Hình 1. Nhân dòng gen *phyA* thành thực bằng PCR. M. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 1 - 10, số thứ tự các chủng.

Giải trình tự gen *phyA*

Plasmid pPICZαA/*phyA* được giải trình tự ở gen *phyA* và các vùng phụ cận sử dụng hai mỗi α-factor và 3'-AOX1. Plasmid pTZ57R/T/*phyA* được giải trình tự sử dụng cặp mồi M13F và M13R. Trong 9 gen được giải trình tự, 8 gen thuộc các chủng CNTP 5032, CNTP 5033, CNTP 5037, CNTP 5090, CNTP 5091, CNTP 5148, CNTP 5149, CNTP 5150 đã

được đọc thành công toàn bộ gen thành thực. Riêng với chủng CNTP 5089, trình tự 276 nucleotide đầu 5' có nhiều lỗi và không phân tích được. Trình tự còn lại của *phyA* (1068 nucleotide) từ CNTP 5089 có độ tương đồng 99,5% với *phyA* của CNTP 5149 về trình tự DNA và 99,4% về trình tự amino acid. Mức độ tương đồng DNA và số lượng nucleotide khác biệt từ trình tự nucleotide của 8 chủng được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Độ tương đồng trình tự DNA của các gen *phyA* thành thực và sự sai khác về số nucleotide

PhyA	CNTP 5032	CNTP 5033	CNTP 5037	CNTP 5090	CNTP 5091	CNTP 5148	CNTP 5149	CNTP 5150
CNTP 5032		92,1%	92,3%	99,7%	93,2%	99,5%	93,4%	93,3%
CNTP 5033	105 nt		99,1%	92,1%	96,2%	92,1%	96,1%	95,8%
CNTP 5037	103 nt	12 nt		92,2%	96,3%	92,3%	96,2%	95,9%
CNTP 5090	3 nt	106 nt	104 nt		93,1%	99,7%	93,3%	93,3%
CNTP 5091	91 nt	51 nt	49 nt	92 nt		93,2%	96,4%	96,7%
CNTP 5148	6 nt	105 nt	103 nt	3 nt	91 nt		93,4%	93,4%
CNTP 5149	88 nt	52 nt	50 nt	89 nt	48 nt	88 nt		96,7%
CNTP 5150	90 nt	56 nt	54 nt	89 nt	44 nt	88 nt	44 nt	

Trình tự nucleotide khác biệt nhau giữa các gen. Các cặp trình tự có độ tương đồng thấp là (CNTP 5033 - CNTP 5090 (92,1%); (CNTP 5032 - CNTP 5033 (92,1%); CNTP 5037 - CNTP 5090 (92,2%); CNTP 5032 - (CNTP 5037 (92,3%) Các cặp trình tự có độ tương đồng cao thuộc về CNTP 5148 - CNTP 5090 (99,7%); CNTP 5032 - (CNTP 5090 (99,7%), CNTP 5148 - CNTP 5032 (99,5%); CNTP 5033 - CNTP 5037 (99,1%). Điều này cho thấy ngay trong cùng một loài các gen mã hóa phytase có sự khác biệt khá lớn và có thể mang đặc điểm riêng khác nhau.

Tuy nhiên, sự sai khác nhiều về trình tự nucleotide chưa hẳn đã dẫn đến sự sai khác về trình tự amino acid trong protein của *PhyA* (Hình 3). CNTP 5149 và CNTP 5148 khác nhau ở 88 nucleotide và ở 21 amino acid, trong khi đó CNTP 5149 và CNTP 5090 khác nhau ở 89 nucleotide nhưng chỉ khác biệt ở 19 amino acid. CNTP 5032 và CNTP 5090 có 3 nucleotide khác biệt nhưng không có amino acid khác biệt nào. Nhìn chung, trình tự amino acid bảo thủ hơn so với trình tự nucleotide theo nguyên lý 61 codon mã hóa cho 20 amino acid.

Cây phân loại gen *phyA* thành thực của một số chủng *A. niger* trên GenBank có thể được chia làm 4 nhóm chính và đều chia nguồn gen đã tách dòng từ các chủng *A. niger* trong nghiên cứu này: CNTP 5089, CNTP 5149 (nhóm 1); CNTP 5033, CNTP 5037 (nhóm 2); CNTP 5091, CNTP 5150 9 (nhóm 3); CNTP 5032, CNTP 5090, CNTP 5148 (nhóm 4) (Hình 2). Trong cùng nhóm, khi so sánh trình tự nucleotide của *phyA* thành thực giữa chúng nghiên cứu và chủng trên GenBank cho thấy. Nhóm 1: Chủng CNTP 5149 có độ tương đồng 99,8% với *A. niger* AF218813; Nhóm 2: Mức độ tương đồng giữa CNTP5033 và CNTP5037 với *A. niger* AY426977 lần lượt là 99,7% và 99,6%; Nhóm 4: Trình tự của *A. awamori* DQ192035 có độ tương đồng 99,9% với CNTP 5090, 99,8% với CNTP 5032 và 99,7% với CNTP 5148. Trong nhóm 3. CNTP 5091 có độ tương đồng 99,9% với *A. niger* L02421, trong khi đó chủng CNTP 5150 có độ khác biệt lớn nhất so với các trình tự trong cùng nhóm. Độ tương đồng cao nhất của CNTP 5150 với *A. niger* AY745739 là 97,9%, nên rất có thể phytase từ CNTP 5150 mang những đặc điểm khác biệt. Như vậy, các gen *phyA* thành thực trong nghiên cứu này có mặt trong hầu hết các nhóm cơ bản. Đây chính là nguồn nguyên liệu phong phú, giúp ích trong việc lựa chọn những

gen thích hợp để tạo chủng tái tổ hợp.

Trình tự amino acid suy đoán của protein thành thực từ các chủng *A. niger* nghiên cứu và trình tự *PhyA* của chủng *A. niger* NRRL 3135 (GenBank: Z16414) được so sánh với nhau (Hình 3).

Trình tự protein của phytase hoàn chỉnh có 467 amino acid, trong đó 19 amino acid thuộc đoạn peptide tín hiệu và 448 amino acid thuộc đoạn protein thành thực, giống hệt phytase từ *A. niger* NRRL 3135 (Mullaney *et al.*, 2000). Trình tự protein thành thực từ chủng CNTP 5037 dừng lại ở vị trí thứ 50 có thể do lỗi đọc trình tự, nếu không chủng này không biểu hiện được protein hoàn chỉnh.

Một trong những quan tâm lớn nhất của chúng tôi với phytase là vị trí hoạt động của enzyme; khả năng hoạt động ở pH acid; khả năng bền nhiệt được chỉ phối hay quyết định bởi một số amino acid nào. Chính vì vậy việc phân tích một số vị trí amino acid của chúng nghiên cứu, so sánh với các công bố trước đó có ý nghĩa đến việc dự đoán được đặc tính enzyme.

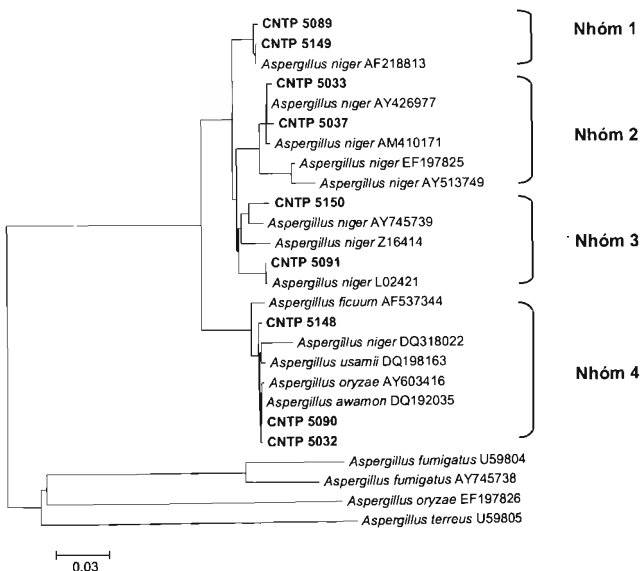
Một số amino acid tạo thành điểm gắn cơ chất đặc hiệu (SSS) và bao quanh vị trí hoạt động của phytase *A. niger* NRRL 3135 bao gồm: hai amino acid tính acid E228, D262 và bốn amino acid tính base K91, K94, K300, K301 (Mullaney *et al.*, 2000). Các chủng CNTP 5033, CNTP 5091, CNTP 5149, CNTP 5150 đều có trình tự điểm gắn cơ chất đặc hiệu giống như *A. niger* NRRL 3135. Riêng các chủng CNTP 5032, CNTP 5090, CNTP 5148, amino acid K300 (lysine) được thay bằng N300 (asparagine) một amino acid trung tính. Wyss *et al.* (1999) chỉ ra rằng nếu amino acid 300 mang tính acid hoặc base thì phytase có hoạt tính xúc tác cao với cơ chất phytic acid. Ngược lại hoạt tính xúc tác giảm khi amino acid 300 đó trung tính. Chính vì vậy phytase từ các chủng CNTP 5032, CNTP 5090, CNTP 5148 được dự tính sẽ không có hoạt tính cao và không có tính cạnh tranh khi được sử dụng.

Bốn amino acid K91, K94, K300, K301 có vai trò quan trọng đối với đặc tính hoạt động ở pH thấp của phytase. Ở pH 2,5, bốn amino acid trên đều tích điện dương và có ái lực mạnh với cơ chất tích điện âm (phytic acid) (Wyss *et al.*, 1999). Thậm chí khi pH lên tới giá trị 5,0 thì điện tích của điểm gắn cơ chất đặc hiệu vẫn còn có ái lực với cơ chất. Như vậy phytase từ các chủng CNTP 5033, CNTP 5091, CNTP 5149, CNTP 5150 đều có 4 amino acid như trên có khả năng hoạt động tốt ở pH acid.

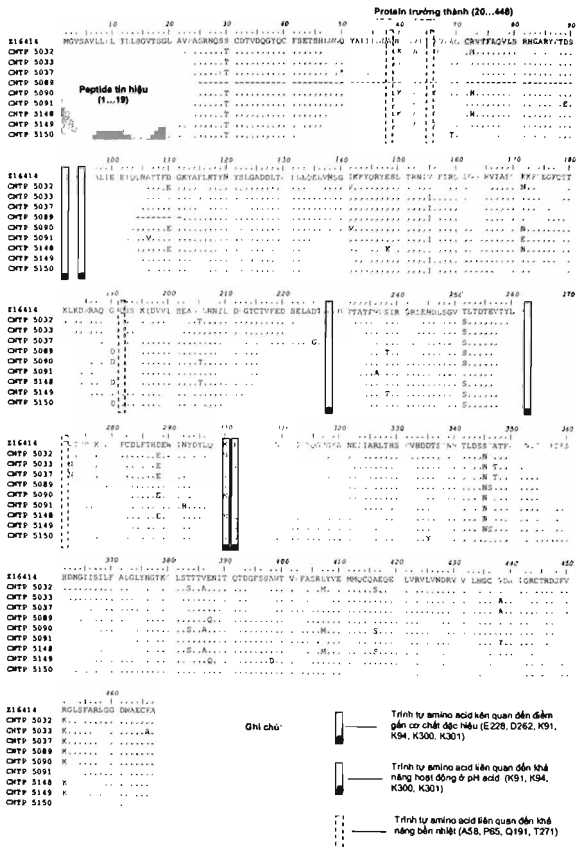
Zhang và đồng tác giả (2007) chỉ ra rằng 4 amino acid có liên quan đến đặc tính bền nhiệt của enzyme này là A58, P65, Q191, T271. Nếu phytase có 4 amino acid như trên thì khả năng bền nhiệt của enzyme là thấp. Tất cả các phytase đã được phân lập đều có 4 amino acid như đã nêu, nên chúng có thể không bền nhiệt. Đột biến điểm thay thế 4 amino acid A58E, P65S, Q191R, T271R đã làm tăng độ bền nhiệt của phytase nhưng đồng thời không ảnh hưởng đến đặc tính pH (Zhang *et al.*, 2007). Chính vì vậy khả năng đột biến điểm ở 4 amino acid được tính đến nếu mong muốn sản xuất phytase bền nhiệt. Như vậy phytase thành thực suy ra từ các gen *phyA* của các chủng *A. niger* được phỏng đoán không có độ

bền nhiệt cao. Đây cũng là đặc điểm chung của phytase từ vi sinh vật này. Khai thác và sử dụng nguồn gen từ các chủng CNTP 5150, CNTP 5149, CNTP 5033, CNTP 5091 có nhiều ưu điểm về khả năng hoạt động ở pH thấp, hoạt tính đặc hiệu cao với phytic acid. Đây cũng chính là định hướng sản xuất phytase phục vụ thức ăn chăn nuôi.

Các trình tự nghiên cứu đã được đăng kí và 7 trình tự *phyA* được công bố trên GenBank. Mã số truy cập của các chủng CNTP 5150, CNTP 5148, CNTP 5149, CNTP 5032, CNTP 5033, CNTP 5090, CNTP 5091 lần lượt là: HM369362, HM369363, HM369364, HM369365, HM369366, HM369368, HM369369.



Hình 2. Đồ tương đồng trình tự nucleotide gen mã hóa phytase thành thực từ các chủng nghiên cứu và một số chủng GenBank (mã số kèm sau tên loài). Suy đoán đặc tính phytase dựa trên trình tự amino acid.



Hình 3. So sánh trình tự amino acid của PhyA thành thực từ *A. niger* CNTP 5032, CNTP 5033, CNTP 5037, CNTP 5089, CNTP 5090, CNTP 5091, CNTP 5148, CNTP 5149, CNTP 5150 và trình tự PhyA đầy đủ từ *A. niger* NRRL 3135 (Z16414).

KẾT LUẬN

Gen *phyA* thành thực từ DNA genome của một số chủng *A. niger* được phân lập thành công bằng PCR. Trong 9 gen *phyA* tách dòng, 8 gen *phyA* được giải trình tự hoàn toàn (1344 bp), riêng gen *phyA* của chủng CNTP 5089 bị lỗi 276 nucleotide. Mức độ tương đồng di truyền giữa 8 gen *phyA* thành thực là 92,1-99,7% và được phân vào 4 nhóm chính trên cây phân loại. Đây là nguồn nguyên liệu phong phú, tiềm năng phục vụ sản xuất phytase tái tổ hợp hoạt tính cao, hoạt động ở pH thấp phù hợp cho ứng dụng trong thức ăn chăn nuôi.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài mã số 05/HD-ĐT.05.10/CNSHC.B. Bộ Công Thương. Đồng thời có sự đóng góp của Chương trình hợp tác nghiên cứu Việt Nam - Thụy Điển SIDA/SAREC.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Al Asheh S, Duvnjak Z (1994) Characteristics of phytase produced by *Aspergillus carbonarius* NRC 401121 in canola meal. *Acta Biotechnol* 14: 223-233.

Berka RM, Rey MW, Brown KM, Byun T, Klotz AV (1998) Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* *Appl Environ Microbiol* 64(11): 4423-4427.

Cromwell GL, Stahly TS, Coffey RD, Monogue HJ, Randolph JH (1993) Efficacy of phytase in improving the bioavailability of phosphorus in soybean meal and corn-soybean meal diets for pigs. *J Anim Sci* 71: 1831-1840.

Kerovuo J (2000) A Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization and Production of the Enzyme. *PhD dissertation. Faculty of Science, University of Helsinki, Finland.*

Mullaney EJ, Daly CB, Ullah AHJ (2000) Advances in phytase research. *Adv Appl Microbiol* 47: 157-199.

Nguyễn Thị Ngọc Huyền, Nguyễn Thùy Châu, Nguyễn

Tiến Minh, Nguyễn Ngọc Diệp, Đinh Duy Kháng, Trương Nam Hải, Trịnh Thị Thu Hằng (2005) Phân lập và đặc trình tự gen mã hóa phytase từ *Bacillus subtilis*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 3+4: 83-86.

Nguyễn Văn Việt (2008) Nghiên cứu biểu hiện gene *phyC* có nguồn gốc từ *Bacillus subtilis* trên *E. coli* BL21 (DE3) và bước đầu ứng dụng enzyme tái tổ hợp cho chăn nuôi. *Luận văn thạc sỹ khoa học sinh học. Khoa sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*

Rodriguez E, Han Y, Lei XG (1999) Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene (*appA2*) isolated from pig colon. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 117-123.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning. A Laboratory Manual *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York* 2: 112-122

Shimizu M (1993) Purification and characterization of phytase and acid phosphatase by *Aspergillus oryzae* K1. *Biosci Biotech Biochem* 57: 1364-1365.

Vohra A, Satyanarayana V (2003) Phytase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol* 23 (1): 9-60.

Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, Rémy R, Fimbel R, Oesterhelt G, Lehmann M, Van Loon APGM (1999) Biochemical characterization of fungal phytase (*myo*-Inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties. *Appl Environ Microbiol* 65(2): 367-373.

Xiong AS, Yao QH, Peng RH, Han PL, Li X, Fan HQ, Guo MJ, Zhang SL (2004) Isolation, characterization, and molecular cloning of the cDNA encoding a novel phytase from *Aspergillus niger* 113 and high expression in *Pichia pastoris* *J Biochem Mol Biol* 37(3): 282-291.

Zhang LH, An LJ, Gao XR, Wang YJ (2005) Properties of *A. ficinum* AS3.324 phytase expressed in tobacco. *Process Biochem* 40: 213-216.

Zhang W, Mullaney EJ, Lei XG (2007) Adopting selected hydrogen bonding and ionic interactions from *Aspergillus fumigatus* phytase structure improves the thermostability of *Aspergillus niger* *PhyA* phytase. *Appl Environ Microbiol* 73(9): 3069-3076.

SEQUENCE ANALYSIS OF THE GENE (*PHYA*) ENCODING THE MATURE PHYTASE FROM SEVERAL *ASPERGILLUS NIGER* STRAINS

Ngô Thanh Xuân^{1,2,3}, Mai Thị Hằng², Nguyễn Phương Linh^{1,2}, Đinh Thị Mỹ Hằng¹, Vũ Nguyễn Thanh^{1*}

¹Food Industries Research Institute

²Hanoi National University of Education

³Laocai Community College

SUMMARY

Phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases) are produced in plants and microorganisms, particularly in fungi. Phytases produced by *Aspergillus niger* are active at acidic conditions. The enzymes have found wide application as supplement for animal feed. In this study, DNA fragments encoding mature phytase sequences (*phyA*) from 10 *A. niger* strains have been cloned and 9 sequences have been analyzed. The fragments contained 1344 bp encoding for 448 amino acids. The obtained *phyA* sequences showed 99.7 - 92.1% similarity and differed from each other by 3 to 106 nucleotides. The derived amino acid sequences indicated that phytases produced by the investigated *A. niger* strains might not be heat resistant. Phytases from *A. niger* strains CNTP 5150, CNTP 5149, CNTP 5033, and CNTP 5091 might be active at acidic conditions and possess high specific activity with phytic acid. Based on sequence similarity, the studied enzymes might be classified under four phytases that have been reported for *A. niger*. The *phyA* sequences have been deposited at the GenBank with accession numbers HM369362, HM369363, HM369364, HM369365, HM369366, HM369368, and HM369369 corresponding to the *A. niger* strains CNTP 5150, CNTP 5148, CNTP 5149, CNTP 5032, CNTP 5033, CNTP 5090, and CNTP 5091, respectively

Keywords: *Phytase, Aspergillus niger, sequence analysis, phyA, mature protein*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-35589004; E-mail: thanh@firi.ac.vn